



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SHEYLA CARLA BARBOSA DA SILVA LIMA

**Caracterização proteômica e identificação de proteínas em *Stylosanthes scabra* sob
déficit hídrico**

**Recife
2019**

SHEYLA CARLA BARBOSA DA SILVA LIMA

Caracterização proteômica e identificação de proteínas em *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito exigido para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Coorientadoras: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Dr^a Valesca Pandolfi

**Recife
2019**

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lima, Sheyla Carla Barbosa da Silva

Caracterização proteômica e identificação de proteínas em
Stylosanthes scabra sob déficit hídrico / Sheyla Carla Barbosa da Silva
Lima - 2019.

167 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Tercilio Calsa Junior

Coorientadoras: Ana Maria Benko Iseppon

Valesca Pandolfi

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Estresse abiótico 2. Seca 3. Espectrometria de massas
I. Calsa junior, Tercilio (Orientador) II. Iseppon, Ana Maria Benko
(Coorientadora) III. Pandolfi, Valesca (Coorientadora) IV. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-044

SHEYLA CARLA BARBOSA DA SILVA LIMA

Caracterização proteômica e identificação de proteínas em *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito exigido para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 21/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tercílio Calsa Junior

(Orientador - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal

(Membro interno - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

(Membro interno - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr. Katia Castanho Scortecci

(Membro externo - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr. João Pacífico Bezerra Neto

(Membro externo - Universidade Federal de Pernambuco)

*À minha família, por todo amor, dedicação e apoio.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me proporcionar força e direcionamento no decorrer dessa caminhada.

Aos meus pais Lucilia e Robson; e irmão, Robson Filho, que estão comigo me apoiando e incentivando.

Ao meu esposo Cassiano Neto pelos anos de dedicação, amor, apoio, conselhos e em especial compreensão nos momentos mais difíceis desta jornada. Obrigada meu amor, tudo que tenho conquistado até aqui também devo a você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior e chefe do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), pela oportunidade de ser orientanda e fazer parte do LGPP, por toda ajuda e por acreditar na minha capacidade.

Às minhas coorientadoras, Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon, chefe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), pela oportunidade de integrar a equipe deste projeto, por me permitir fazer parte do LGBV por tantos anos, pela confiança e ajuda. E a Dr^a. Valesca Pandolfi, por sempre estar disponível para ajudar, por acreditar no meu trabalho e por toda amizade

À minha coorientadora não oficial Dr^a. Fabiana Cavalcante por me guiar pelos novos caminhos da proteômica, por toda ajuda e momentos de descontração dentro e fora do LGPP.

Ao meu coorientador não oficial Dr. João Pacífico por todo conhecimento passado e construído de forma paciente e didática. Por me ajudar a desvendar os “mistérios” da bioinformática e pelos conselhos.

Aos amigos que encontrei nesta caminhada, aos que encontrei no LGBV e aos que me acolheram no LGPP. Obrigada pela amizade!

À Universidade Federal de Pernambuco e Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por todo suporte até o momento e à Adenilda que tenta nos ajudar da melhor forma.

Ao suporte financeiro concedido pela agência de fomento à pesquisa, CAPES.

À UNESP pela pessoa do pesquisador Tiago Balbuena pela colaboração.

À FAPESP e ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) pela colaboração.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Ó minha alma se alegra somente no Senhor,
porque d’Ele vem a minha esperança. ”*

Salmos 62-5

RESUMO

A família das leguminosas inclui o gênero *Stylosanthes*, com espécies amplamente utilizadas na agropecuária como forragem animal, em razão da qualidade nutricional significativa, além da utilização como cultura de rotação e em consórcio, por melhorar a fertilidade do solo através da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). *Stylosanthes scabra* apresenta tolerância a solos ácidos, salinos, com baixa fertilidade e com pouca disponibilidade de água – um dos fatores que mais impactam a produtividade das principais culturas em todo o mundo. O déficit hídrico tem sido cada vez mais frequente mundialmente, principalmente devido às mudanças climáticas, o que afeta consideravelmente a FBN, desenvolvimento e a produtividade de culturas leguminosas. Neste estudo, uma análise *in silico* do transcriptoma foi realizada, com o intuito de identificar as nodulinas tardias mais abundantes e que possam estar envolvidas na FBN. Além da análise do perfil proteômico de *S. scabra* submetida ao déficit hídrico, através de eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas (MS) (6 e 24 h após suspensão de rega) e através do método proteômica shotgun (LC-MS/MS), com objetivo de identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs, *differentially accumulated proteins*). A análise *in silico*, revelou 46 superfamílias associadas as 20 sondas utilizadas para mineração. As proteínas mais abundantes, com e-value 10^{-10} e continham domínio completo estavam em quatro grupos, que apresentaram domínios SWEET, Nramp, Globin e VIT1. No perfil proteômico por 2D-PAGE um total de 195 DAPs foram encontradas, sendo 110 para tempo 6 h e 85 em 24 h. As proteínas de uma forma geral apresentaram-se envolvidas com resposta ao estresse, sistema antioxidantes e glicólise. Em análise do perfil proteômica da planta submetida ao estresse por 24 h através do método LC-MS/MS conseguimos quantificar 238 proteínas, onde 34 foram proteínas diferencialmente acumuladas, sendo identificadas e mapeadas em vias que podem estar associadas a resposta de *S. scabra* ao déficit hídrico. Na análise de enriquecimento, o tratamento irrigado apresentou significância apenas para ‘componente celular’, sendo o termo mais enriquecido ‘membrana plasmática’. Para o tratamento DH o termo mais enriquecido para processo biológico foi ‘respostas ao estímulo’, em função molecular foi ‘ligação proteica’. As proteínas foram mapeadas principalmente em vias de sinalização, resposta ao estresse, sistema redox e glicólise. A partir dos dados, sugerimos a rápida percepção da condição de estresse pela planta e o possível empenho em manter produção de energia e a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Palavras-Chave: Estresse abiótico. Seca. Espectrometria de massas. MALDI. Bioinformática.

ABSTRACT

The legume family includes the genus *Stylosanthes*, with species widely used in agriculture as animal fodder, due to the significant nutritional quality, in addition to being used as a rotational crop and in consortium, for improving soil fertility through Biological Nitrogen Fixation (FBN). *Stylosanthes scabra* has a tolerance to acidic, saline soils, with low fertility and with little water availability - one of the factors that most impact the productivity of the main crops worldwide. The water deficit has been more and more frequent worldwide, mainly due to climate changes, which considerably affects the BNF, development and productivity of leguminous crops. In this study, an *in silico* analysis of the transcriptome was performed in order to identify the most abundant late nodulins that may be involved in FBN. In addition to the analysis of the proteomic profile of *S. scabra* submitted to water deficit, through two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry (MS) (6 and 24 h after watering suspension) and through the proteomic shotgun method (LC-MS / MS), in order to identify differentially accumulated proteins (DAPs). The *in silico* analysis revealed 46 superfamilies associated with the 20 probes used for mining. The most abundant proteins, with e-value $< 10^{-10}$ and containing a complete domain, were in four groups, which presented SWEET, Nramp, Globin and VIT1 domains. In the 2D-PAGE proteomic profile, a total of 195 DAPs were found, 110 for 6 h and 85 for 24 h. Proteins in general were involved in response to stress, antioxidant systems and glycolysis. By analyzing the proteomic profile of the plant subjected to stress for 24 h using the LC-MS / MS method, we were able to quantify 238 proteins, where 34 were differentially accumulated proteins, being identified and mapped in pathways that may be associated with the response of *S. scabra* to water deficit. In the enrichment analysis, the irrigated treatment showed significance only for 'cell component', the most enriched term being 'plasma membrane'. For the DH treatment, the most enriched term for the biological process was 'responses to stimulation', in molecular function it was 'protein binding'. The proteins were mainly mapped in signaling, stress response, redox system and glycolysis. From the data, we suggest the quick perception of the stress condition by the plant and the possible effort to maintain energy production and the Biological Nitrogen Fixation (FBN).

Keywords: Drought. Spectrometry. *Stylosanthes*. Proteins.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1 -	Distribuição de <i>Stylosanthes scabra</i> entre os estados brasileiros.....	17
Figura 2 -	Visão global da associação simbiótica entre o tecido radicular de plantas leguminosas e microorganismo, para formação de nódulos e realização da fixação biológica de nitrogênio.....	22

Artigo 1

Figura 1 -	Superfamílias encontradas em <i>Stylosanthes scabra</i> submetida ao déficit hídrico, a partir de sondas de nodulinas tardias.....	43
Figura 2 -	Mapa com expressão diferencial dos transcritos que apresentaram <i>Fold change</i> > 1,5, <i>p-value</i> e FDR <0.05.....	45

Artigo 2

Figura 1 -	Géis bidimensional SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas solúveis totais radiculares de <i>Stylosanthes scabra</i> submetidas ou não ao déficit hídrico. As proteínas (500 µg) foram separadas em fitas IPG com pH de 3 a 10. Amostras coletadas após 6 h nos tratamentos irrigado (A) e sob déficit hídrico (B).....	78
Figura 2 -	Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais radiculares de <i>S. scabra</i> submetidas ou não ao déficit hídrico. As proteínas (500 µg) foram separadas em fitas IPG com pH de 3 a 10. Amostras coletadas após 24 h nos tratamentos irrigado (A) e sob déficit hídrico (B).....	79
Figura 3 -	Categorias de processo biológico para o tempo de 6 h.....	81
Figura 4 -	Categorias de processo biológico para o tempo de 24 h.....	82
Figura 5 -	Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas para o tempo de 6 h nas vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), resposta celular (C) e regulação (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.....	84
Figura 6 -	Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas para o tempo de 24 h nas vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), resposta celular (C) e regulação (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.....	85

Artigo 3

Figura 1 -	Categorias de processo biológico para 24 h após déficit hídrico.....	116
Figura 2 -	Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas após 24 h de déficit hídrico. Vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), regulação (C) e resposta celular (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.....	117

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1 -	Características das cultivares desenvolvidas a partir de <i>Stylosanthes scabra</i>	20
Tabela 2 -	Espécies da família Fabaceae que apresentam genomas e proteomas disponíveis nos bancos de dados NCBI/Genome e UniProt/Proteomes, respectivamente.....	30

Artigo 2

Tabela 1 -	Comparação do total proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) e total identificadas entre os tempos (6 e 24 horas) e tratamentos (irrigado e déficit hídrico) em <i>Stylosanthes scabra</i>	80
Tabela 2 -	Anotação presumível de DAPs de <i>Stylosanthes scabra</i> inseridas nas possíveis vias de resposta ao déficit hídrico por 6 h pelo <i>software</i> MapMan.....	86
Tabela 3 -	Anotação presumível de DAPs de <i>Stylosanthes scabra</i> inseridas nas possíveis vias de resposta ao déficit hídrico por 24 h pelo <i>software</i> MapMan.....	87

Artigo 3

Tabela 1 -	Proteínas diferencialmente acumuladas em <i>Stylosanthes scabra</i> , após 24 h sob déficit hídrico.....	115
------------	--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Aspectos gerais de <i>Stylosanthes scabra</i>	16
2.1.1	Taxonomia, origem e distribuição geográfica.....	16
2.1.2	Importância econômica e cultivares do gênero <i>Stylosanthes</i>.....	17
2.1.3	Caracterização genética de <i>Stylosanthes spp.</i>	21
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio.....	21
2.2.1	Nodulinas.....	23
2.3	Respostas moleculares induzidas por estresse em plantas.....	23
2.3.1	Déficit hídrico: percepção e consequências para as plantas.....	24
2.2.1.1	Aspectos fisiomorfológicos da deficiência hídrica em plantas.....	25
2.3.1.2	Fixação Biológica de Nitrogênio e déficit hídrico.....	26
2.3.1.3	Impressão e memória de estresse.....	27
2.4	Proteômica e abordagens técnicas.....	28
2.5	Ferramentas computacionais.....	32
3	RESULTADOS.....	35
3.1	ARTIGO 1 - Identificação e caracterização <i>in silico</i> de nodulinas tardias em <i>Stylosanthes scabra</i> Vogel submetida ao déficit hídrico.....	35
3.2	ARTIGO 2 - Proteômica diferencial em raízes de <i>Stylosanthes scabra</i> Vogel em resposta ao déficit hídrico.....	69
3.3	ARTIGO 3 - Análise do proteoma do tecido radicular de <i>Stylosanthe scabra</i> Vogel submetida ao déficit hídrico através de técnica LC-MS/MS.....	106
4	CONCLUSÃO.....	129
	REFERÊNCIAS.....	130
	ANEXO A - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY.....	143
	ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: JOURNAL BBA - PROTEINS AND PROTEOMIC.....	150

1 INTRODUÇÃO

As plantas são frequentemente expostas a condições de estresses bióticos e abióticos que podem prejudicar seu desenvolvimento e sua produtividade. Dentre os principais estresses abióticos destacam-se temperaturas extremas (baixa/ alta), déficit hídrico, salinidade, alagamento, toxicidade por metais pesados e radiação UV. Estudos apontam estresses abióticos como os fatores mais prejudiciais ao crescimento vegetal e à produtividade em nível mundial (BROWN et al., 2003; MITTLER, 2006). Perdas devido a esses estresses levam à queda do rendimento médio das colheitas em mais de 50 %, representando assim um grande desafio diante de uma população mundial crescente (BRAY, et al., 2000; MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

O déficit hídrico e a salinidade destacam-se como os principais problemas ambientais que limitam a sobrevivência, crescimento e produtividade das plantas. Tais estresses comprometem e impedem que as plantas alcancem seu potencial genético (MAHAJAN & TUTEJA, 2005) e acabam por induzir respostas bioquímicas e fisiológicas nas plantas, de forma a permitir a tolerância ou aumentar as chances de sobrevivência às condições adversas (BENKO-ISEPPON et al., 2012).

As leguminosas possuem importância ecológica e econômica, pois contribuem com 27% da produção agrícola primária do mundo e são a chave para a agricultura sustentável (DUC et al., 2014). Recentemente, uma nova classificação foi apresentada para Leguminosae, com as subfamílias Caesalpinioideae, Dialioideae, Detarioideae, Cercidoideae, Duparquetioideae e Papilionoideae (ou Faboideae). A família Papilionoideae engloba o maior número de espécies (14 mil) (LPWG, 2017) e a tribo Dalbergieae - composta por 45 gêneros, incluindo o gênero *Stylosanthes* Sw, com cerca de 50 spp. (FERREIRA & COSTA 1982; TARAWALI et al., 2005; LEWIS et al., 2005).

O gênero *Stylosanthes* tem se tornando alvo de pesquisas desde a década de 70, por apresentar adaptação ao semiárido brasileiro e tolerância às pressões bióticas e abióticas. Embora algumas espécies ainda são pouco exploradas comercialmente (BARCELLOS et al., 2001). A maior parte das espécies de *Stylosanthes* é perene, tolerantes à seca, apresentando capacidade de propagação em novos ambientes por sua adaptação a solos de baixa fertilidade e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (ANDRADE & KARIA, 2000; VILELA, 2000).

O Brasil apresenta uma atividade agropecuária expressiva, tanto nacional como internacional, detendo o maior rebanho bovino comercial do mundo. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*), em 2014 ocupou o quinto lugar na produção de leite e a segunda posição na produção de corte bovino. Segundo a SEAB (Secretaria da Agricultura e Abastecimento) as regiões Sudeste e Nordeste apresentaram em 2014 uma produção de leite de 34,4% e 20,6%, respectivamente. Para produção bovina de corte, o Nordeste também apresentou crescimento, Maranhão com 1.784.464 cabeças desmamadas e a Bahia com 3.517 (SEAB, 2015; 2016). Assim, é comum a prática da atividade em sistema extensivo de produção tendo a forragem como base da dieta (HOFFMANN et al., 2014), portanto, a intensificação da produção e da forrageiras utilizadas é imprescindível.

Espécies do gênero *Stylosanthes* são usadas frequentemente em consórcio com Gramíneas, com atributos ao ganho ou manutenção do peso de animais durante o período de seca, como resultado da melhor qualidade da leguminosa, sendo o principal benefício da pastagem consorciada sobre pastagem pura de gramínea (PEIXOTO et al., 2001). A capacidade de melhorar a capacidade do solo esta na associação entre leguminosas e rizóbios, que é o sistema de fixação de nitrogênio mais promissor, proporcionando benefícios econômicos em termos de menor aplicação de fertilizantes e sustentabilidade do solo (CREWS & PEOPLES 2004; KUMAR et al. 2013, 2014; BHAGAT et al. 2014).

Portanto, a busca por genes e produtos gênicos com novas características em espécies de importância agrícola, biotecnológica e nativas que apresentam maior tolerância às condições ambientais estressantes como déficit hídrico, poderá trazer grandes avanços no melhoramento genético desta e de outras leguminosas, visto que os estresses abióticos e bióticos acarretam perdas significativas no rendimento das culturas em diversos países. Por conseguinte, para gestão adequada de cultivares e espécies nativas tolerantes a estresses abióticos, é cada vez mais necessário um melhor entendimento dos mecanismos de resposta das plantas em nível celular e molecular frente a tais condições ambientais adversas.

As observações de expressão gênica podem fornecer informações importantes sobre o *pool* gênico que é transcrito em determinado organismo, em um certo momento, embora não corresponda sempre diretamente à expressão das proteínas (CHEN e HARMON, 2006), tendo em vista as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, com alteração da conformação proteica, com diferentes funções metabólicas (CHEN e HARMON, 2006), especialmente quando submetidas a condições e estímulos ambientais diversos. Assim, a

proteômica - estudo sistemático de um proteoma, ou conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo (WASINGER et al., 1995), permite avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no metabolismo celular (PARK, 2004; CHEN e HARMON, 2006) em uma determinada condição. O presente trabalho apresenta duas abordagens para caracterização genética de *S. scabra*: i. análise *in silico* da abundância de nodulinas tardias, que são proteínas que atuam na fixação de nitrogênio e facilitam o estabelecimento e a manutenção de condições adequadas dentro do nódulo; e ii. utilização de técnicas proteômicas (2D-PAGE e *shotgun*, associada a espectrometria de massas) visando caracterizar o proteoma e identificar proteínas associadas à tolerância desta planta quando submetida ao estresse por déficit hídrico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o proteoma diferencial *Stylosanthes scabra* e identificar proteínas associados à maior tolerância ao déficit hídrico.

1.1.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar computacionalmente nodulinas tardias mais abundantes em *S. scabra*, submetida ao déficit hídrico.
- Obter o perfil proteômico de *S. scabra* em condições contrastantes de disponibilidade hídrica.
- Selecionar e identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) associadas às diferentes condições experimentais testadas.
- Analisar as DAPs de *S. scabra* obtidas para anotação presumível e caracterização funcional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GERAIS DE *STYLOSANTHES SCABRA*

2.1.1 Taxonomia, origem e distribuição geográfica

O gênero *Stylosanthes* é constituído por espécies herbáceas, com folhas trifolioladas, estípulas bidentadas com bainhas amplexicaules, inflorescências espiciformes com flores amarelas, compostas ou não de eixo rudimentar plumoso e frutos do tipo lomento, com um ou dois artículos com estiletes residuais (FERREIRA & COSTA, 1979).

Swartz, em 1788, descreveu o gênero *Stylosanthes* a partir de duas espécies, *S. procumbens* Swartz (= *S. hamata* (L.) Taubert) e *S. viscosa* Swartz. Em 1838, Vogel publicou estudos sobre o gênero dividindo-o em duas seções, *Eustylosanthes* e *Styposanthes* (FERREIRA & COSTA, 1982). A taxonomia utilizada atualmente é a descrita por Kirkbride Jr. & Kirkbride (1987) e Calles & Schultze-Kraft (2010), onde as seções são divididas em *Stylosanthes* e a *Styposanthes*, que se baseia na presença/ausência de eixo plumoso na base das flores e/ou frutos e no número de bractéolas. *Stylosanthes* seção *Styposanthes* Vogel é reconhecida por possuir eixo rudimentar na base e três bractéolas, enquanto que *Stylosanthes* seção *Stylosanthes*, além de não apresentar eixo rudimentar na base das flores e/ou frutos, apresenta duas bractéolas (COSTA *et al.* 2008).

As espécies deste gênero ocorrem nos trópicos, subtropicos e regiões temperadas das Américas, África tropical e sudeste da Ásia (TARAWALI *et al.*, 2005), sendo nativa da flora brasileira (BARCELLOS *et al.*, 2001). O gênero *Stylosanthes* é constituído por 50 espécies relatadas, dentre estras, 31 ocorrem no Brasil, sendo o principal centro de origem e diversidade (LEWIS *et al.*, 2005; COSTA; VALLS, 2015). *Stylosanthes scabra* Vogel é uma planta lenhosa, perene, de porte subarborescente, com 20-150 cm de altura, com hábito predominantemente ereto, podendo ser confundida com *S. viscosa* por apresentar seus ramos e folíolos parecidos e viscosos. A reprodução se dá por autofecundação, embora uma pequena taxa (2-6%) pode ocorrer por meio de reprodução cruzada. A *S. scabra* é uma espécie distribuída, em grande parte, na América do sul, sendo cultivada de norte a sul do Brasil, em savana (cerrado), savana florestada (cerradão) e savana gramíneo-lenhosa. Floresce e frutifica simultaneamente de outubro a agosto (STACE; CAMERON, 1984; COSTA, 2006; COSTA *et al.*, 2008; FORTUNA-PEREZ *et al.*, 2011). Esta espécie é nativa da América do Sul:

Noroeste da Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela; Caribe: Bahamas, Cuba (TROPICAL FORAGES, 2017).



Figura 1. Distribuição de *Stylosanthes scabra* entre os estados brasileiros. Cores representam estados separados por região.(COSTA; VALLS, 2015)

O Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA disponibiliza 1.440 registros de *S. scabra* dos quais, 1.436 foram relatados no Brasil, sendo os estados da Bahia e Pernambuco com maior número de ocorrências, 300 e 181 ocorrências, respectivamente (www.cria.org.br; CRIA, 2019). Costa e Valls (2015), descreveram uma ampla distribuição de *S. scabra* no Brasil porém mesmo com o grande número de relatos nessas regiões o potencial de uso destas espécies ainda é muito pouco explorado.

2.1.2. Importância econômica e cultivares do gênero *Stylosanthes*

Dentre os maiores desafios na produção de rebanhos é a deficiência de forrageiras produtivas e de alta qualidade nutricional, fator esse que é agravado pelos longos períodos de seca e exploração indiscriminada dos recursos forrageiros nativos (ARAÚJO FILHO, 2013). Além disto, a extensão agrícola para cultivos destinados à produção de grãos e gramíneas para a composição de pastagens, tem se intensificado, principalmente pelo aumento da demanda por alimentos e matéria-prima para alimentação de animais. Assim, mudança na vegetação natural, por pastagens cultivadas no cerrado, por exemplo, criam mudanças ambientais ainda

mais importantes e problemáticas desse ecossistema (HORVATHY NETO et al., 2012). Outro fator agravante é que a vida útil das pastagens cultivadas nessas regiões é curta, devido à introdução de espécies forrageiras inadequadas, a baixa fertilidade dos solos e manejo incorreto, resultando na degradação do solo e aumento de plantas invasoras nestas áreas (MACEDO, 2009).

Por outro lado, espécies do gênero *Stylosanthes* destacam-se pela sua relevância na atividade agropecuária, principalmente devido seu alto potencial forrageiro, tanto para a alimentação de gado de corte, como para produção leiteira nas regiões tropicais e subtropicais, além de ser bastante produtiva, com qualidade nutricional significativa, tendo 10% de proteína bruta. Muitas espécies ainda apresentam características de adaptação ao semiárido brasileiro e tolerância às condições bióticas e abióticas, sendo algumas ainda pouco exploradas comercialmente (AYARZA et al., 1997; BARCELLOS et al., 2001; COSTA, 2006).

Além disso, leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes* apresentam um diferencial em comparação às outras espécies, uma vez que são excelentes fixadoras de nitrogênio atmosférico, através da associação simbiótica com bactérias da sua rizosfera. Promovendo melhoria do solo para a agricultura, restabelecimento de áreas degradadas, eliminando custos com fertilizantes nitrogenados comerciais (McKEY, 1994; MOURÃO et al., 2011) e destacando-se como grandes coadjuvantes em consórcios de culturas.

Com o objetivo no melhoramento de espécies do gênero *Stylosanthes*, a Embrapa Gado de Corte tem dedicado esforços na obtenção de forrageiras de alto potencial. Um exemplo é o desenvolvimento da cultivar Campo-Grande (composta por *S. macrocephala* e *S. capitata*, lançada em 2000 pela Embrapa), uma excelente planta forrageira, apresentando alta produtividade em matéria seca e proteína, adaptação a solos de pouca fertilidade, resistência à antracnose e fixação biológica de nitrogênio, além de elevada produção de sementes (EMBRAPA, 2000; VERZIGNASSI e FERNANDES, 2002). Segundo Miranda et al., (1999), apresenta fixação de nitrogênio (180 kg/N/ha), superando a de *S. guianensis* cv. Mineirão e a de *S. macrocephala* cv. Pioneiro (com 95 e 88 kg/N/ha, respectivamente). Esta cultivar (Campo-Grande) associada com a gramínea forrageira *Brachiaria decumbens* promove aumentos de ganhos médios diários (g/animal/dia) como em ganho de peso anual (kg/ha/ano) em comparação ao pastejo com *B. decumbens* sozinha (VERZIGNASSI e FERNANDES 2002).

No que se refere a cultivares desenvolvidas a partir de *S. scabra*, a CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* - Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Comunidade das Nações) em 1963 começou a estudar o gênero *Stylosanthes*, como a fonte mais plausível de leguminosas de pastagem para o norte australiano. *Stylosanthes Scabra* cv. Seca foi desenvolvida a partir CPI 40292 (coletada em 1965 por Richard J. Williams, da CSIRO, nas proximidades da cidade de Gravatá, PE). Esta cultivar foi testada em 17 locais do norte e leste da Austrália, durante o período de 1967 a 1975, numa parceria da CSIRO com vários órgãos do setor agrícola e indústria animal. A mesma cultivar se destacou entre os cultivares locais (trópico seco) com maior tolerância às condições edafo-climáticas adversas do que *S. hamata* cv. Verano e *S. humilis*. Também foi observado que as cultivares Verano e Seca apresentaram os maiores rendimentos em biomassa e resistência a antracnose, ao passo que *S. humilis* foi altamente susceptível (BURT et al., 1974; EDYE et al., 1973, 1974a, 1975, 1976; WILLIAMS et al., 1973). De acordo com Edye et al., (1974b) em quatro anos (até 1969) foram introduzidos quatro exemplares de *S. scabra* morfologicamente diferentes na Austrália. A tabela 1 apresenta a descrição e algumas características de cultivares que foram desenvolvidas a partir de *S. scabra*.

Tabela 1. Características das cultivares desenvolvidas a partir de *Stylosanthes scabra* (TROPICAL FORAGES, 2017).

Cultivar	Tipo (Local de Registro)	Local de origem	Descrição	Resistência	Precipitação
Seca (CPI 40292)	Cultivar (Austrália,1977)	Pernambuco	Vigorosa, ereta, 2 m de altura, caule avermelhado e copa aberta.	Antracnose (único gene).	800 mm, 7 meses de estação seca.
Fitzroy (CPI 40205)	Cultivar (Austrália,1980)	Cruz das Almas, Bahia.	Vigorosa, ereta, 1,5-2 m de altura, hastes verdes. Floração mais precoce, alternativa mais folhosa para 'Seca' para uso em subtrópicos sub-úmido.	Antracnose (Tipo A)	1,150 mm
Feira	Mistura de acessos Q10042 x CPI 55860 (Austrália, 1990)	-	Floresce mais cedo que cv. 'Seca' e mais tarde que cv. 'Recife'; Tem mais ramos terciários do que 'Fitzroy' e 'Seca'.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Estirpes 1,3 e 4)	-
Jecuipe	Mistura de acessos Q10042 x CPI 93116 (Austrália, 1990)	-	Floresce mais cedo que 'Seca' e um pouco mais tarde do que 'Recife'. As plantas têm período mais curto que as de 'Seca' ou 'Recife'	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Estirpes 1,3 e 4)	-
Recife	Seleção de populações geneticamente variáveis da cv. Seca (Austrália, 1990)	-	Floração precoce e altura intermediária, plantas mais altas que as da cv. 'Jecuipe' e 'Feira', período mais curto do que a cv. 'Seca'.	<i>C. gloeosporioide</i> (Estirpes 1 e 4, e moderadamente resistente à raça 3)	-
Siran	Seleção de linhagens das cvs 'Jecuipe', 'Recife', 'Feira' (Austrália, 1990)	-	Geralmente com morfologia e adaptação similares a 'Seca'.	Antracnose (vários genes)	-

2.1.3. Caracterização genética de *Stylosanthes* spp.

O número cromossômico básico do gênero *Stylosanthes* é $x=10$, havendo espécies diplóides ($2n=20$) como *S. viscosa* (L.) Sw., *S. guianensis* (Aubl.) Sw. e *S. macrocephala*; espécies tetraplóides ($2n=40$), como *S. scabra* Vog. e *S. capitata* Vog. e, ainda, uma espécie hexaplóide, a *S. erecta* P. Beauv. (STACE e CAMERON 1984, VIEIRA et al., 1993). Verifica-se também variação genética entre acessos de *S. scabra*, como observado por Marques et al. (2016), os quais confirmaram a presença de indivíduos diploides, alotetraplóides, sendo a aloploidia de *S. scabra* oriunda dos parentais *S. hamata* e *S. viscosa*. Estudos anteriores apontam origem parental de *S. scabra* como sendo de *S. viscosa* e *S. seabrana*. (STACE, 1982). De modo geral, estudos apontam as espécies do gênero *Stylosanthes* como sendo de grande variabilidade intra e interespecífica (VIEIRA et al. 2007).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A associação simbiótica leguminosa-rizóbio evoluiu aproximadamente 58 milhões de anos atrás e acontece em 88% de todas as espécies de leguminosas (de FARIA et al., 1989; SACHS et al., 2011; SPRENT, 2007). A planta hospedeira inicia o processo de infecção, exsudando moléculas flavonóides através das raízes, que são compatíveis com moléculas dos rizóbios (FERGUSON et al., 2010; SPRENT, ARDLEY, & JAMES, 2017). A percepção desses flavonóides atrai as bactérias para as raízes e as estimula a produzir moléculas do fator nod (FN) liberado do rizóbio que desencadeia a desdiferenciação e divisão das células corticais da raiz. Ao mesmo tempo, o rizóbio invade as raízes, o que é facilitado pelos filamentos de infecção, que são estruturas tubulares formadas pela invaginação da parede celular e da membrana plasmática. Os filamentos/cordões de infecção se ramificam e liberam rizóbio nas células corticais por endocitose (LI et al 2018; FERGUSON et al., 2010). Os rizóbios liberados são cercados pela membrana simbiótica vegetal chamada também de membrana peribacterioide. A partir deste estágio são chamados de bacterioides, onde param de se multiplicar e efetuam a fixação de N_2 . Durante a FBN, o N_2 atmosférico é convertido em amônia, que é catalisada pelo complexo nitrogenase (OLDROYD et al.,

2011; UDVARDI & POOLE, 2013). Na simbiose, o complexo nitrogenase é anaeróbico e sensível ao oxigênio (OTT et al., 2005), o que torna a FBN um processo microaerofílico. No entanto, uma grande quantidade de oxigênio é essencial para a respiração e metabolismo energético dos nódulos e plantas (LI et al 2018). As leguminosas desenvolveram três estratégias para resolver essa contradição entre o FBN e o crescimento das plantas: uma barreira gasosa que inibe o influxo de oxigênio no tecido central infectado (MINCHIN, 1997); altas taxas respiratórias de bacteroides e rápido consumo de oxigênio (LI et al 2018). Além destas estratégias, a planta hospedeira regula com consistência o número de nódulos que ela forma, através vias moleculares que permitem controlar a nodulação em resposta a diferentes condições de crescimento (FERGUSON et al., 2018). Fatores abióticos e bióticos adicionais também podem desencadear mecanismos que regulam a nodulação para ajudar a conservar recursos sob estresse (CAO et al., 2017; LIRA et al., 2015; ZAHRAN, 1999).

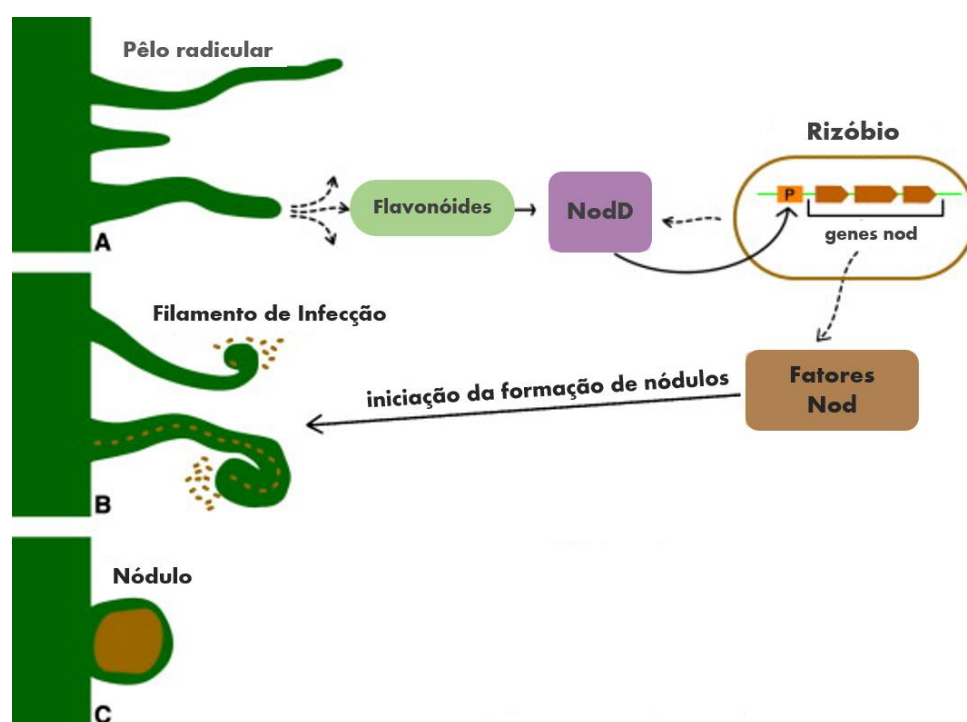


Figura 2. Visão global da associação simbiótica entre o tecido radicular de plantas leguminosas e microorganismo, para formação de nódulos e realização da fixação biológica de nitrogênio (LARANJO et al., 2014) (ADAPTADO).

2.2.1 Nodulinas

A formação de nódulos radiculares em plantas leguminosas é mediada pela expressão diferencial de genes de nodulina: genes de nodulina precoces e tardios. As nodulinas precoces estão envolvidas na formação da estrutura do nódulo e no processo de infecção. As nodulinas tardias são expressas em torno do início da fixação de nitrogênio e facilitam o estabelecimento e a manutenção de condições adequadas dentro do nódulo, de modo que uma fixação adequada de nitrogênio ocorre, levando à assimilação da amônia no interior do nódulo (MENÉNDEZ et al., 2017). Constatou-se que os genes da nodulina precoce (ENOD) estão relacionados com o remodelamento do citoesqueleto, a deposição da parede celular, o crescimento celular e a divisão (DOWNIE 2010). Várias nodulinas precoces estão envolvidas na sinalização durante os estágios iniciais da simbiose rhizobia-leguminosa, como as codificadas pelos genes de plantas *enod40*, *enod2* e *enod12* (BAHYRYCZ & KONOPINSKA 2007; LAPORTE et al., 2007; HASHIMOTO et al., 2008).

Existem dois tipos de nodulinas tardias: (1) nodulinas metabólicas e (2) nodulinas membranares do simbiossoma. As nodulinas metabólicas incluem a leghemoglobina e a uricase, a glutamina sintetase (catalisa o primeiro passo na assimilação do amônio) e a sacarose sintase (catalisa a quebra da sacarose levando à geração de energia). As nodulinas da membrana do simbiossoma serve como interface entre os simbiontes, portanto, espera-se que possua transportadores para troca de nutrientes (MENÉNDEZ et al., 2017). Exemplos de nodulinas de membranas de simbiossoma de soja incluem nodulina 24 e 26 (CHEON et al., 1994). A nodulina 26 é um canal de aquaporina para transporte de água (GUENTHER et al., 2003).

2.3 RESPOSTAS MOLECULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE EM PLANTAS

Vários genes podem ser responsivos a condições de estresse, proporcionando à planta adaptação e tolerância ao tal estresse. Esses genes podem apresentar alto nível de expressão ou serem silenciados, o que ocasiona interferência e modulação nas funções metabólicas que serão refletidas nas alterações fisiológicas e no desenvolvimento vegetal.

Os componentes moleculares de respostas aos estresses ambientais incluem o reconhecimento do sinal ambiental, a transdução do sinal (cascata de reações

bioquímicas), a ativação ou repressão de genes estresse-induzidos e o acúmulo de proteínas que caracterizarão o fenótipo tolerante. Assim, o fenótipo tolerante pode ser traduzido como o resultado de uma rede multidimensional de interações com muitos níveis de expressão e regulação (YI & HONG-BO, 2008).

Genes estresse-induzidos podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui as proteínas que muitas vezes atuam na resposta ao estresse, como as proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*; abundantes na embriogênese tardia), osmorreguladores, aquaporinas, transportadores de sódio, os relacionados ao metabolismo secundário, dentre outros. Já o segundo grupo compreende aqueles que desempenham função na regulação da expressão de outros genes e na transdução de sinais, como os fatores de transcrição e as proteínas quinases (SEKI et al., 2002).

2.3.1. Déficit hídrico: percepção e consequências para as plantas

A maior tolerância ao déficit hídrico em plantas decorre da síntese e ativação de proteínas com funções específicas, tais como: i) rápida percepção e transmissão de sinais ambientais; ii) proteção às membranas, enzimas e ao DNA das células; iii) síntese de metabólitos osmorreguladores (prolina, açúcares, etc.) e proteínas envolvidas no aumento na capacidade de absorção de água do solo; e iv) fechamento estomático e redução na perda de água por transpiração (BENKO-ISEPPON et al., 2005).

Entre as proteínas conhecidas que têm seu acúmulo induzido por condições ambientais estressantes, incluindo o déficit hídrico, estão as enzimas superóxidos dismutases (SOD) e ascorbato peroxidases (APX), atuantes eficazes no sistema antioxidante; as osmotinas, que atuam na regulação da síntese de osmoprotetores como a prolina e a glicina-betaína; as aquaporinas; as desidrinas e proteínas LEA. Vias de sinalização, bem como as proteínas reguladas pelas mesmas, também estão intimamente associadas com respostas a estresse por déficit hídrico, como a via do metil-jasmonato (MeJa), ácido abscísico (ABA) e das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Os genes regulados positivamente por MeJa estão comumente associados com a síntese dos jasmonatos, metabolismo secundário, formação da parede celular, bem como genes codificantes de proteínas de defesa contra estresses. Em resposta a diferentes estresses, os níveis de ABA aumentam, influenciando na regulação positiva ou negativa de genes responsivos à seca, além de participar do fechamento dos estômatos, importante mecanismo de defesa contra esse tipo de estresse. As MAPK

também apresentam envolvimento em cascatas de sinalização em resposta a estresses, incluindo múltiplos sinais extracelulares transmitidos por mensageiros secundários, o que as torna essenciais para os mecanismos de transdução de sinais na resposta a condições ambientais desfavoráveis para as plantas (BUCHANAN, 2000; QURESHI, 2007).

2.3.1.1 Aspectos fisiomorfológicos da deficiência hídrica em plantas

A água é importante para plantas, pois serve de veículo para o transporte de nutrientes essenciais para seu desenvolvimento e fotoassimilados. A entrada de água na planta acontece através da absorção em toda a sua superfície, mas a maior parte do fornecimento vem do solo (PAIVA; OLIVEIRA, 2006). De acordo com Kerbaudy (2004) a quantidade de água do solo disponível para a planta, o arejamento, a temperatura do solo e a taxa de transpiração, são fatores que podem determinar a quantidade de água absorvida pelo sistema radicular.

Algumas plantas percebem rapidamente a deficiência hídrica e iniciam um complexo de respostas, iniciando com a percepção do estresse, que desencadeia uma cascata de sinais moleculares, induzindo vários níveis de respostas bioquímicas, fisiológicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). Consequentemente, as plantas respondem ao estresse através de mudanças essenciais na relação da célula com a água e nos seus processos morfofisiológicos (CORDEIRO et al, 2009). Entre essas mudanças está a restrição no acúmulo de biomassa, afetando tanto o crescimento inicial como nos estádios mais tardios, diminuindo a dimensão e número de folhas, por consequência a área foliar total, taxas de crescimento, número dos ramos e crescimento do caule (MORAES, 2011).

Dentre os principais mecanismos de resposta ao déficit hídrico podem ser citados: escape, evitamento (tolerância sob alto conteúdo de água) e tolerância sob baixo conteúdo de água (tolerância à desidratação). Como as respostas adaptativas das plantas à seca compreendem um caráter multigênico, as plantas podem utilizar mais de um mecanismo de defesa (TURNER, 1986; SUBBARAO et al., 1995; TAIZ e ZEIGER, 2006).

O mecanismo de escape compreende a habilidade de rápido desenvolvimento fenológico, no qual as plantas podem completar o seu ciclo em um curto período de chuva, apresentando capacidade de plasticidade no desenvolvimento (TURNER, 1986,

1997; SUBBARAO et al., 1995). Para garantir um alto conteúdo hídrico as plantas aclimatam-se para minimizar a perda d'água, através do fechamento estomático, primeira linha de defesa, desta forma as plantas podem evitar a dessecação por reduzir a taxa transpiratória (MANSFIELD & ATKINSON, 1990; MAHAJAN & TUTEJA, 2005). O fechamento estomático é mediado pelo ácido abicísico (ABA) que funciona como mensageiro de déficit hídrico no solo entre a raiz e parte aérea mesmo antes da redução do potencial hídrico foliar (SALAH & TARDIEU, 1997; MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

Os mecanismos de tolerância à seca sob baixo potencial hídrico, envolve a capacidade da planta em tolerar a desidratação. O ajuste osmótico é o acúmulo de solutos osmoticamente ativos na célula que permite a manutenção da turgescência celular e crescimento mesmo sob déficit hídrico (TURNER, 1986; KRAMER & BOYER, 1995; HARE & CRESS, 1997; CHAVES; MAROCO; PEREIRA et al., 2003). A perda de turgor causado pelo déficit hídrico nas plantas pode parar o crescimento vegetal, além de afetar diversos processos bioquímicos como a diminuição na síntese de proteínas (HSIAO, 1973). Com o ajustamento osmótico, a planta reduz o seu potencial para extrair água do solo e desta forma, consegue manter seus estômatos abertos para assimilação de CO₂ (TYREE; JARVIS, 1982; BRAY, 1993). Os principais solutos responsáveis para o ajustamento osmóticos são: K, NO₃, Cl, SO₄, malato, aspartato, carboidratos (sacarose, hexoses, manitol) e aminoácidos (prolina, glicina betaína) (HANSON; HITZ, 1982; BARTELS; SUNKAR, 2005).

2.3.1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio e déficit hídrico

A FBN é um processo muito sensível às flutuações ambientais, com o carbono e a necessidade de níveis baixíssimos de oxigênio, os principais aspectos que contribuem para a alta sensibilidade do processo (ARRESE-IGOR et al., 2011). Neste contexto, três principais mecanismos reguladores foram explorados nas últimas décadas: (1) regulação através do fluxo de carbono dentro dos nódulos, através de uma regulação negativa rápida da sacarose sintase (SS) (GONZÁLEZ et al., 1995), (2) regulação de feed-back de nitrogênio (SERRAJ et al., 2001) e (3) uma regulação baseada na interação entre a concentração de oxigênio no nódulo interno e a homeostase das espécies reativas de oxigênio (ROS) (DIAZ et al., et al., 1995). No entanto, ainda é uma questão de debate qual destes (C, O ou N) é responsável pela regulação de FBN ou se eles agem de forma

cooperativa. As interações de nível molecular entre os fatores citados e os possíveis mecanismos de regulação FBN não são totalmente compreendidos. Alguns estudos relatam a regulação local de FBN em diversas leguminosas, incluindo *M. truncatula* e *Glycine max*, sob estresse hídrico (GIL-QUINTANA et al., 2013a; GIL-QUINTANA et al., 2013b; MARINO et al., 2007).

Um estudo de análise proteômica do nódulo em *M. truncatula* e *Glycine max* sob déficit hídrico houve uma diminuição local geral nas proteínas nodulares após 7 dias de privação de água, o metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre foram os processos mais alterados nos nódulos de *M. truncatula* e *Glycine max* submetidos a estresse hídrico. A redução no metabolismo de carbono, gera então, uma diminuição na fonte de energia para a FBN nos nódulos tratados com o déficit hídrico de ambas as leguminosas (GIL-QUINTANA et al., 2015). O papel do metabolismo do carbono na regulação da FBN sob estresse hídrico tem sido revisto em outros estudos (ARRESE-IGOR et al., 1999, 2011). Ainda no proteoma analisado enzimas como sacarose sintase e asparagina sintetase, foram identificadas como sendo as enzimas que apresentam as maiores variações relativas de abundância, além de evidências na regulação da Lipoxigenase que parece ser importante na resposta de nódulos de leguminosas ao estresse hídrico.

2.3.1.3 Impressão e memória de estresse

A habilidade das plantas de ajustar seus mecanismos a um ambiente em constante mudança molda sua aptidão futura e possibilita a sobrevivência na grande diversidade de habitats. As respostas ao estresse das plantas podem ser caracterizadas por uma fase inicial de percepção, na qual os mecanismos para lidar com o estresse são ativados e os processos relacionados ao crescimento diminuem a velocidade. Isso geralmente é seguido por uma fase de resistência, na qual a planta modula sua estrutura e função de forma a permitir que ela suporte o estresse e ajuste qualquer dano já causado. Se o estresse persistir ou se for muito severo, a planta morre; se o estresse diminuir, no entanto, a planta pode se recuperar e atingir um novo status fisiológico ótimo na fase de recuperação. Assim, independente do futuro da planta, o primeiro episódio de estresse deixará uma impressão que afetará sua resposta a tensões subsequentes (FLETA-SORIANO & MUNNÉ-BOSCH, 2016).

O gatilho para a tolerância ao estresse (o evento precoce de estresse moderado) é referido como “*priming*”, também chamado de aclimatização ou endurecimento (*hardening*). O *priming* é conhecido como uma maneira potencial de aumentar a tolerância da planta ao estresse (CHEN & ARORA et al., 2013; BRUCE et al., 2007). É um evento que atua ao nível fenotípico e não introduz alterações na sequência de DNA, sendo, reversível, eventualmente (CONRATH et al., 2015; HILKER et al., 2016), geralmente, tal iniciação é evidenciada por um padrão de resposta mais forte ou mais rápido como pode ser exemplificado pela cinética de ativação modificada da expressão de um gene de defesa (LÄMKE & BÄURLE 2017). Este evento é seguido diretamente por um período de memória de estresse (STIEF et al., 2014). Isso envolve o armazenamento de informações sobre o estímulo de estresse após a cessação do estresse e pode ser detectado como uma resposta modificada ao estímulo de estresse desencadeador (futura exposição ao estresse) quando comparado ao de uma planta ingênua (não preparada para o estresse). A duração dessa memória pode estar na faixa de dias a semanas para a memória de estresse somático (transitória ou passada para uma geração), mas em alguns casos pode se estender à prole (memória de estresse inter ou transgeracional). Uma possível manifestação da memória é uma resposta transcricional modificada (memória transcricional) (D’URSO et al., 2014; LIGHT & BRICKNER 2013), durante o qual o estímulo de iniciação induz mudanças sustentadas na expressão gênica (ativação ou repressão) ou uma resposta transcricional modificada (como a hiperindução) sobre um estímulo secundário (LÄMKE & BÄURLE 2017).

Para cada caso de memória de estresse, a possibilidade de uma base epigenética deve ser confirmada. Por definição, isso requer que o fenômeno seja estável e hereditário (através de divisões celulares), mas independente da mudança na sequência do DNA e, portanto, pelo menos em princípio reversível (LÄMKE & BÄURLE 2017).

2.4 PROTEÔMICA E ABORDAGENS TÉCNICAS

As proteínas estão envolvidas em todas as funções biológicas. A compreensão desses componentes celulares promove uma perspectiva única e global de como essas moléculas interagem e cooperam para criar e manter o funcionamento do sistema biológico. As células respondem a modificações internas e externas por meio da regulação do nível e atividade das suas proteínas. Assim, mudanças no proteoma, tanto quantitativa quanto qualitativamente, promovem uma reação imediata da célula. O

proteoma constitui-se em uma entidade complexa e dinâmica que pode ser definida em termos de sequência, estrutura, abundância, localização, modificação, interação e função bioquímica de seus componentes, necessitando, para tal, de uma diversa gama de tecnologias para ser estudados (CRUZ, 2012).

As informações advindas do genoma possibilitaram um grande progresso no campo das ciências biológicas. Por ser relativamente estável e não apresentar variações no seu código informacional de acordo com o tipo celular ou estímulo hormonal, o genoma não é capaz de exibir informações relativas aos níveis de expressão proteicas em andamento e as modificações pós-transducionais (PTMs) (PAULO et al., 2012; CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; OVERALL, 2014). O transcriptoma nos permite enxergar as partes do genoma que estão sendo expressas em um dado momento, porém ainda não há uma correlação entre o acúmulo de proteínas e o nível de mRNA, justificada por eventos como degradação, splicing alternativo, secreção, formação de complexos e outros (GHAZALPOUR et al., 2011). A análise proteômica nos permite a identificação, a quantificação e avaliação do tipo de PTM sofrida pelas proteínas envolvidas em vários processos, permitindo a descoberta de novos alvos terapêuticos e moléculas bioativas (AVEZUM et al., 2004; CARVALHO, 2006).

A investigação proteômica está focalizada em duas áreas: proteômica estrutural e funcional. O objetivo dos estudos estruturais é avaliar os níveis de inibição e de super expressão, investigando modelos celulares de expressão proteica submetidos a duas ou mais situações fisiológicas diferentes. Essa pesquisa comparativa é usualmente utilizada para identificar proteínas e para relacionar o perfil de expressão do proteoma com alguma situação fisiológica específica (MONTI et al., 2005). Já os estudos em proteômica funcional buscam o monitoramento e a análise das propriedades que envolvem, em nível molecular, as proteínas e seu fluxo nas células.

O crescente número de genomas sequenciados tem gerado um aumento exponencial de sequência de proteínas com funções desconhecidas. No que se refere as investigações moleculares em leguminosas os estudos avançaram em um ritmo exponencial no nível genômico, mas não no nível proteômico. Como nem sempre a sequência genômica é suficiente para elucidar tais funções, é um objetivo das pesquisas em proteômica funcional elucidar as funções fisiológicas e definir os mecanismos de ação em nível molecular. O estudo funcional é complexo, uma vez que existem proteínas que, para se tornarem funcionais, dependem da interação com outros complexos proteicos como as vias de sinalização celular que podem levar à elucidação

de interações proteína-proteína e de redes moleculares (MONTI et al., 2005). As espécies peretencentes à família Fabaceae sequenciadas e disponíveis no NCBI/Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) e proteomas disponíveis no Uniprot/Proteomes (<https://www.uniprot.org/proteome>) estão listadas na tabela 1.

Tabela 2. Espécies da família Fabaceae que apresentam genomas e proteomas disponíveis nos bancos de dados NCBI/Genome e UniProt/Proteomes, respectivamente.

Genomas (NCBI)	Proteomas (UniProt)
<i>Abrus precatorius</i>	-
<i>Arachis duranensis</i>	-
<i>Arachis hypogaea</i>	-
<i>Arachis ipaensis</i>	-
<i>Arachis monticola</i>	-
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Cajanus cajan</i>
<i>Cercis canadensis</i>	-
<i>Chamaecrista fasciculata</i>	-
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Cicer echinospermum</i>	-
<i>Cicer reticulatum</i>	-
<i>Glycine max</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Glycine soja</i>	-
<i>Lotus japonicus</i>	-
<i>Lupinus angustifolius</i>	-
<i>Medicago truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
<i>Mimosa pudica</i>	-
<i>Mucuna pruriens</i>	-
<i>Nissolia schottii</i>	-
-	<i>Phaseolus angularis</i>
<i>Phaseolus coccineus</i>	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Pisum sativum</i>	-
<i>Trifolium medium</i>	-
<i>Trifolium pratense</i>	-
<i>Trifolium subterraneum</i>	-
<i>Vicia faba</i>	-
<i>Vigna angularis</i>	-
<i>Vigna radiata</i>	<i>Vigna radiata</i>
<i>Vigna unguiculata</i>	-

Várias espécies de leguminosas tiveram seu perfil proteômico estudado sob diversos estresses abióticos, a exemplo da ervilha sob seca e frio (TAYLOR et al., 2005; NEILSON et al., 2011); do amendoim, feijão mungo e feijão comum, sob déficit hídrico (KOTTAPALLI et al., 2009; SENGUPTA; KANNAN; REDDY 2011; ZADRAZNIK et al., 2013). Em soja, por exemplo, umas das leguminosas mais

estudadas, foram aplicados estresses como déficit hídrico, calor, ozônio, inundação, salinidade, metais pesados e estresse osmótico (YAMAGUCHI et al., 2010; AHSAN et al., 2010a; AHSAN et al., 2010b; KOMATSU et al., 2010; XU et al., 2011; AHSAN et al., 2012; MOHAMMADI et al., 2012). No entanto, estudos sobre raízes de leguminosas sob o déficit hídrico no nível de proteína são raros, e para *S. scabra* ainda não existe relato até o momento.

De acordo com Rathi et al., (2016) aproximadamente 90% de estudos proteômicos de leguminosas foram realizados através de métodos baseados em gel, especialmente 2DE. Isso destaca o comando do 2DE em proteômica devido à sua capacidade de separação e visualização de centenas de proteínas, capacidade de automação e sensibilidade. As deficiências agudas da 2DE, tais como rendimento relativamente baixo, dificuldade em resolver proteínas de membrana e proteínas de pI extremo, são habitualmente encobertas por métodos livres de gel.

A espectrometria de massa (MS - *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que pode ser utilizada para a determinação da composição elementar ou da estrutura de uma molécula (MARCOTTE, 2007). Os espectrômetros de massa, são úteis na análise tanto de compostos cujo espectro de massa é conhecido como em compostos com a estrutura completamente desconhecida. Para os compostos conhecidos uma busca computadorizada compara o espectro de massas gerado com uma biblioteca de espectros de massa. A coincidência entre os espectros indica a identificação. No caso de compostos desconhecidos a sequência de fragmentações e evidências de outros tipos de espectrometria podem levar a identificação de novos compostos (SILVERSTEIN et al., 2014). Todos os espectrômetros de massa têm métodos de ionização da amostra e separação dos íons na base da relação massa/carga m/z . Após a separação, os íons são detectados e quantificados. O método de impacto de elétrons (EI - *electron impact*) é a técnica mais usada na geração de íons para a MS, onde as moléculas são bombardeadas com elétrons de alta energia, geralmente 70eV (elétron-volt), ainda na fase gasosa. A espectrometria de massas em sequência ou em tandem (MS/MS - *mass spectrometry/mass spectrometry*) seleciona um íon principal da fragmentação inicial e fragmenta-o novamente para gerar íons filhos (SILVERSTEIN et al., 2014).

A cromatografia líquida (LC - *liquid chromatography*) consiste na separação em fase líquida de misturas complexas, entretanto dificilmente consegue fornecer a identificação positiva de componentes individuais e, normalmente, é associada a uma técnica de detecção como a MS, tornando-se uma poderosa ferramenta analítica. A

abordagem de espectrometria de massa em sequência precedida pela cromatografia líquida (LC-MS/MS - *liquid chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry*) prevê que a amostra seja fracionada pela cromatografia líquida e aplicada a dois estágios de espectrometria de massa. As moléculas são ionizadas e suas massas são detectadas, sendo reportadas na forma de espectro, cada pico de um espectro representa a relação m/z de um íon. No primeiro estágio de MS os íons são os peptídeos, tem-se então um único espectro, onde cada pico representa um peptídeo da amostra. No segundo estágio, peptídeos selecionados do primeiro são fragmentados por métodos de dissociação (CANTÚ et al., 2008). Gera-se um espectro por peptídeo, onde os picos representam fragmentos do peptídeo. O passo seguinte é a identificação dos peptídeos baseado no padrão dos picos espectrais.

O Mascot é um dos mecanismos de busca que usa dados de espectrometria de massa para identificar proteínas de bancos de dados de sequências primárias. O Mascot integra todos os métodos comprovados de pesquisa, que podem ser categorizados da seguinte maneira: *Peptide Mass Fingerprint* (Impressão digital de massas peptídicas), em que os únicos dados experimentais são valores de massa peptídica; Consulta de sequência, na qual dados de massa de peptídeo são combinados com sequência de aminoácidos e informações de composição; Pesquisa de íons MS/MS, usando dados não interpretados de MS/MS de um ou mais peptídeos. Entre os bancos de dados que é possível acessar em sua versão pública, está o SwissProt e NCBIprot (MASCOT-Matrix Inc.) (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

2.5 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS

De forma sucinta, a bioinformática é definida como sendo uma área multidisciplinar que engloba diversas áreas como, biologia, matemática, física, tecnologia da informação entre outras disciplinas (SABBATINI, 1999). A concretização da bioinformática e da biologia computacional nos últimos anos tem favorecido aos pesquisadores acesso a um grande número de dados, propiciando abordagens globais e inovadoras no que diz a respeito ao estudo da organização, estrutura e evolução de genomas (BINNECK, 2004; ABBY e DAUBIN, 2007) da predição de função de proteínas, interações e estrutura tridimensional (GINALSKI, 2006; LEE et al., 2007; SKRABANEK et al., 2008).

Focando no armazenamento desses grandes volumes de dados, além de permitir o acesso rápido e de forma eficiente, vários bancos de dados foram sendo criados, tanto de acesso público como privado, além de redes de acesso que admitissem a interação desses grupos (PROSDOCINI et al., 2002). Embora ainda existam muitos bancos de acesso restrito, é notória a tendência que dados gerados sejam disponibilizados e sejam acessíveis a toda comunidade científica, onde alguns bancos já disponibilizam seus dados como o GenBank, do NCBI (National Center for Biotechnology Information) dos EUA, que se destaca como um dos bancos mais consultados, uma vez que inclui aproximadamente 211.281.415 milhões de sequências (NCBI, 2019). O GenBank está integrado com duas organizações, o EMBL (European Molecular Biology Laboratory; Laboratório de Biologia Molecular Europeu) e o DDBJ (DNA DataBank of Japan; Banco de Dados de DNA do Japão), as três trocam dados diariamente. (NCBI, 2019)

O UniProt Knowledgebase (UniProtKB) é o *hub* central para a coleta de informações funcionais sobre proteínas, com anotações precisas, consistentes e ricas. Mais de 95% das sequências de proteínas fornecidas pelo UniProtKB são derivadas da tradução das seqüências de codificação (CDS) que foram submetidas aos bancos de dados de ácido nucléico público, os bancos de dados EMBL-Bank/GenBank/DDBJ (INSDC). Todas essas sequências, assim como os dados relacionados apresentados pelos autores, são automaticamente integrados ao UniProtKB / TrEMBL. Este banco de dados armazena cerca de 559.077 sequências anotadas e revisadas manualmente e 139.694.261 milhões não revisadas. Em relação ao banco de proteomas disponível no UniProt, a partir de genomas completamente sequenciados. Este banco armazena 13.116 proteômas de referência, ou seja, de organismos modelo bem estudado e organismos de interesse para pesquisas biomédica e filogenéticas (The UniProt Consortium, 2019).

Ferramentas computacionais têm contribuído para a compreensão de dados moleculares gerados pelas ômicas. O Blast2GO uma ferramenta que funciona em sistemas operacionais (Windows, Linux e outros), para análise funcional de sequências, utiliza dados do *Gene Ontology* (GO) um projeto com a iniciativa de desenvolver uma representação computacional do conhecimento em evolução sobre como os genes codificam funções biológicas nos níveis de sistemas moleculares, celulares e teciduais. O projeto desenvolveu ontologias formais que representam mais de 40.000 conceitos biológicos, subdividindo-os em três categorias: processo biológico – refere-se à atividade biológica com o qual o gene ou seu produto contribui; função molecular – atividade bioquímica do gene ou produto; componente celular – local na célula onde o

gene ou seu produto é ativo (ASHBURNER 2000; NODA et al., 2010). Ainda no que se refere termos de ontologia o agriGO ferramenta *online* foi projetado para automatizar o trabalho de pesquisadores, facilitando a identificação de termos GO enriquecidos em uma lista de conjuntos de sondas de *microarray* ou identificadores de genes (com ou sem informações de expressão), concentra especialmente espécies agrícolas (TIAN et al., 2017). O MapMan é uma ferramenta útil para fornecer visões globais de diversos aspectos de dados de alto rendimento e pode ser usada para classificar funcionalmente genes (THIMM et al., 2004).

Análises computacionais estão presentes em diversos estudos proteômicos, com o intuito interpretar com clareza dados, como *Zea mays* submetido a salinidade (CUI et al., 2015), *Oryza sativa* e *O. japonica* sob estresse salino (BATISTA et al., 2017), *Triticum aestivum* sob estresse biótico (GARCIA-SECO et al., 2017), porta-exertos de videira sob déficit hídrico (PRINSI et al., 2018).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido a Genetic and Molecular Biology

Identificação e caracterização *in silico* de nodulinas tardias em *Stylosanthes scabra*

Vogel submetida ao déficit hídrico

Sheyla Carla Barbosa da Silva Lima¹, João Pacífico Bezerra Neto¹, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva¹, Ana Maria Benko-Iseppon¹, Valesca Pandolfi¹, Tercilio Calsa Júnior^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil;

Autor para correspondência:

Tercilio Calsa Júnior, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de BioCiências, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Tel. +55 81-2126-7829; Email: terciliojr@yahoo.com.br

Resumo

Assim como o déficit hídrico, a sustentabilidade do solo (nutrientes, erosão e poluição) é um desafio para produtividade de plantas cultivadas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN), proporciona benefícios econômicos como menor aplicação de fertilizantes e sustentabilidade do solo. *Stylosanthes scabra* é uma leguminosa forrageira que apresenta características tolerantes ao déficit hídrico e pode ser utilizada no consórcio de plantas. Este trabalho objetivou identificar e caracterizar computacionalmente nodulinas tardias mais abundantes em *S. scabra*, submetida ao déficit hídrico. Plântulas de *S. scabra* foram submetidas as condições de déficit hídrico pelo período de 6 e 24 horas, as raízes foram coletas e armazenadas em ultrafreezer. As amostras foram submetidas ao sequenciamento pela tecnologia de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500), seguida com montagem das sequências para obtenção do transcriptoma via ferramenta Trinity. A análise *in silico* de nodulinas tardias, revelou 46 superfamílias associadas as 20 sondas utilizadas para mineração. As proteínas mais abundantes, com e-value $^{-10}$ e continham domínio completo estavam em quatro grupos, que apresentaram domínios SWEET (19 candidatos), Nramp (7), Globin (7) e VIT1 (5). A análise de expressão diferencial revelou que alguns candidatos das famílias SWEET e Globin apresentaram diferença em sua expressão. A diferença na expressão não foi observada em todos os transcritos, o que sugere que o estresse por déficit hídrico pode relamente afetar o processo de infecção/nodulação e a fixação biológica do nitrogênio em *S. scabra*.

Palavras-chave: Forrageira. Fixação biológica de nitrogênio. Bioinformática.

Abstract

Like the water deficit, soil sustainability (nutrients, erosion and pollution) is a challenge for the productivity of cultivated plants. Biological nitrogen fixation (FBN) provides economic benefits such as less fertilizer application and soil sustainability. *Stylosanthes scabra* is a forage legume that has characteristics tolerant to water deficit and can be used in the consortium of plants. This work aimed to identify and computationally characterize the most abundant late nodulins in *S. scabra*, submitted to water deficit. Seedlings of *S. scabra* were submitted to water deficit conditions for 6 and 24 hours, the roots were collected and stored in an ultra-freezer. The samples were submitted to sequencing by RNA-Seq technology (Illumina HiSeq2500), followed by assembly of the sequences to obtain the transcriptome using the Trinity tool. The in silico analysis of late nodulins revealed 46 superfamilies associated with the 20 probes used for mining. The most abundant proteins, with e-value $< 10^{-10}$ and containing complete domain were in four groups, which presented SWEET domains (19 candidates), Nramp (7), Globin (7) and VIT1 (5). Differential expression analysis revealed that some candidates from the SWEET and Globin families showed differences in their expression. The difference in expression was not observed in all transits, which suggests that stress due to water deficit may actually affect the infection / nodulation process and biological nitrogen fixation in *S. scabra*.

Keyword: Forage. Biological nitrogen fixation. Bioinformatics.

1 Introdução

As leguminosas cultiváveis apresentam importância não só para alimentação humana e agropecuária por ser fonte de proteínas, mas exercem um papel expressivo na sustentabilidade e produtividade dos sistemas de cultivo (Siddique *et al.*, 2012). Elas contribuem para a diversidade de sistemas de cultivo quando cultivados com culturas de outras famílias de plantas, interrompendo os ciclos de pragas e doenças que se desenvolvem com o cultivo contínuo de uma espécie (Foyer *et al.*, 2016; Kermah *et al.*, 2017).

O estresse nas plantas pode ocasionar uma redução no crescimento e desenvolvimento que pode ser o resultado da homeostase metabólica interrompida, que requer o reajuste temporal de várias vias metabólicas (Shulaev *et al.*, 2008). Sob estresse abiótico, é uma tendência geral que o crescimento e o rendimento das culturas sejam reduzidos abaixo dos níveis ótimos (Cramer *et al.*, 2011), entre os estresses abióticos está a seca, que pode limitar a produtividade de plantas cultivadas em todo o mundo. Além disso, no cenário atual da mudança climática global, existem possibilidades de secas de longa duração em todo o mundo no futuro próximo (Overpeck e Cole 2006; Hashiguchi *et al.*, 2010). Cramer e colaboradores 2011, ainda prevêem que cerca de 90 % de área plantada, em algum momento durante o período de crescimento de culturas, será afetada por fatores de estresses abióticos. Além das condições ambientais estressantes, a sustentabilidade do solo é um desafio sob a influência complexa de vários fenômenos, como perda de nutrientes, erosão do solo e poluição agrícola (Zentner *et al.*, 2004). A associação entre leguminosas e rizóbios é o sistema de fixação de nitrogênio mais promissor, proporcionando benefícios econômicos em termos de menor aplicação de fertilizantes e sustentabilidade do solo (Crews e Peoples 2004; Kumar *et al.*, 2013, 2014; Bhagat *et al.*, 2014)

No estágio inicial, o fator nod (FN) liberado do rizóbio desencadeia a desdiferenciação e divisão das células corticais da raiz. Ao mesmo tempo, o rizóbio invade as raízes, o que é facilitado pelos filamentos de infecção, que são estruturas tubulares formadas pela invaginação da parede celular e da membrana plasmática. Os filamentos/cordões de infecção se ramificam e liberam rizóbio nas células corticais por endocitose (Li *et al.*, 2018). Os rizóbios liberados são cercados pela membrana simbiossômica vegetal chamada também de membrana peribacterioide. A partir deste estágio são chamados de bacterioides, onde param de se multiplicar e efetuam a fixação

de N₂. Durante a FBN, o N₂ atmosférico é convertido em amônia, que é catalisada pelo complexo nitrogenase (Oldroyd *et al.*, 2011; Udvardi e Poole, 2013). Na simbiose, o complexo nitrogenase é anaeróbico e sensível ao oxigênio (Ott *et al.*, 2005), o que torna a FBN um processo microaerofílico. No entanto, uma grande quantidade de oxigênio é essencial para a respiração e metabolismo energético dos nódulos e plantas (Li *et al.*, 2018). As leguminosas desenvolveram três estratégias para resolver essa contradição entre o FBN e o crescimento das plantas: uma barreira gasosa que inibe o influxo de oxigênio no tecido central infectado (Minchin, 1997); altas taxas respiratórias de bacteroides e rápido consumo de oxigênio. Por meio dessas três estratégias, as leguminosas garantem a FBN, o desenvolvimento do simbiote e o desenvolvimento da planta ocorram sem problemas (Li *et al.*, 2018). Na tentativa de compreender melhor a FBN em *Stylosanthes scabra*, este trabalho tem o objetivo de identificar e caracterizar computacionalmente nodulinas tardias mais abundantes em *S. scabra*, submetida ao déficit hídrico.

2 Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido com indivíduos de *S. scabra* propagados por estaquia, utilizando-se como matriz o acesso 85/UNEB, proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia, e conduzido na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. O enraizamento das estacas de aproximadamente 10 cm de comprimento foi induzido com a aplicação da auxina ácido indolbutírico (IBA) a 1.000 ppm diluído em talco mineral. O material foi colocado em sacos plásticos (15 x 8 cm) contendo substrato composto por argissolo e vermiculita (3:1), mantidos em telado com 50% de sombreamento e irrigação uma vez ao dia. Nessas condições, obteve-se taxa de enraizamento das estacas de aproximadamente 90%. As plantas foram posteriormente transferidas para vasos plásticos (capacidade 10 L), sendo cultivadas em substrato composto por areia, argissolo, vermiculita, mantidos em casa-de-vegetação.

2.2 Desenho experimental, imposição do estresse e coleta do material

Após quatro meses de cultivo, as plantas foram categorizadas em dois tratamentos: controle (irrigado) (rega 500 mL às 9:00 h) e o déficit hídrico (DH) (suspensão de rega). As plantas de um dos tratamentos receberam irrigação durante todo o experimento, ao passo que as plantas do outro tratamento foram submetidas ao déficit hídrico (DH), por um período de 6 h e outro de 24 h, cada um com seu respectivo controle. Para cada tratamento nove réplicas biológicas foram coletadas, totalizando 27 plantas por tratamento. Tecidos da parte aérea e radicular foram coletados separadamente, congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

2.3 Sequenciamento e montagem do banco transcriptômico

As amostras para os tempos 6 e 24 h com os tratamentos irrigado e déficit hídrico foram submetidos ao sequenciamento pela tecnologia de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500), seguida com montagem das sequências para obtenção do transcriptoma da espécie via ferramenta Trinity (Grabherr *et al.*, 2011), seguindo o protocolo de Haas e colaboradores (2013). O acesso ao banco gerado é restrito aos pesquisadores do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal/UFPE (dados não publicados).

2.4 Mineração de dados

Inicialmente uma busca foi realizada na literatura por nodulinas tardias de diferentes famílias, após esta etapa, uma busca foi realizada por nome da proteína no banco de dados Uniprot. As sequências foram selecionadas a partir de diversas espécies de leguminosas e que apresentavam curadoria, assim, um banco local foi criado abrangendo várias famílias de nodulinas de diferentes leguminosas. O transcriptoma de *Stylosanthes scabra* foi inserido no programa Bioedit (Hall, 1999) onde foi realizada uma busca utilizando a ferramenta tBLASTn, com o intuito de obter candidatos à nodulinas pertencentes a *S. scabra*. O ponto de corte utilizado foi o -10 e o *output* em formato de tabular, foi tratado e a redundância retirada, após esta etapa, as sequências dos candidatos foram recuperadas com a ferramenta *online* Galaxy e traduzidas com o programa TransDecoder (Haas, 2016). As sequências candidatas foram submetidas a ferramenta *online* Batch (Marchler-Bauer, 2015) para análise da presença e integridade

do domínio conservado, as que apresentaram domínio incompleto não seguiram para próximas etapas.

2.5 Análise e caracterização *in silico*

2.5.1 Análises de bioinformática

Os candidatos foram submetidos a diversas ferramentas para caracterização *in silico*, o primeiro passo foi o confronto com sequências disponíveis no banco de dados do GenBank/ NCBI, utilizando o algoritmo BLASTx para análise de similaridade das sequências com possíveis homólogos depositados. Em seguida, a análise no Fgenesh foi realizada para predição de éxons e seu intervalo. Para confirmação do domínio, as sequências foram submetidas à ferramenta *online* “Smart” (Letunic *et al.*, 2015), logo após esta etapa, a ferramenta SignalP Server (Petersen *et al.*, 2011) foi utilizada para identificação do peptídeo sinal.

Adicionalmente, as sequências foram submetidas ao Blast2GO Basic (Conesa *et al.*, 2005) para mapeamento de termos de GO, com os seguintes parâmetros: bancos de dados SwissProt (Viridiplantae) e *p-value*⁽⁻¹⁰⁾. Para enriquecimento dos termos GO foi utilizada a ferramenta *online* AgriGO (Tian *et al.*, 2017), aplicado os parâmetros padrões da ferramenta, com *background* de *Medicago truncatula*. Em seguida, procedeu-se a uma análise da expressão diferencial destes candidatos à nodulinas, o parâmetro estatístico foi valores de *Fold change* > 1,5, *p-value* e FDR <0.05. A partir destes parâmetros os transcritos com diferença em sua expressão foram selecionados para desenho de *primers* e posterior validação.

3 Resultados

Após busca na literatura em banco de dados, foram selecionas 20 sondas de diferentes famílias de nodulinas anexo 1, estas, foram utilizadas para busca em *S. scabra* e foram reportados 5.744 alinhamentos com nodulinas tardias, após retirada de redundância restaram 908 e após análise no Batch, 187 apresentaram domínio completo. Os candidatos foram classificados em 46 superfamílias figura 1, onde algumas chegaram a apresentar 20 representantes. Em seguida estas superfamílias foram agrupadas de acordo com a sonda a qual foram corresponde e quatro grupos foram escolhidas para seguir com as análises, essa escolha foi a partir das superfamílias que

apresentavam mais candidatos. O grupo que apresentou mais candidatos, foi a superfamília PQ-loop (grupo I), seguida da superfamília SLC5-6-like e Nramp (grupo II). O grupo III, apresentou candidatos da superfamília Globin_like e por último o grupo IV, incluiu a superfamília CCC1_like.

A superfamília PQ-loop agrupa proteínas transmembranas e que apresentam domínio com repetições de prolina e glutamina, esse domínio também é referido como MtN3/saliva, que compõem as proteínas transportadoras de açúcar bidirecional N3, assim como as proteínas transportadoras de açúcar (SWEET).

A predição do gene realizada via Fgenesh (HMM-based gene structure prediction) permitiu observar que os genes apresentavam de 408-945 pb, codificando proteínas com a variação de 135-314 aminoácidos (anexo 4). Quando os transcritos traduzidos foram submetidos ao SMART, conseguimos observar os domínios e seus intervalos, com exceção de dois transcritos, todos os outros apresentaram dois domínios cada um com aproximadamente 85 aminoácidos. Um dos transcritos que entraram na exceção apresentou apenas um domínio, acredita-se que por conta de seu tamanho (408 pb) (anexo 4).

Candidatos do grupo II, da superfamília SLC5-6-like, exibem domínio de ligação ao soluto de proteínas SLC5 (também chamados de sódio / co-transportadores de glicose ou de soluto simportadores de sódio). Os SLC5s co-transportam Na^+ com açúcares, aminoácidos, íons inorgânicos ou vitaminas (NCBI/CDD). A superfamília Nramp é uma família de proteínas de macrófagos associados à resistência natural, são proteínas de membrana e transportadora de cátions divalentes.

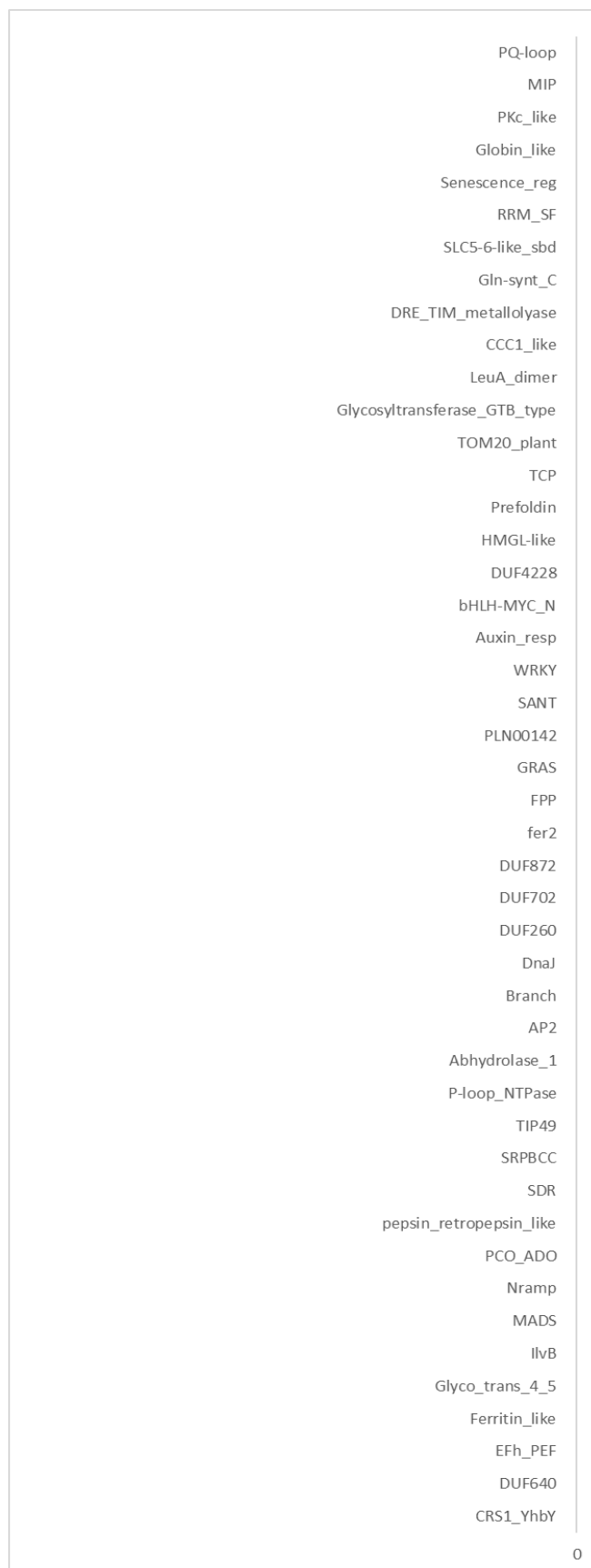


Figura 1. Superfamílias encontradas em *Styosanthus scabra* submetida ao déficit hídrico, a partir de sondas de nodulinas tardias.

O BLASTx (anexo 3) no banco GenBank/NCBI reportou que os candidatos deste grupo apresentam similaridade com proteínas transportadoras de metal divalente 1, transportadora de metal Nramp 2, 3 e 6, todas pertencentes ao gênero *Arachis*. Quando os transcritos traduzidos foram submetidos ao SMART, conseguimos observar os domínios e seus intervalos, cada um com aproximadamente 503-559 aminoácidos. No Fgenesh foi possível observar a estrutura gênica, os candidatos apresentam tamanho de éxon que variou de 1640-1679 pb.

A superfamília Globin_like, esta, presente nos candidatos do grupo III, após confronto com o banco GenBank/NCBI, foi observado similaridade dos candidatos com proteínas semelhantes a hemoglobina não leguminosa e hemoglobina não simbiótica, todas similares com *Arachis*. As análises realizadas no SMART confirmaram computacionalmente o domínio dos candidatos e a análise da estrutura do gene, revelou tamanho da proteína com variancia de 151-163 aminoácidos.

O grupo IV, apresentou candidatos da superfamília semelhante CCC1 (*Ca²⁺-sensitive cross-complementer 1*). Como resultado do confronto com o banco GenBank/NCBI, foi visto similaridades destes candidatos com proteína semelhante ao homólogo transportador vacuolar de ferro. Na análise com a ferramenta SMART, foi possível detectar para todos os candidatos o domínio característico, o que corrobora com estudo de Gollhofer colaboradores 2011, onde houve semelhança das sequências caracterizadas com proteínas VIT1. Em análise estrutural através do Fgenesh foi observado éxon codificando proteínas que variam de 225-231 aminoácidos.

O enriquecimento de termos GO para função molecular revelou que 31 candidatos estão envolvidos na atividade transportadora transmembranar específica do substrato, para componente celular o termo mais enriquecido foi integral para membrana, organela delimitada por membrana intracelular. Em relação aos termos mais enriquecidos para processo biológico se destacaram homeostase cátion e transporte de íon de metal de transição.

A análise de expressão diferencial revelou que alguns candidatos das famílias SWEET e Globin apresentaram diferença em sua expressão, onde os candidatos da família Globin foram regulados positivamente após 24 h de déficit hídrico, enquanto que para 6 h não houve expressão significativa. Esse resultado pode sugerir que

atividade da hemoglobina não leguminosa esteja relacionada ao mecanismo de resposta ao déficit hídrico.

Os candidatos da família SWEET (DN132233_c1_g1_i6) e (DN110077_c0_g1_i2), tiveram a expressão regulada negativamente sob déficit hídrico após 24 h, enquanto que para 6 h não houve diferença significativa na expressão. Já o DN119458_c0_g1_i1 foi regulado positivamente 6 e 24 h, tendo maior expressão após 24 h de déficit hídrico.

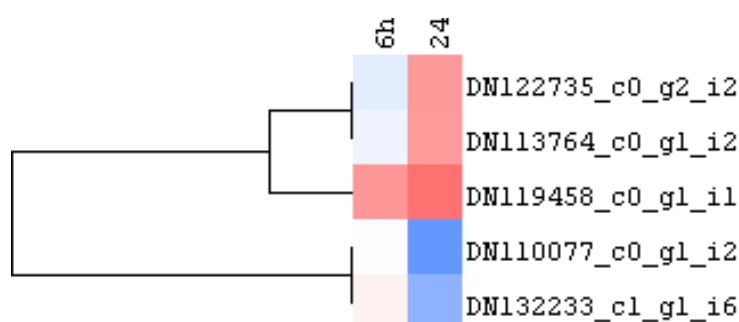


Figura 2. Mapa com expressão diferencial dos transcritos que apresentaram *Fold change* > 1,5, *p-value* e FDR < 0.05.

4 Discussão

A partir do confronto com banco de dados do GenBank/ NCBI, observamos a similaridade com proteínas transportadoras de açúcar de diferentes classes, anexo 3, todas pertencentes ao gênero *Arachis*, gênero filogeneticamente mais próximo de *S. scabra*. A N3, foi primeiro observada em *M. truncatula* por Gamas *et al.*, em 1996, onde relatou o envolvimento na nodulação. Já SWEET foram observadas as classes 1, 2, 3, 4, 10, 12, 14 e 17, as classes 1, 2, 3, 4 e 14 foram relatadas com altas expressões em diferentes estágios do desenvolvimento em arroz, indicando suposto papel no desenvolvimento reprodutivo (Wang *et al.*, 2010). Ainda, as classes 2 e 4 incluindo as 10 e 12 foram relatadas em *Arabidopsis* e se mostraram induzidas por *Pseudomonas syringae*, o que pode indicar influência deste microorganismo na expressão dos genes codificantes destas proteínas (Chen *et al.*, 2010). A classe 17 foi descrita como regulada positivamente pelo fungo *Botrytis cinerea* em *Arabidopsis* por Ferrari *et al.*, 2007. A predição do gene realizada via Fgenesh permitiu observar que os genes apresentavam de 408-945 pb, codificando proteínas com a variação de 135-314 aminoácidos corroborando com proteínas SWEETs encontradas em soja, 52 proteínas desta família

foram mapeadas e o tamanho destas variou de 160-316 aa (Patil *et al.*, 2015). Para os dados observados no SMART, conseguimos observar os domínios e seus intervalos. Como relatado o domínio MtN3_slv tem função no transporte de açúcar, enquanto o PQ-loop está envolvido no transporte de aminoácidos (Xuan *et al.*, 2013).

Os candidatos do grupo II a partir do BLASTx apresentaram similaridade com proteínas transportadoras de metal divalente 1 e transportadora de metal Nramp. As proteínas Nramp transportam uma ampla gama de metais e podem transportar Mn^{2+} , bem como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Al^{3+} (Nevo e Nelson, 2006; Xia *et al.*, 2010). O DMT 1 anteriormente conhecido como Nramp2, foi identificado como homólogo ao Nramp1, onde estava envolvido na defesa do hospedeiro, ambas proteínas apresentam características estruturais similares, sabe-se que DMT1 é um transportador de metal e Nramp tem função semelhante (Grunheid *et al.*, 1995; Gunshin *et al.*, 1997; Andrews 1999). Um homólogo de Dmt1/Nramp em soja mostrou expressão em nódulos radiculares em desenvolvimento e apresentou capacidade para transporte de ferro (Kaiser *et al.*, 2003). Um homólogo de Nramp3 em *Arabidopsis* foi observado no envolvimento deste no transporte de Manganês (Mn), quando este é inibido existe um acúmulo de Mn nas raízes das plantas, enquanto que quando há expressão do gene, esse acúmulo é diminuído (Thomine *et al.*, 2003). O Nramp6 tem função no transporte de ferro e manganês, foi observado que esta proteína quando inibida o arroz torna-se resistente ao fungo *Magnaporthe oryzae*, sugerindo que esta, regulada negativamente a imunidade desta cultura. O arroz ainda se mostrou com biomassa reduzindo, o que indica papel do Nramp6 no crescimento das plantas (Peris-peris *et al.*, 2017), o que pode indicar seu importante papel para desenvolvimento e crescimento também de *S. scabra*. O domínio apresentado na ferramenta SMART esta em consonância com resultados apresentados por Peris-peris *et al.*, 2017 que relatam 550 aminoácidos em sequências de Nramp6 em arroz.

A superfamília Globin_like, esta, presente nos candidatos do grupo III, contém domínios semelhantes a globina, as globinas são proteínas contendo grupo heme, envolvidas na ligação e/ou transporte de oxigênio (Nardini *et al.*, 2008). Após confronto com o banco GenBank/NCBI, foi observado similaridade dos candidatos com proteínas semelhantes a hemoglobina não leguminosa e hemoglobina não simbiótica. Durante muito tempo, a única molécula conhecida como hemoglobina (Hb) nas plantas foi a leghemoglobina (Lb), uma proteína induzida como resultado da associação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Uma hemoglobina foi

descoberta em nódulos radiculares da planta não leguminosa *Parasponia andersonii*, o que sugeriu que tais hemoglobinas são amplamente encontradas nas plantas e podem desempenhar papéis semelhantes a leghemoglobina, pelo tamponamento de oxigênio e transporte durante a fixação de nitrogênio simbiótico. (Appleby *et al.*, 1983; Bogusz *et al.*, 1988). Em 1996 foi observado em soja por Anderson e colaboradores, alguns genes de hemoglobina não simbiótica que apresentaram expressão em caules jovens, folhas maduras, cotilédones, raízes e rebentos. Neste estudo o padrão deste gene indicou que possivelmente, estes, desempenham uma função mais generalizada nas plantas, como facilitar a difusão de oxigênio para as células que respiram rapidamente. Atualmente estas nsHbs obtiveram nova nomenclatura, são chamadas de fitoglobinas (*Phytoglobin-Pgb*) e são fortemente influenciadas pelo estresse ambiental (Hill 2012; Hill *et al.*, 2016). Em estudo realizado com as espécies de *Arabidopsis* e arroz, foi observado que algumas Pgbs foram altamente reguladas em resposta ao estresse por seca, frio e sal, onde também notou-se alterações na superóxido dismutase (Narsai *et al.*, 2010). Segundo Hill, 2012 é provável que as Pgbs existem apenas em estado oxigenado sob condições fisiológicas, a Pgb oxigenada reage rapidamente com o NO (óxido de nitrato), o que pode ser uma das principais funções das Pgbs nas plantas. Quando a expressão de Pgb é inibida, o NO acumula, o que induz a produção de ROS (Huang *et al.*, 2014). Montilla-Bascón *et al.*, 2017 ainda relatam que o gene da hemoglobina não simbiótica de *Hordeum vulgare* (HvHb1), foi superexpressado em cevada transgênica submetida à seca e foi observado que HvHb1 oxida o NO ao NO₃ – (nitrato), essa redução na produção de NO foi associada a tolerância à seca em cevada transgênica.

Os candidatos da superfamília semelhante CCC1, este domínio está presente em proteínas transportadoras de ferro/manganês que medeia o acúmulo desses metais no vacúolo de leveduras (Li *et al.*, 2001). Após resultado do confronto contra o banco GenBank/NCBI, foi visto similaridades destes candidatos com proteína semelhante ao homólogo transportador vacuolar de ferro 4. Kim e colaboradores 2006, caracterizaram o ortólogo de CCC1 em *Arabidopsis thaliana* VIT1 (*vacuolar iron transporter 1*), onde VIT1 foi similar a CCC1, quanto sequência de aminoácidos, ainda neste estudo Kim fornece uma prova funcional de que o VIT1 medeia o sequestro de ferro em vacúolos. Em busca de informações sobre homólogo transportador vacuolar de ferro 4, utilizamos a ferramenta BLAST disponível no Uniprot para confronto contra UniProtKB e observamos similaridade dos candidatos com homólogo transportador vacuolar de ferro 4 em *A. thaliana*. Na análise de domínio foi possível detectar para todos os candidatos o

domínio VIT1, o que corrobora com estudo de Gollhofer colaboradores 2011, onde houve semelhança das sequências caracterizadas com proteínas VIT1.

No enriquecimento de termos GO para função molecular o termo “atividade transportadora transmembranar específica do substrato” foi o mais enriquecido, o que permite a transferência de geralmente uma substância específica ou um grupo de substâncias relacionadas. Em componente celular o termo mais enriquecido foi “integral para membrana”, que consiste nos produtos gênicos e complexos proteicos tendo pelo menos alguma parte da sua sequência peptídica embebida na região hidrofóbica da membrana. Outro termo foi “organela delimitada por membrana intracelular”, entre as organelas podem estar núcleo, mitocôndrias, plastídios, vacúolos e vesículas, excluindo a membrana plasmática. Para processo biológico se destacaram “homeostase cátion” e “transporte de íon de metal de transição”, esse termo se refere ao movimento dirigido de íons de metais de transição para dentro ou fora de uma célula, ou entre células, por meio de algum agente, como um transportador ou poro. Metais de transição biologicamente relevantes incluem vanádio, manganês, ferro, cobre, cobalto, níquel, molibdênio e prata (http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology).

A expressão diferencial dos candidatos da família Globin ocorreu após 24 h após o déficit hídrico. Esse resultado pode sugerir que atividade da hemoglobina não leguminosa esteja relacionada ao mecanismo de resposta ao déficit hídrico. Estudo recente relata que o estresse por seca pode inibir a fixação biológica de nitrogênio, com o intuito de resgatar a produtividade das leguminosas (Li *et al.*, 2018), mas de acordo com Adams *et al.*, 2016 plantas nodulantes, que possuem maior N por área foliar, possuem maior eficiência no uso da água do que as plantas não-nodulantes. Além de se recuperarem do estresse hídrico com muito mais facilidade do que uma planta não nodulada (Staudinger *et al.*, 2016).

Os candidatos da família SWEET pertencentes à classe 1 e 4 apresentam diferença em sua expressão em 24 h, mas essa regulação foi negativa, enquanto um candidato ainda desta família mostrou expressão diferencial nos dois tempos. Estudos indicam o papel de SWEET na manutenção da homeostase do açúcar nos órgãos da planta durante condições de crescimento favoráveis e desfavoráveis, podendo desempenhar um papel na tolerância ao estresse osmótico (Chandran 2015; Seo *et al.*, 2011). Os simbiossiontes das raízes também podem ter como alvo os genes SWEET, podendo ser induzidos por microorganismos, eles estabelecem locais de interação

altamente especializados e localizados de troca sustentada de nutrientes (Chandran 2015).

5 Conclusão

A partir da mineração realizada foi observado que *Stylosanthes scabra* submetida ao déficit hídrico apresenta possíveis representantes de nodulinas tardias que estão em envolvidos em diversas etapas do processo de infecção, assim como, representante que apresentam funções no crescimento e desenvolvimento. A diferença na expressão não foi observada em todos os transcritos, o que sugere que o estresse por déficit hídrico pode relamente afetar o processo de infecção/nodulação e a fixação biológica do nitrogênio em *S. scabra*. As possíveis nodulinas que apresentaram expressão diferencial podem estar envolvidas nos mecanismos de resposta ao déficit hídrico, seja como transdução de sinal ou limitando a troca de nutrientes com os simbiontes para reservar, com o intuito de utilizar para alguma ação ou processo na resposta ao estresse.

6 Referências

- Adams MA, Turnbull TL, Sprent JI, Buchmann N (2016) Legumes are different: leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency. 113 4098–4103.
- Anderson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1996) A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 5682-5687.
- Andrews NC (1999). The iron transporter DMT1.
- Appleby CA, Tjepkema JD, Trinick MJ (1983) Hemoglobin in a nonleguminous plant, *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. Science, 220, 951-953.
- Bhagat PK, Dash D, Raj A, Jhariya MK (2014) Effect of rhizobium inoculation on growth and biomass accumulation in *Leucaena leucocephala*. Ecoscan (Spec Issues Published Elsevier) V:65–74
- Bogusz D, Appleby C., Landsmann J, Dennis ES, Trinick MJ, Peacock WJ (1988) Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. Nature, 331, 178-180.

- Chandran, D (2015) Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *IUBMB life*, 67, 461-471.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S et al (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468, 527.
- Conesa S, Götz JM, Garcia-Gomez J, Terol M, Talon M, (2005) "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research", *Bioinformatics*, 21,3674-3676.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzoti, M. et al. (2011) Effect of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11, 163.
- Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ* 102:279–297
- Ferrari R, Galletti C, Denoux G, De Lorenzo FM (2007) Ausubel, J Dewdney Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3 *Plant Physiol*, 144, 367-379.
- Foyer CH, Lam H-M, Nguyen HT et al. (2106) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants* 2:16112.
- Gamas P, de Carvalho Niebel F, Lescure N, Cullimore JV (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9, 233-242.
- Gollhofer J, Schläwicke C, Jungnick N, et al (2011) Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry*, 49, 557-564.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ et al (2011) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29, 644.
- Grunheid SM, Cellier S, Vidal P (1995) Gros, Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 25,514±525.
- Gunshin H, et al. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641):482–488.
- Haas BJ and Papanicolaou A (2016) TransDecoder (find coding regions within transcripts).

- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M. et al (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8, 1494.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd. c1979-c2000..
- Hashiguchi A, Ahsan N, Komatsu S (2010) Proteomics application of crops in the context of climate changes. *Food Res Int* 43:1803–1813.
- Hill R, Hargrove M, Arredondo-Peter R. 2016. Phytoglobin: a novel nomenclature for plant globins accepted by the globin community at the 2014 XVIII conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins. F1000Research
- Hill RD (2012) Non-symbiotic haemoglobins – what’s happening beyond nitric oxide scavenging? *AoB Plants* pls004.
- Huang S, Hill RD, Wally OS, Dionisio G, Ayele BT, Jami SK, Stasolla C (2014) Hemoglobin control of cell survival/death decision regulates in vitro plant embryogenesis. *Plant Physiol* 165: 810–825
- Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson, R et al (2003) The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal*, 35, 295-304.
- Kermah M, Franke AC, Adjei-Nsiah S, Ahiabor BDK, Abaidoo RC, Giller KE (2017) Maize-grain legume intercropping for enhanced resource use efficiency and crop productivity in the Guinea savanna of northern Ghana. *Field Crops Res* 213:38-50.
- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L et al (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314, 1295-1298.
- Kumar A, Dash D, Jhariya MK (2013) Impact of *Rhizobium* on growth, biomass accumulation and nodulation in *Dalbergia sissoo* seedlings. *Bioscan* 8(2):553–560
- Kumar A, Dash D, Jhariya MK (2014) Influence of *Rhizobium* inoculation on N, P and K content in *Dalbergia sissoo* Roxb. *Ecol Environ Conserv* 20(3):1059–1065
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2014). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research*, 43(D1), D257-D260.

- Li L, Chen OS, Ward DM, Kaplan J (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry*.
- Li X, Feng H, Wen J, Dong J, Wang T (2018) MtCAS31 aids symbiotic nitrogen fixation by protecting the leghemoglobin MtLb120-1 under drought stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in plant science*, 9.
- Marchler-Bauer A et al. (2015) "*CDD: NCBI's conserved domain database*.", *Nucleic Acids Res.*43(D)222-6.
- Minchin FR (1997) Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 5-6, 881-888.
- Montilla-Bascón G, Rubiales D, Hebelstrup KH, et al (2017) Reduced nitric oxide levels during drought stress promote drought tolerance in barley and is associated with elevated polyamine biosynthesis. *Scientific reports*, 7, 13311.
- Nardini M, Pesce A, Thijs L, Saito JA, Dewilde S, et al (2008) Archaeal protoglobin structure indicates new ligand diffusion paths and modulation of haem-reactivity. *EMBO Rep.* 9, 157–163.
- Narsai R, Castleden I, Whelan J (2010) Common and distinct organ and stress responsive transcriptomic patterns in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 10, 262
- Nevo Y and Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 609–620.
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole OS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*, 45, 119-144.
- Ott T, et al. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology* 15, 6, 531-535.
- Overpeck JT, Cole JE (2006) Abrupt change in earth's climate system. *Annu Rev Environ Res* 31:1–31.
- Patil G, Valliyodan B, Deshmukh R, et al (2015) Soybean (*Glycine max*) SWEET gene family: insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis. *BMC genomics*, 16, 520.
- Peris-Peris C, Serra-Cardona A, Sánchez-Sanuy F et al (2017) Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in Rice. *Molecular plant-microbe interactions*, 30, 385-398.

- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8, 785.
- Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SGe, Park CM (2011) Uma proteína SAG29 associada à senescência de *Arabidopsis* SAG29 regula a viabilidade celular sob alta salinidade. *Planta* 233, 189 – 200.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* 132, 199–208.
- Siddique KHM, Johansen C, Turner NC, Jeuffroy M-H, Hashem A, Sakar D, Gan Y, Alghamdi SS (2012) Innovations in agronomy for food legumes. A review. *Agron Sustain Dev* 32:45-64.
- Staudinger C, Mehmeti-Tershani V, Gil-Quintana E, Gonzalez EM, Hofhansl F, Bachmann G., et al. (2016) Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. 136 202–213.
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* 34, 685–695.
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, et al (2017) agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research*, 45(W1), W122-W129.
- Udvardi M, Poole P (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology* 64, 781-805.
- Wang L, Xie W, Chen Y, Tang W, et al (2010) A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *The Plant Journal*, 61,752-766.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18381–18385
- Xuan YH, Hu YB, Chen L-Q, Sosso D, Ducat DC, Hou B-H, et al. (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(39):E3685–94
- Zentner RP, Campbell CA, Biederebeck VO, Selles F, Lemke R, Jefferson PG, Gan Y (2004) Long-term assessment of management of an annual legume green manure crop for fallow replacement in the brown soil zone. *Can J Plant Sci* 83:475–482

Recurso da internet

Galaxy, <https://usegalaxy.org/> (24 de outubro de 2019)

Fgenesh, <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind> (16 de outubro de 2018).

Banco de dados Tair, <https://www.arabidopsis.org> (3 de janeiro de 2019)

Gene ontology Browser, http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology (7 de janeiro de 2019)

Anexo 1. Nodulinas tardias utilizadas como sondas para mineração em *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico.

Acesso	Descrição	Organismo	Sequência proteica
AEP81324.1	Divalent metal transporter 1	<i>Arachis hypogaea</i>	MPPQQPLLEPEEDTAYDSSEKVVVAVGVEDEYGGDDVEAPPFSWKKLWLF TGPG FLMSIAFLDPGNLEGDLQSGAIAGYSLWLLMWATLMGLLIQLLSARLGVATGRHL AELCREEYPPWARIVLWLMTELALIGSDIQEVIGSAIAIRILSNGFVPLWAGVVITAL DCFIFLFLENYGVRKLEAFFAVLIGIMALSFAWMFGEAKPNGVDVLLGVLVPKLSS RTIKQAVGVVGCIMPHNVFLHSALVQSRQIDQSKKGRVQEALNYYSIESTLALAV SFIINIFVTTVFAKGFYGT EIA DSI GLVNAGTYLQEKYGGGLFPILYIWGIGLLAAGQS STITGTYAGQFIMGGFLNLRLLKKWVRALITRCCAIPTMIVALIFDTSEESLDILNEWL NVLQSVQIPFALIPLLCLVSKEQIMGTFRIGPVLKIFSWLVAALVIVINGYLLLDFFSSE VNGAVFAVVVCALTAAYVAFVIYLIARAVSFSPWQSLDRSKATSTEN
P23233	Nodulin-16	<i>Glycine max</i>	MGSKMAIVIVALFAMLLFISPEVACRNFK EELGEVVKETNEESDARLAGSSGGDL D KSYCPVHLPLMEYRKWIGNCRCGCCQWTTEPEVCLYCCPESHVPDLPSRPRAY
NP_001237749. 1	Probable 2-isopropylmalate synthase	<i>Glycine max</i>	MPTKTSTPSSQSPKLSHLRPQYIPN HIPDSSYVRILD TT LRDGEQSPGATMTAKEKLDI ARQLVKLGVDIIQPGFPSASNSDFMAVKMIAQEVGNAVDDDGYPVPIAGFCRCVE KDISTAW EAVKYAKRPRLCTSIATSPIHMEHKL RSKDQVIQIARDMVKFARSLGCN DIQFGAEDATRS DREFLYEILGVVIEAGATTVNIADTVGIVMPLELGKLIVDIKDNTPG IANVIISTHCHNDLGLATANTIEGARTGARQLEVTINGIGERAGNASLEEVVMALASK GDHALNGLYTRINTRHILETSKMVEEYSGMHLQPHKPLVGANAFVHASGIIHQDGM LK HKGTYETISPEEIGHKRTTRIGIVLGKLSGSQALRKRL EELGYDLKEDEVDSVFVWFKA MAEKKKVVTDV DLKALVSYKAFHAESIWKLGDLQVTCGTIGLSTATVKLVNIDGSTHV ACSIGIGAVDSTYKAINLIVKEPTKLLDYSLSNVTEGIGVNVTARVVICRENNHTSTYAF TEDANYPTFSGIAAEMDVVVSTVKAYLVALNKLLRWKESFRCA

Q43785	Glutamine synthetase nodule isozyme	<i>Medicago sativa</i>	MSLLSDLINLNLSESSEKIIAEYIWVGGSGMDLRSKARTLPGPVSDPAKLPKWNVDGS STNQAPGQDSEVILYPQAIFKDPFRQGNILVICDVYTPAGEPLPTNKRHNAAKIFSHF DVAAEVPWYGIEQEYTLQKDTNWPLGWPIGGFPGPQGPYYCGIGADKAYGRDIVD AHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGISAGDEIWAARYILERITEIAGVVV SFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMREDGGYEIIKKAIEKLGLRHKEHIAAYGEGNER RLTGKHETTDINTFSWGVANRGASVRVGRDTEKDGGYFEDRRPSSNMDPYVVTSMIAETTLLWKP
P09187	Leghemoglobin-1	<i>Medicago sativa</i>	MSFTDKQEALVNSSWEAFKQNLPRYSVFFYTVVLEKAPAAKGLFSFLKNSAEVQDSPQL QAHAKEVFGFLVRDSAVQLRATGGVVLGDATLGAHVVRKGVVDPHFVVVKEALLKTIKEAA GDKWSEELNTAWEVAYDALATAIKKAMS
Q43296	Leghemoglobin-2	<i>Vigna unguiculata</i>	MVAFSDKQEGLVNGAYEAFKADIPKYSVVFFYTTILEKAPAAKNLFSFLANGVDATNPFLT GHAELFLGLVRDSAAQLRASGGVVADAALGAVHSQKAVNDAQFVVVKEALVKTLKEAVGD KWSDELGTAVELAYDELAIAIKKAY
P93331	Nodulin-1	<i>Medicago truncatula</i>	MERKTLASLCFFLIVLLAAQVVAQIVPCKTRNRNFKSACIAVSGDNEECDHDCRRVGGWY GGSCKNQKVCDC
P93332	Bidirectional sugar transporter N3	<i>Medicago truncatula</i>	MAISHNTLAFTFGMLGNVISFLVFLAPISTFYRIYKKKSTEGFQSLPYLVALFSSMLWLY YALLKKDAFLITINSFGCVVETIYIILYIYAPRDARNLTFKLLSAMNVGSFALILIVT NYAVHGPLRVQVLGWVCVLSVSVAAPLSIVAQVVRTKSVEFMPFNLSFTLTLSATMWF GYGFFLKDICIXLPNVLGXVLGLLQMLLYAIYRNGGEKAMKKEKKAPIEPPKSIVETQL EKIEQEKKNKDDDNEEKDKSEEPICGV

Q8VZW1	Aquaporin NIP1-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MADISGNGYGNAREEVVMVNLKDEVEHQEMEDIHNPRPLKKQDSLLSVSPFLQKLIAEFL GTYFLVFTGCASVVVNMQNDNVVTLPGIAIVWGLTIMVLIYSLGHISGAHINPAVTIAFASCGR FPLKQVPAYVISQVIGSTLAAATLRLLFGLDHDVCSGKHDFIGSSPVGSDLQAFTMEFIVTF YLMFIISGVATDNRAIGELAGLAIGSTVLLNVLIAAPVSSASMNPGRSLGPALVYGCYKGIWIY LVAPTLGAIAWVYNTVRYTDKPLREITKSGSFLKTVRIGST
Q43460	Nodulin-20a	<i>Glycine max</i>	MRVVLTITLFLFIGAAVAEDAGIDAITPEEGKANNIEAYESPRFQKFVTHCSSHVTQTCS GNDPLNNQEASRMNSPFGLSFCLFDSMEKCLADHKASLKDPQDNNNLASMSSLPGSIQNQ PLLIETVKFRTVLKTCSHVSAQYCFTNPVATSALADCLMPSLNQCVPYPSILLPWPPP PPPPPPPPPPPLI
P16313	Nodulin-21	<i>Glycine max</i>	MVVVSPKMANATPNGSVPHNHVGAVLLTIPTIKIDGKQTLATEDHTSIDYLQRAQWLRAA ILGANDGLVSVASLMMGVGAVKRDAKAMLLAGFAGLVAGACGMAIGEFVAVYTQYEVEVG QMKRDMNMSVGGERDLEMEMERRTLNPLQATLASALCFSIGALVPLLSAAFIENYRTRI IVVAMSCLALVVFVGWVGAKLGKTPK
P08961	Nodulin-22	<i>Glycine max</i>	MEKMRVVLITLLLFIGAAVAEKAGNGKAANNPAEDASDGEAINLVEEAGGIGDAITPAEG KATNLQAYESARFKKFVTHCSSHVAQTCSGNDPLHHQEGGHGINVPLGLSFCLFDSMEKC LGDHEAKLIDPNPGPMSAIPNSIQSQLLIETVKFRTVLKTCTRVSAQFCLTAPNVDTSV LPACLGPSLNQCVPYPAADAFTPGPPLELPPIIYN

P04144	Nodulin-23	<i>Glycine max</i>	MRVIVITVFLFIGAAIAEDVGIGLLSEAEAYVSPKLKKFITPCTSHVGETCSTTSSSGSE ALMQNQGGLLFAFRFYGEMLGRPCAQLYQTSVTNLQVEPSEVFPRKNNPQGGGRKSLDDH QVQPLSFRLPPFRLPPMPKLGPTSPIIRTIPSPPIAPRDLSLIETIQLRTALRTCCTHVTA RTCLTAPNVATSDLEACLTPSMNQCIYPRGAEYGSPIRA
P04145	Nodulin-24	<i>Glycine max</i>	MGSKMAILILGLLAMLLITSEVAARNLKEAGEAVQETNEVADAKLVAAGEAVQETNEVA DTKLVGAGEAVQETNEVADTKLVGAGGVVKQRNKVGYGKLVGVGGYDYGWNWGGQRSPYG TGAICMRGCCFPSSLGGSVSCCPHEWQ
P10322	Nodulin-25	<i>Medicago sativa</i>	MVYSNTYMLLGLGVFVLLSSHVLAAYNMRADPSIHDSTLDDQKSNDVFVKASIAECPPGPD TYLELSDSTLDDQKSMDYVKDASTVDHNCPPGPHTYLELSAWLQEEQNSIDKVKKVLRD EAPDNQKGGLEYKDARHNDGPIEISTRTEKDNFIPSDGPIEISTRTENENFIPSDEPIEIS TGTEKENFISSDEPSEISSGAEKENFIPSVSQVDWRTFHAKYPWIKKDGPNVTVTGSRKLL NDIAIK
P08863	Nodulin-26B	<i>Glycine max</i>	MEKMXVMLITLFLFIAATVAEDADNIGEAIIPENPKFKKFVTDGTSHVAERCSSGSEALH GEGGLALCLFDSMENCLVEHGAAKVNQRSLFVLPKGSTPIEPKDSLPSFIPSPPIPPKSK FECWCDSLISCVCTWTSMVPSTRLLNNQQLGQGFYYFQYEPLLQFRTVLRTCLESARTC LNAPNVATSPGLRSLSHIHESCVYPSGAESGTGSLPIKA
P08864	Nodulin-27	<i>Glycine max</i>	MEKMRVVLITLLLFIGAAVAEKAGNGKAANNPAEDASDGEHNLVEEAGGIGDAITPAEGK ALISAYESARFKKFVTHCSSHVAQTCSGNDPLHASGRCHGINVPLGLSFCLFDSMEKCLG DHEAKLIDPNPGPMSAIPNSIQSQQLLIETVKFRTVLKCTRVSAKFCLSAPNVDTSVLP ACLGPSLNQCVPYPAADAFTPGPPELELPPIIIMN

Q9LD80	Uricase	<i>Cicer arietinum</i>	MAKNVEGFEFEQRHGKERVVRVARVWWSKDGKRHFVVEWRVSINLLSDCVNSYIRDDNSDI VATDTMKNTVYAKAKECSEILSAEDFAILLAKHFTSFYRQVTTAIVNIVEKPWERVSVDG QPHEHGFKLGSEKHTTEAIVKKSGALQLTSGIEGLSLLKTTKSGFEGFIRDKFTALPETR ERMLATEVTALWRYTYESFYSSIPQKPLYFTDKYLDVKRVLVDTFFGSPKEGVYSPSVQST LYQMGKATLNRFPDIASIQLKMPNIHFLPVNLSNKDGHIVKFDDDVYLPDDEPHGSIEAS LSRTRSKM
P04672	Nodulin-44	<i>Glycine max</i>	MEEKILMRVIVITVFLFIGAATAEDAAAEAYESPKLKKLITDCTGHVGETCSTTTSSSGS EALMQKQDGLALCLLDSEMERCLLDHQTNVGTLGDLIILPPFPPRPPVDPNIIPFPRPPNI VPFSPRGRRSKLDNHQTDAGTLGKVIPLPIRPGPPLKIIPFGTNIVPFPRPPNIVPFP RRRRSKLDNHQTDAGTLGDLIILPPFPPRPPVDPNIIPFPRPPNIVPFSPRGRRSKLDNH QTDAGTLGRVIPLPIRPGPPLKIIPFGTNIVPFPKPYIPHSYNTITNLLGARRDQVQD LPLLIQTTQLRTVLGICSHVTARTCLTAPNVATSDLEACLTPSMNQCVYPPGAESGSPPI
P04671	Nodulin-C51	<i>Glycine max</i>	MEKMRVIVITVFLFIGAIAEDVGIGLLSEAEAYVSPKLKKFITPCTSHVGETCSTTSSS GSEALMQNQGGLALCLFDSMERCLVDHGAQLYQTSVTNLQVEPSEVFPRKNNPQGGRKSK LDDHQVQPLSFRLPPFRLPPMPKLGPTSPIRTIPSPPIAPRDLSLIETIQLRTALRTCT HVTARTCLTAPNVATSDLEACLTPSMNQCIYPRGAEYGSPPIRA
CAA83001.1	Nodulin 30	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MRAILITLFLILSVVVAEEAEDAAIVETIDPAKEAGISVATNPAKDHGIGGTGEINDLAEDAGVGISKAI YQTLSGQPEAYESPRFKRFVTHCSSHVAETCSDPMHYEGGIRNPTGLSHCIFDSMKACLANHKASLYDS A RSKTLNLKPTKVEYLPVIIQTVKFQTVWKTCSQVSAQSCLSDSDVDASTLGACLLPSFNQCVYPTPPPPP PPPPPDETR

Q9T0M6

Sucrose synthase

Medicago truncatula

MATERLTRVHSLKERLDETLTANRNEILALLSRLEAKGKGILQHHQVIAEFEEIPEDSRQ
KLTDGAFGEVLRSTQEAIVLPPWVALAVRPRPGIWEYL RVNVHALVVENLQPAEFLKFKE
ELVDGSANGNFVLELDFEPFTASFPRPTLNK SIGNGVQFLNRHLSAKLFHDKESLHPLLE
FLRLHSYKGKTLMLNDRIQNPDSLQHVLRK AEEYLSTIDPETPYSEFEHRFQEIGLERGW
GDTAERVLESIQLLLDLLEAPDPCTLETFLDRIPMVFN VILSPHGYFAQDDVLGY PDTG
GQVVYILDQVRALESEMLSRIKKQGLDIIPRILII TRLLPDAVGTT CGQRLEK VYGTEHC
HILRV PFRDTKGIVRKWISRF EVWPYLETYTEDVAHELAKELQGK PDLIVGNYS DGNIVA
SLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPE SDIYWKKFEEKYHFSCQFTADLFAMNHTDFIITST
FQEIAGSKDKVGQYESHTAFTLPGLYRVVHGIDVFD PKFNIVSPGADQTIYFPYTETSRR
LTSFYPEIEELLYSSVENE EHICVLKDRNKPIIFTMARLDRVKNITGLVEWYGKNAKLRE
LVNLVVVAGDRRKESKDLEEIAEMKKMYGLIETYKLNGQFRWISSQMNRVRNGELYRVIC
DTKGAFVQPAVYEAFLTVVEAMATGLPTFATLNGGPAEIIVHGKSGFHIDPYHGDRAAD
LLVEFFEKVKVDP SHWDKISQGGLQRIEEKYTWIYSQRLLTLTG VYGFWKHVS NLDRL E
SRRYLEMFYALKYRKLAESVPLAVE

Anexo 2. Tabela com acesso de sonda correspondente ao possível correspondente em *S. scabra* e a sequência do transcrito traduzido.

Acesso-UniProtA2:C9 (Sonda)	Nome transcrito	Sequência(aa)*
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i5	-
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i1	-
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i2	-
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i4	-
AEP81324.1	STYSC_DN128685_c0_g1_i1	-
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c0_g1_i1	-
AEP81324.1	STYSC_DN129109_c0_g2_i2	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Acesso-UniProt (Sonda)	Nome transcrito	Sequência(aa)*
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i2	-
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i4	-
P09187	STYSC_DN113764_c0_g1_i2	-
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i5	-
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i6	-
P09187	STYSC_DN115377_c0_g1_i2	-
P09187	STYSC_DN115377_c0_g1_i3	-
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i1	-
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i3	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i1	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i2	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i3	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Acesso-UniProt (Sonda)	Nome transcrito	Sequência(aa)*
P93332	STYSC_DN119458_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i2	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i5	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i6	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i3	-
P93332	STYSC_DN120766_c0_g1_i2	-
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i4	-
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i4	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Acesso-UniProt (Sonda)	Nome transcrito	Sequência(aa)*
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i3	-
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i6	-
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i2	-
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i3	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i1	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i2	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i3	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Anexo 3. Tabela de anotação com as superfamílias e resultado do BLASTx para as possíveis nodulinas tardias encontradas em *Stylosanthes scabra* submetida ao déficit hídrico.

		Batch	BLASTx					
Acesso(Sonda)	ID (<i>S.scabra</i>)	Superfamília	E-value	Código*	Acesso*	Descrição*	Organismo	E-value
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i5	Nramp	5,98E-107	-	-	-	<i>Arachis hypoqaea</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i1	SLC5-6-like_sbd	1,68E-135	-	-	-	<i>Arachis hypoqaea</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i2	SLC5-6-like_sbd	1,82E-135	-	-	-	<i>Arachis hypoqaea</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i4	SLC5-6-like_sbd	4,24E-135	-	-	-	<i>Arachis hypoqaea</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN128685_c0_g1_i1	SLC5-6-like_sbd	5,42E-134	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c0_g1_i1	SLC5-6-like_sbd	6,10E-134	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	0.0
AEP81324.1	STYSC_DN129109_c0_g2_i2	SLC5-6-like_sbd	5,81E-157	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	0.0
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i2	Globin_like	3,92E-66	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	3.22e-94
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i4	Globin_like	5,74E-67	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	3.47e-92
P09187	STYSC_DN113764_c0_g1_i2	Globin_like	8,31E-61	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	4.32e-88
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i5	Globin_like	4,25E-69	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	3.21e-89
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i6	Globin_like	1,48E-68	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	1.53e-88
P09187	STYSC_DN115377_c0_g1_i2	Globin_like	4,90E-86	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	6.31e-105
P09187	STYSC_DN115377_c0_g1_i3	Globin_like	6,81E-85	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.00e-104
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i1	CCC1_like	2,24E-39	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	1.26e-98
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i3	CCC1_like	1,05E-36	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	4.11e-93
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i1	CCC1_like	2,43E-38	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	6.96e-96
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i2	CCC1_like	2,43E-38	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	8.30e-97
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i3	CCC1_like	2,43E-38	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	6.99e-97

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Acesso-UniProt (Sonda)	Nome transcrito	Batch		BLASTx				
		Superfamília	E-value	Código*	Acesso*	Descrição*	Organismo	E-value
P93332	STYSC_DN119458_c0_g1_i1	PQ-loop	3,55E-22	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.84e-173
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i2	PQ-loop	9,61E-19	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	5.93e-142
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i5	PQ-loop	9,61E-19	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	3.23e-142
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i6	PQ-loop	3,93E-19	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	1.47e-140
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i3	PQ-loop	5,58E-20	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	6.34e-153
P93332	STYSC_DN120766_c0_g1_i2	PQ-loop	1,43E-21	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	5.86e-171
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i1	PQ-loop	8,06E-21	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.09e-142
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i4	PQ-loop	1,26E-20	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	5.41e-148
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i1	PQ-loop	3,10E-20	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.20e-166
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i4	PQ-loop	8,10E-23	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.89e-92
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i1	PQ-loop	2,14E-13	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	8.13e-110
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i3	PQ-loop	1,61E-18	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	4.25e-175
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i1	PQ-loop	2,31E-12	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.96e-120
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i6	PQ-loop	1,73E-13	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	3.31e-110
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i2	PQ-loop	8,83E-18	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	1.69e-156
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i3	PQ-loop	4,10E-16	-	-	-	<i>Arachis ipaensis</i>	8.51e-154
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i1	PQ-loop	7,65E-13	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	9.11e-137
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i2	PQ-loop	2,36E-13	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	4.88e-129
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i3	PQ-loop	9,14E-13	-	-	-	<i>Arachis duranensis</i>	1.03e-136

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Anexo 4. Tabela de anotação com domínios e estrutura do gene identificados e caracterizados com as ferramentas SMART e Egenes, respectivamente, para as possíveis nodulinas tardias encontradas em *Stylosanthes scabra* submetida ao déficit hídrico.

SMART				Egenes				SignalP		
Acesso(Sonda)	ID (<i>S.scabra</i>)	Domínio*	Intervalo*	E-value	Transcrito (pb)	Exon	Intervalo*	pb	aa	
AEP81324.1	STYSC_DN127216_c1_g1_i5	-	-	2.2e-120	2135	1	-	1512	503	-
AEP81324.2	STYSC_DN127216_c1_g1_i1	-	-	3.1e-120	2120	1	-	1512	503	-
AEP81324.3	STYSC_DN127216_c1_g1_i2	-	-	2,00E-120	2149	1	-	1512	503	-
AEP81324.4	STYSC_DN127216_c1_g1_i4	-	-	2.2e-120	2121	1	-	1512	503	-
AEP81324.5	STYSC_DN128685_c0_g1_i1	-	-	6.6e-121	2316	1	-	1680	559	-
AEP81324.6	STYSC_DN127216_c0_g1_i1	-	-	1.1e-119	1857	1	-	1512	523	-
AEP81324.7	STYSC_DN129109_c0_g2_i2	-	-	7.8e-124	1947	1	-	1641	546	-
P09187	STYSC_DN122735_c0_g2_i2	-	-	2.1e-18	771	1	-	456	151	-
P09188	STYSC_DN122735_c0_g2_i4	-	-	6,00E-19	774	1	-	456	151	-
P09189	STYSC_DN113764_c0_g1_i2	-	-	1.4e-16	825	1	-	462	153	-
P09190	STYSC_DN122735_c0_g2_i5	-	-	3.6e-19	895	1	-	456	151	-
P09191	STYSC_DN122735_c0_g2_i6	-	-	3.2e-19	895	1	-	456	151	-
P09192	STYSC_DN115377_c0_g1_i2	-	-	1.7e-19	784	1	-	483	160	-
P09193	STYSC_DN115377_c0_g1_i3	-	-	9.4e-20	881	1	-	684	160	-
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i1	-	-	1e-23; 3.8e18	1019	1	-	678	225	-
P16313	STYSC_DN114291_c0_g1_i3	-	-	4.3e-23; 7.4e-18	808	1	-	678	225	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i1	-	-	3.3e-25; 5.9e-18	1277	1	-	696	231	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i2	-	-	3.3e-25; 5.9e-18	1084	1	-	696	231	-
P16313	STYSC_DN122288_c0_g2_i3	-	-	3.3e-25; 5.9e-18	1071	1	-	696	231	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Acesso(Sonda)	ID (S.scabra)	SMART		Intervalo*	E-value	Egenes		Intervalo*	pb	aa	SignalP
		Domínio*				Transcrito (pb)	Exon				
P93332	STYSC_DN119458_c0_g1_i1	-	-	-	7.8e-29; 0.0; 7e-26	1175	1	-	849	282	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i2	-	-	-	9.9e-19; 4.5e-26	980	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i5	-	-	-	9.9e-19; 4.5e-26	995	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i6	-	-	-	9.9e-19; 4.5e-26	982	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN132233_c1_g1_i3	-	-	-	7.3e-19; 6e-27	1003	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN120766_c0_g1_i2	-	-	-	2.1e-25; 4.4e-27	1281	1	-	897	298	-
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i1	-	-	-	1e-26; 2.1e-28	1315	1	-	918	305	-
P93332	STYSC_DN117177_c0_g1_i4	-	-	-	1.1e-26; 5.6e-28	1329	1	-	945	314	-
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i1	-	-	-	1.5e-27; 6.8e-28	1147	1	-	746	251	-
P93332	STYSC_DN113611_c0_g1_i4	-	-	-	1.5e-28	808	1	-	408	135	-
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i1	-	-	-	5.1e-25; 8.6e-18	1181	1	-	909	302	-
P93332	STYSC_DN121906_c0_g1_i3	-	-	-	1.9e-24; 2.6e-25	1087	1	-	909	302	-
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i1	-	-	-	2.1e-18; 1.3e-22	1313	1	-	708	235	-
P93332	STYSC_DN130000_c0_g1_i6	-	-	-	2.1e-18; 2.9e-23	1359	1	-	708	235	-
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i2	-	-	-	8.7e-18; 2.9e-23	1117	1	-	813	270	-
P93332	STYSC_DN118328_c0_g1_i3	-	-	-	1.2e-17; 2.4e-22	1153	1	-	813	270	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i1	-	-	-	1.9e-21; 1e-21	1062	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i2	-	-	-	5.7e-21; 2.9e-22	1065	1	-	741	246	-
P93332	STYSC_DN110077_c0_g1_i3	-	-	-	1.9e-21; 1.9e-21	992	1	-	741	246	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

3.2 ARTIGO 2

Artigo a ser submetido ao Journal BBA - Proteins and Proteomics

Proteômica diferencial em raízes de *Stylosanthes scabra* Vogel em resposta ao déficit hídrico

Sheyla Carla Barbosa da Silva Lima¹, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva¹, Ana Maria Benko-Iseppon¹, Valesca Pandolfi¹, Tercilio Calsa Junior^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil;

Autor para correspondência:

Tercilio Calsa Junior, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de BioCiências, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Tel. +55 81-2126-7829; Email: terciliojr@yahoo.com.br

Resumo

Stylosanthes scabra é uma planta pertencente à família das leguminosas e apresenta importância econômica devido ao uso na agropecuária como forragem animal. No atual cenário de mudanças climáticas globais, tem ocorrido períodos de secas duradouras em todo o mundo, condição que compromete a produtividade das plantas cultivadas. Este estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) envolvidas na resposta da *S. scabra* quando exposta ao estresse por déficit hídrico. Plantulas de *S. scabra*, foram submetidas às condições de déficit hídrico pelo período de 6 e 24 horas, as raízes foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer. Proteínas solúveis totais foram extraídas em triplicata através do método baseado em fenol e quantificadas utilizando o método de Bradford. As amostras foram submetidas à focalização isoeletrica em Sistema *Multiphor* (strips de 13 cm; pH 3-10) seguindo-se de eletroforese bidimensional em gel SDS-PAGE 12,5 %. Os géis foram digitalizados em scanner de transparência *Image Scanner III*, e as imagens analisadas nos programas *LabScan* e *Image Master 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences)*. Foram selecionados *spots* com variação significativa na porcentagem de volume (% vol), ANOVA $\leq 0,05$, e $ratio \geq 1,5$ entre os tratamentos comparados. Os *spots* foram excisados dos géis, submetidos à digestão com tripsina e analisados via espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF (AutoFlex III; Bruker Daltonics). Os espectros foram analisados com os softwares Mascot e SearchGui para identificação das proteínas as quais foram funcionalmente categorizadas com o programa MapMan cujos termos GO foram associados e enriquecidos através do Blast2GO e AgriGO, respectivamente. Para os tratamentos de 6 horas (após suspensão de rega) uma média de 551 *spots*/gel foram detectados nos tratamentos irrigado e déficit hídrico, dos quais 110 foram considerados DAPs. No tratamento de 24 horas após suspensão da rega, uma média de 494 *spots*/gel foram marcados, sendo 85 DAPs. As proteínas de uma forma geral apresentaram-se envolvidas com resposta ao estresse, sistema antioxidantes e glicólise. Sugere-se que *S. scabra* pode utilizar-se de um evento conhecido como endurecimento ou *hardening*, respondendo mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente. Ou ainda, que utilize a via dependente de ABA, que já é relatada como responsiva a estresse por seca e salinidade, e ative proteínas responsivas a estresse por luz, possivelmente com o intuito de uma resposta ainda mais rápida para fechamento de estômatos e diminuição da fotossíntese, reduzindo a perda de água. Este é o primeiro relato da análise do perfil proteômico de *S. scabra* em resposta às condições de estresse por déficit hídrico.

Palavras-Chave: Estilosantes. Seca. 2DE. MALDI-ToF-ToF.

Abstract

Stylosanthes scabra is a plant belonging to the legume family and has economic importance due to its use in agriculture as animal fodder. In the current scenario of global climate change, there have been periods of lasting droughts around the world, a condition that compromises the productivity of cultivated plants. This study aimed to identify differentially accumulated proteins (DAPs) involved in the response of *S. scabra* when exposed to stress due to water deficit. Plantulas of *S. scabra*, were submitted to water deficit conditions for the period of 6 and 24 hours, the roots were collected and stored in an ultrafreezer. Total soluble proteins were extracted in triplicate using the phenol-based method and quantified using the Bradford method. The samples were subjected to isoelectric focusing in Multiphor System (strips of 13 cm; pH 3-10) followed by bidimensional electrophoresis in 12.5% SDS-PAGE gel. The gels were digitized on an Image Scanner III transparency scanner, and the images were analyzed using LabScan and Image Master 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences). Spots with significant variation in volume percentage (% vol), ANOVA ≤ 0.05 , and ratio ≥ 1.5 were selected among the compared treatments. The spots were excised from the gels, submitted to trypsin digestion and analyzed via MALDI-ToF-ToF mass spectrometry (AutoFlex III; Bruker Daltonics). The spectra were analyzed with the Mascot and SearchGui software to identify the proteins which were functionally categorized with the MapMan program whose GO terms were associated and enriched through Blast2GO and AgriGO, respectively. For the 6-hour treatments (after watering suspension) an average of 551 spots / gel were detected in the irrigated and water deficit treatments, of which 110 were considered DAPs. In the 24-hour treatment after suspension of watering, an average of 494 spots / gel were scored, 85 DAPs. Proteins in general were involved in response to stress, antioxidant systems and glycolysis. It is suggested that *S. scabra* can use an event known as hardening or hardening, responding faster and more vigorously to a recurring stress event. Or even, to use the ABA-dependent pathway, which is already reported to be responsive to stress due to drought and salinity, and to activate proteins responsive to light stress, possibly with the aim of an even faster response for stoma closure and decreased photosynthesis, reducing water loss. This is the first report on the analysis of the proteomic profile of *S. scabra* in response to stress conditions due to water deficit.

Keywords: *Stylosanthes*. Dry. 2DE. MALDI-ToF-ToF.

1 Introdução

O Brasil atualmente é um dos poucos países do mundo onde a pecuária de corte ainda tem espaço para crescer de maneira sustentável a custos baixos, comparativamente a outros países. Além disso, conta com condições climáticas favoráveis a uma pecuária extensiva, devido ao bom regime de chuvas na maior parte de seu território, o que proporciona o bom desenvolvimento de espécies forrageiras de qualidade que são transformadas com eficiência em proteína animal. Tendo em vista que muitas forrageiras leguminosas geralmente apresentam altos níveis de minerais, vitaminas e proteínas [1], estas têm sido cada vez mais utilizadas na alimentação de animais, mostrando-se eficientes tanto para correção de deficiência alimentar [2,3], como na indústria leiteira [4]. Além disso, a capacidade de estabelecer relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio é de fundamental importância, principalmente no uso em sistema de rotação de culturas, que consiste em alternar o cultivo de espécies vegetais onde cada espécie deixa um efeito residual positivo para o solo e para a cultura sucessora. [5,6].

A *Stylosanthes scabra* Vogel destaca-se como uma das espécies de importância econômica, principalmente devido à sua capacidade de restaurar a fertilidade e melhorar as propriedades físicas do solo, além de fornecer cobertura vegetal permanente, por apresentar tolerância ao estresse por déficit hídrico [7], tornando-se uma alternativa para a melhoria da fertilidade em pastagens consorciadas com gramíneas. É uma planta perene, subarborescente, caule lenhoso, com hábito predominantemente ereto. De grande distribuição geográfica, especialmente na América do sul, com ocorrência de norte a sul do Brasil, em savana (cerrado), savana florestada (cerradão) e savana gramíneo-lenhosa [8,9,10]. Dos 1.440 registros de *S. scabra*, 1.436 são do Brasil, sendo os estados da Bahia e Pernambuco com maior número de ocorrências, 300 e 181 ocorrências, respectivamente [11]. Mesmo com o grande número de registros nessas regiões, o potencial de uso destas espécies ainda é muito pouco estudado.

A busca por genes e produtos gênicos com novas características em espécies de importância agrícola, biotecnológica e nativas poderá trazer grandes avanços no melhoramento genético desta e de outras leguminosas. É cada vez mais necessário um melhor entendimento dos mecanismos de resposta das plantas em nível celular e molecular frente a tais condições ambientais adversas [12]. Para estudos onde a compreensão de mecanismos de resposta ao estresse é o objetivo, a principal abordagem

deve ser direcionada a analisar diferentes níveis de estresse, viabilizando a identificação de padrões de expressão de genes e proteínas codificadas responsivas ao fator de estresse [5]. Neste contexto, a proteômica comparativa apresenta-se como uma alternativa adequada e promissora para análises globais de expressão gênica em nível traducional e pós-traducional, devido sua proximidade com o fenótipo [13,14]. Diferentes aspectos de processos biológicos, incluindo identificação de proteínas, modificações pós-traducionais, perfis de expressão de proteínas sob condições de estresse durante o desenvolvimento da planta e interações proteína-proteína podem ser analisados através de abordagens baseadas em proteômica [15]. O objetivo deste estudo foi caracterizar o proteoma de *Stylosanthes scabra* e identificar proteínas potencialmente associadas com a resposta desta espécie ao déficit hídrico.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido com indivíduos de *S. scabra* propagados por estaquia, utilizando-se como matriz o acesso 85/UNEB, proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia, e conduzido na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. O enraizamento das estacas de aproximadamente 10 cm de comprimento foi induzido com a aplicação da auxina ácido indolbutírico (IBA) a 1.000 ppm diluído em talco mineral. O material foi colocado em sacos plásticos (15 x 8 cm) contendo substrato composto por argissolo e vermiculita (3:1), mantidos em telado com 50% de sombreamento e irrigação uma vez ao dia. Nessas condições, obteve-se taxa de enraizamento das estacas de aproximadamente 90%. As plantas foram posteriormente transferidas para vasos plásticos (capacidade 10 L), sendo cultivadas em substrato composto por areia, argissolo, vermiculita, mantidos em casa-de-vegetação.

2.2 Desenho experimental, imposição do estresse e coleta do material

Após quatro meses de cultivo, as plantas foram categorizadas em dois tratamentos: controle (irrigado diariamente) e o déficit hídrico (DH) - suspensão de rega, nos períodos de 6 h e 24 h. Para cada tratamento nove réplicas biológicas foram

coletadas, totalizando 27 plantas por tratamento. Tecidos radiculares foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em ultrafreezer.

Alguns resultados fisiológicos e bioquímicos prévios (Araújo et al., dados não publicados) realizados com *S. scabra* nos tempos de 6, 24 e 48 horas após suspensão de rega e 6 horas após reidratação, em folhas e raízes, mostram que a assimilação líquida de CO₂ e a condutância estomática apresentaram redução significativa já com 6 h de supressão de rega e os teores de carboidratos, aminoácidos, proteínas e prolina apresentaram aumento nas raízes a partir de 24 h. A partir destes resultados os tempos de 6 e 24 h foram selecionados para análise proteômica, visando identificar respostas traducionais e pós-traducionais mais precoces e intermediárias.

2.3 Extração e quantificação de proteínas

A extração de proteínas solúveis totais foi realizada usando protocolo com fenol [16] com poucas modificações: alíquota de 1,5 g de tecido radicular de *S. scabra*, foi maceradas em N₂ líquido foi ressuspensa em 10 mL do tampão de extração [Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5); sacarose 0,7 M; KCl 0,1 M; EDTA 50 mM; 2% β-mercaptoetanol e PMSF 2 mM], e mantida sob agitação constante (70 rpm) em banho de gelo por 20 min. Foi adicionado volume igual de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5), misturado por vortex e incubado sob agitação constante (70 rpm) por 20 min. em banho de gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.200 xg, a 4°C por 20 min. A precipitação proteica foi realizada transferindo-se a fase fenólica (superior) para novo tubo e adicionando-se cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M (em metanol), mantidos a 4°C por 16 h. As amostras foram centrifugadas a 7.200 xg, a 4°C por 30 min. O precipitado foi lavado três vezes com acetato de amônio 100 mM (em metanol gelado) e uma vez com acetona 80% (gelada). Entre as lavagens, as amostras foram vortexadas e incubadas a 4°C por 15 min. As amostras foram secas a 4°C por 10 min e o sedimento solubilizado em 400 µL de tampão ureia/tiourea (8M:2M). A solução proteica foi quantificada pelo método Bradford [17], e a integridade das proteínas foi verificada em SDS-PAGE em gel a 12 %.

2.4 Eletroforese bidimensional (2D)

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no sistema Multiphor utilizando fitas de pH 3-10 linear (IPG), com 13 cm (GE Life Sciences) para 500 µg de proteínas. As tiras foram hidratadas por 16 horas em IPG-Box (GE Life Sciences) à temperatura

ambiente, contendo tampão de reidratação, Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), DTT, IPG buffer pH 3-10 e a amostra. A IEF foi realizada em três etapas, utilizando as seguintes condições: 300 V - 100 V/h, 3500 V - 2900 V/h, 3500V - 22000 V/h. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (2 mA), 5 W de potência e temperatura de 10°C. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -20°C. As tiras foram equilibradas duas vezes por 30 minutos com balanço suave à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em tampões de equilíbrio. O primeiro equilíbrio, redução, foi realizado numa solução contendo ureia 6 M, tampão Tris-HCl 75 mM (pH 8,8), glicerol a 30 %, SDS a 2 % e ditioneitol (DTT) a 1 % e o segundo equilíbrio, alquilação, foi realizado usando a solução de equilíbrio e iodoacetamida (IAA) a 2,5 %.

Em seguida as proteínas foram separadas em gel 12,5 % (em placas de poliacrilamida vertical), a 15°C em duas etapas: i) 300 V em gradiente, 15 mA, e 30 W durante 20 minutos; ii) 300 V, 30 mA, e 30 W por aproximadamente 2 h e 30 min. Os géis foram corados com solução contendo 0,01 g.L⁻¹ *Coomassie Brilliant Blue G-250* conforme descrito por Candiano [18].

2.5 Análise das imagens e seleção dos *spots* diferenciais

Os géis 2D-PAGE foram digitalizados no ImageScanner III calibrado (GE Healthcare Life Sciences) através do programa LabScan 6.0, de acordo com os parâmetros padrão. As imagens digitalizadas foram analisadas com o *software ImageMaster 2D Platinum v7.05* (GE Healthcare Life Sciences). Interferências foram manualmente minimizadas e os *spots* que apresentaram *ratio* $\geq 1,5$ para porcentagem de volume (%vol.) e ANOVA significativa ($p \leq 0,05$) foram selecionados como diferencialmente acumulados.

2.6 Digestão em gel e espectrometria de massas (MS)

Os *spots* selecionados com variação significativa entre os tratamentos foram excisados e submetidos a digestão utilizando tripsina, de acordo com protocolo [19] com algumas modificações. Aos tubos contendo fragmento de gel excisado foi adicionado tampão aquoso (50 mM bicarbonato de amônio), agitados em vortex e incubados por 5 min. Em seguida foi retirado e adicionado por duas vezes o tampão orgânico [50 mM bicarbonato de amônio; acetonitrila (1:1)], e incubado por 5 min. A solução de DTT 10 mM em tampão aquoso foi inserida nas amostras, as quais foram

incubadas a 50°C por 1 h. Logo após esse período, as amostras foram adicionadas de solução de IAA 50 mM em tampão aquoso, incubadas no escuro à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida foi repetida a adição dos tampões aquosos e orgânicos, e incubação por 5 min para cada etapa. A amostra foi seca em temperatura ambiente e adicionado 50 µL de acetonitrila (ACN), a qual após 5 min foi descartada. Foram adicionados 8 µL tripsina (solubilizada em tampão aquoso) (seguindo-se incubação por 10 min. O excesso de solução de tripsina, não absorvido pelo gel, foi retirado, e em seguida foi adicionado volume igual de tampão aquoso, seguindo-se incubação a 37°C por 16 h. Foram adicionados 4 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 10% às amostras, que em seguida foram agitadas em vortex por 5 min e centrifugadas rapidamente até 12.000 xg (spin). O sobrenadante (exceto o gel) foi transferido para tubo novo. Uma nova re-extração de proteínas do fragmento de gel foi realizada duas vezes, com acetonitrila 50% e TFA 5%, com os sobrenadantes adicionados ao mesmo tubo novo. As amostras foram concentradas em rotoevaporador a vácuo a 30°C por 30 min. Para a análise em espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF AutoFlex III (Bruker Daltonics, Inc.), na Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), o *pellet* foi solubilizado em 5 µL de TFA 0,1%. Para cada ciclo de leitura, foram misturados 2 µL da amostra com 2 µL de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em ACN e TFA 3%, sendo aplicados 2 µL em duplicata nas células da placa metálica.

2.7 Identificação e anotação presumível das DAPs

A identificação presumível dos espectros de massa (MS e MS/MS) obtidos na análise dos peptídeos foi realizada com uso dos programas MASCOT (Matrix Science) (<http://www.matrixscience.com>) e SearchGUI [20].

A identificação através do programa MASCOT foi realizada pela versão de acesso privado do software, pelo método PMF (*peptide mass fingerprinting*, ou tipagem por massa do peptídeo) utilizando o banco de dados transcriptômico de *Stylosanthes scabra* (traduzido), adotando-se os seguintes parâmetros: i) modificação fixa: carbamidometilação (C); ii) modificação variável: oxidação (M); e iii) tolerância: 200 ppm a 1.2 Da. Também foi realizada a análise de dados MS/MS com os mesmos parâmetros citados, exceto tolerância MS/MS 0,6 Da e valor específico de massa/carga (m/z) de cada respectivo íon precursor. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior ou igual ao valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a -

$10.\log(P)$, sendo P a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de score acima do valor limite têm significância estatística ($p < 0,05$).

Arquivos *peaklist.xml* obtidos após análise via MALDI-ToF/ToF foram convertidos individualmente para o formato .mzXML através da ferramenta *FlexAnalysis software* (Bruker Daltonics), e submetidos à identificação presumível no programa SearchGUI v.3.2.20, cujos resultados foram visualizados com uso do programa PeptideShaker v.1.16.15 [21]. Os seguintes parâmetros foram utilizados para a busca: tolerância m/z do precursor: 200 ppm a 1.0 Da; tolerância m/z do fragmento: 0.5 Da a 1.0 Da; carga do precursor: 1-1; isótopo: 0-1; clivagens máximas perdidas: 2; modificações fixas: carbamidometilação (C); modificações variáveis: oxidação (M). Os demais parâmetros permaneceram no modo padrão (*default*) do programa.

2.8 Análise de ontologia gênica e mapeamento de DAPS

Para análise ontologia gênica (GO), as sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas como diferencialmente acumuladas foram recuperadas no formato MULTIFASTA, na base de dados UniProt. Em seguida foi utilizada a ferramenta Blast2GO 5 Basic [21], para mapeamento de termos de GO, com os seguintes parâmetros: bancos de dados SwissProt (Viridiplantae) e $p\text{-value}^{(-10)}$. Para enriquecimento dos termos GO foi utilizada a ferramenta *online* AgriGO [22], com a espécie *Medicago truncatula* como referência. O programa MapMan [23] 3.6.0RC1 foi aplicado para visualização do acúmulo das proteínas identificadas e para mapeamento em vias, os arquivos de *software* e mapeamento de *Phaseolus vulgaris* v1.0 (Common bean) foram baixados do GABI *Primary Database* e utilizados como referência [24].

3 Resultados

3.1 Análise do perfil proteômico de *Stylosanthes scabra*

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 1.623 *spots* nas amostras de réplicas técnicas do tempo 6 horas, distribuídos em média a 313 *spots*/gel (variando de 286 a 344) no irrigado e 228 *spots*/gel (variando de 222 a 239) no submetido ao DH. Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas fig. 1A e B, foram detectados 110 *spots* significativos, ou seja, com ANOVA significativa ($p < 0,05$) e razão

de variação na % vol maior ou igual a 1,5. Obteve-se 60 *spots* exclusivos no tratamento irrigado, 12 exclusivos do tratamento DH e 38 *spots* comuns aos dois tratamentos, sendo 31 mais acumuladas no tratamento DH e 7 no tratamento irrigado (tabela 1).

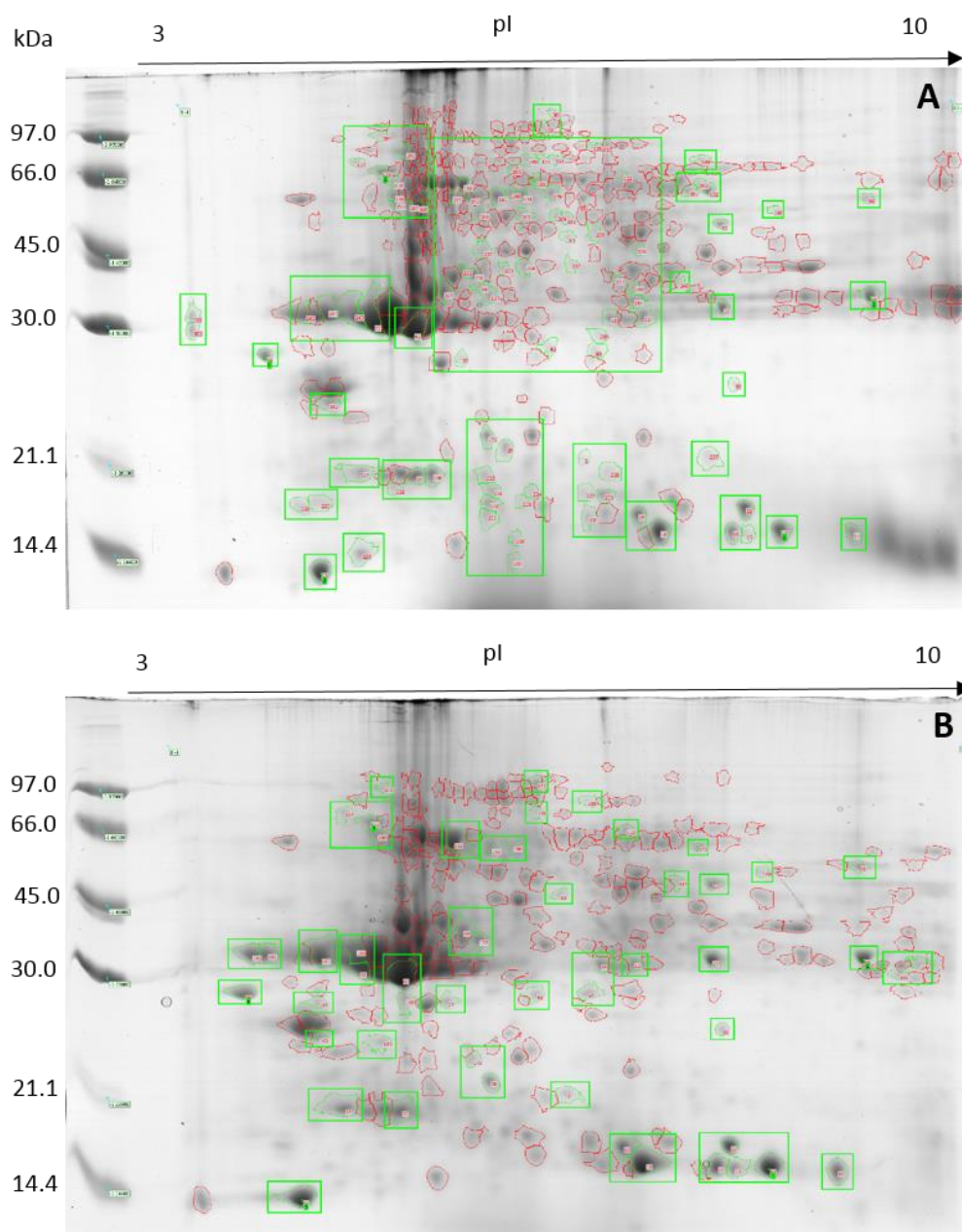


Fig. 1. Géis bidimensional SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas solúveis totais radiculares de *Stylosanthes scabra* submetidas ou não ao déficit hídrico. As proteínas (500 µg) foram separadas em fitas IPG com pH de 3 a 10. Amostras coletadas após 6 h nos tratamentos irrigado (A) e sob déficit hídrico (B).

Para as réplicas técnicas da condição de 24 horas, foram detectados 1.482 *spots* distribuídos em média a 207,3 *spots*/gel (variando de 197 a 207) no tratamento irrigado e 286,6 *spots*/gel (variando de 248 a 322) no tratamento DH. Na análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas fig. 2A e B e tabela 1 85 *spots* foram estatisticamente significativos, sendo nove exclusivos no tratamento irrigado, 49 exclusivos no tratamento DH e 27 *spots* comuns aos dois tratamentos, onde 18 foram mais acumulados no tratamento DH e nove no tratamento irrigado.

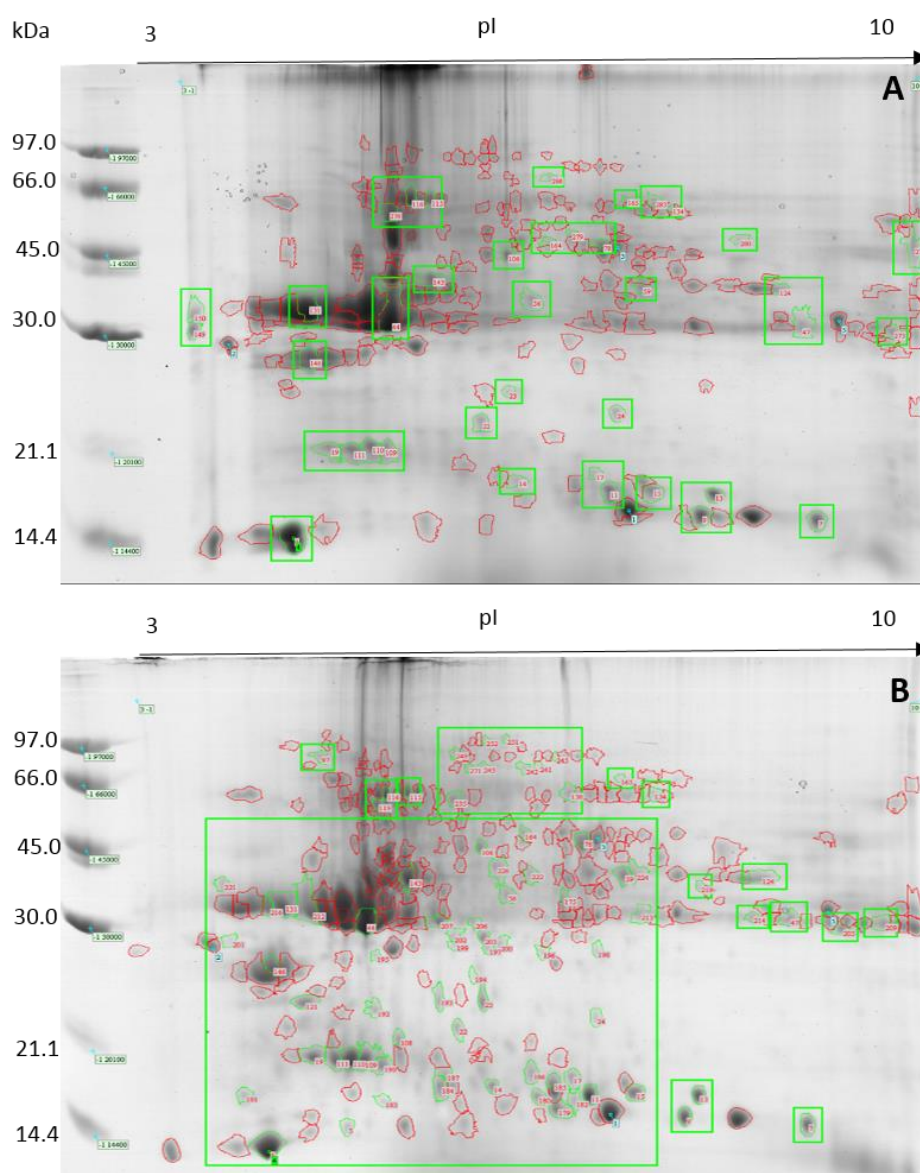


Fig. 2. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais radiculares de *S. scabra* submetidas ou não ao déficit hídrico. As proteínas (500 µg) foram separadas em fitas IPG com pH de 3 a 10. Amostras coletadas após 24 h nos tratamentos irrigado (A) e sob déficit hídrico (B).

Ao fim da análise 195 *spots* foram considerados proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs). A diferença na quantidade de DAPs entre os tempos de 6 e 24 horas, foi 25, para o tempo de 6 h a maioria das DAPs se concentraram no tratamento irrigado 35 DAPs (exclusivas e mais acumuladas) e 29 se concentram no tratamento déficit hídrico (DH). Para o tempo de 24 h, mesmo apresentando diminuição no número de DAPs, este tempo apresentou um número maior de proteínas no tratamento DH, 46 DAPs, enquanto 19 no irrigado.

3.2 Espectrometria de massas, identificação e análise de bioinformática

As proteínas diferencialmente acumuladas - DAPs (*Differentially Accumulated Proteins*) selecionadas a partir da análise comparativa em gel SDS-PAGE bidimensional foram submetidas a espectrometria de massas seguido de identificação presumível em banco de dados de acesso restrito. Dentre as 110 DAPs do tempo 6 h, 64 foram identificadas e para o tempo 24 h, das 85 proteínas diferencialmente acumuladas, 65 foram identificadas. As outras 66 DAPs não apresentaram espectros de boa qualidade ou a identificação não foi confiável (baixo valor de *score* e baixa confiabilidade).

Tabela 1. Comparação do total proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) e total identificadas entre os tempos (6 e 24 horas) e tratamentos (irrigado e déficit hídrico) em *Stylosanthes scabra*.

Tempo	Tratamento	Total DAPs		DAPs Identificadas	
		Comuns	Exclusivos	Comuns	Exclusivos
6 horas	Irigado	7	60	6	29
	Déficit hídrico	31	12	20	9
24 horas	Irigado	9	9	8	8
	Déficit hídrico	18	49	15	30

As DAPs identificadas foram classificadas em categorias de ontologia gênica de acordo com o envolvimento em processos biológicos fig. 1. As DAPs do tempo de 6 h foram incluídas em 35 processos biológicos, entres estes, os processos que mais agruparam proteínas foram: resposta ao estímulo, resposta ao estresse, resposta ao

estímulo químico, resposta ao estímulo biótico, resposta ao estímulo abiótico, regulação biológica, processo celular, metabolismo celular e metabolismo composto por nitrogênio.

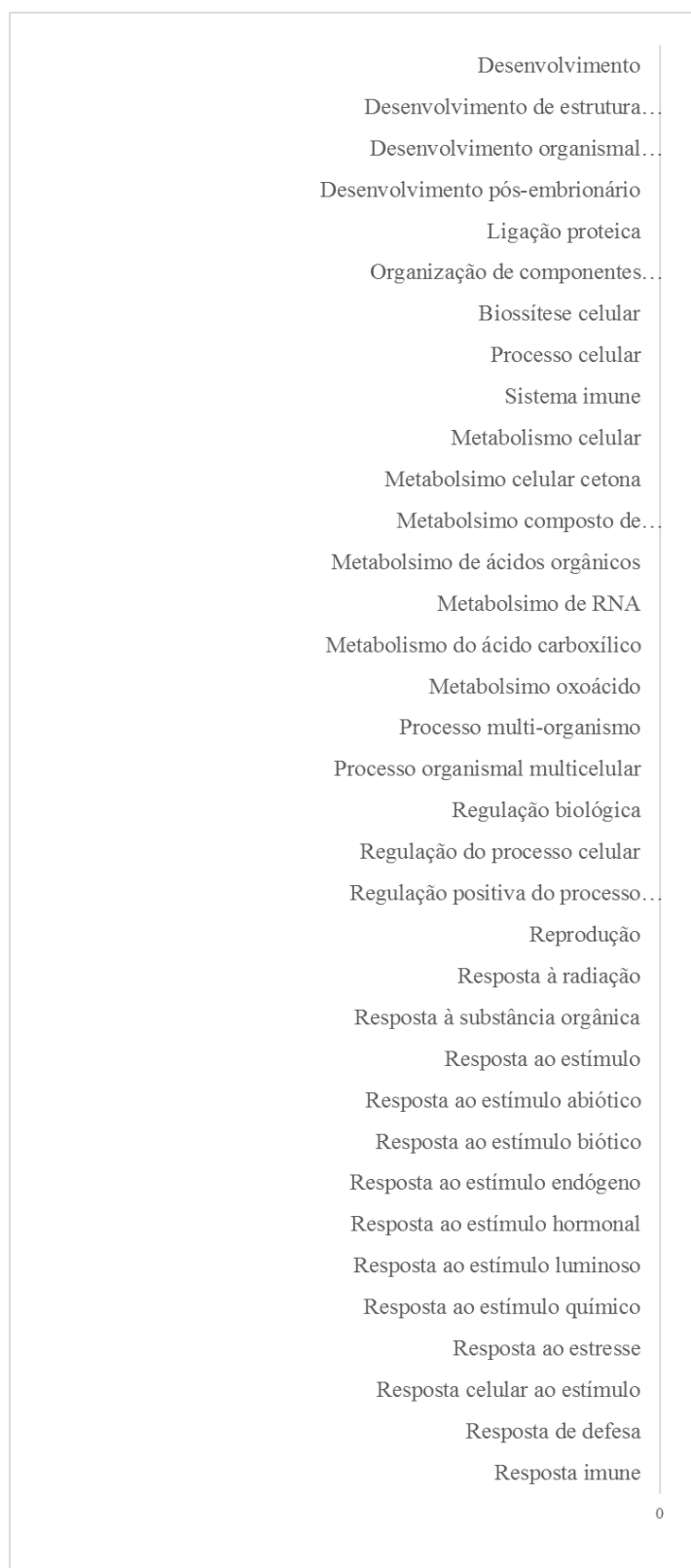


Fig. 3. Categorias de processo biológico para o tempo de 6 h.

Os processos biológicos que mais incluíram DAPs para o tempo de 24 h foram: resposta ao estresse, resposta ao estímulo biótico, resposta ao estímulo químico, resposta ao estímulo abiótico, processo celular. As proteínas identificadas no tempo de 6 h para o tratamento irrigado foram classificadas em quatro processos biológicos, isto pode ser devido ao pequeno número de proteínas, que foram 16, incluindo exclusivas e as mais acumuladas neste tratamento.

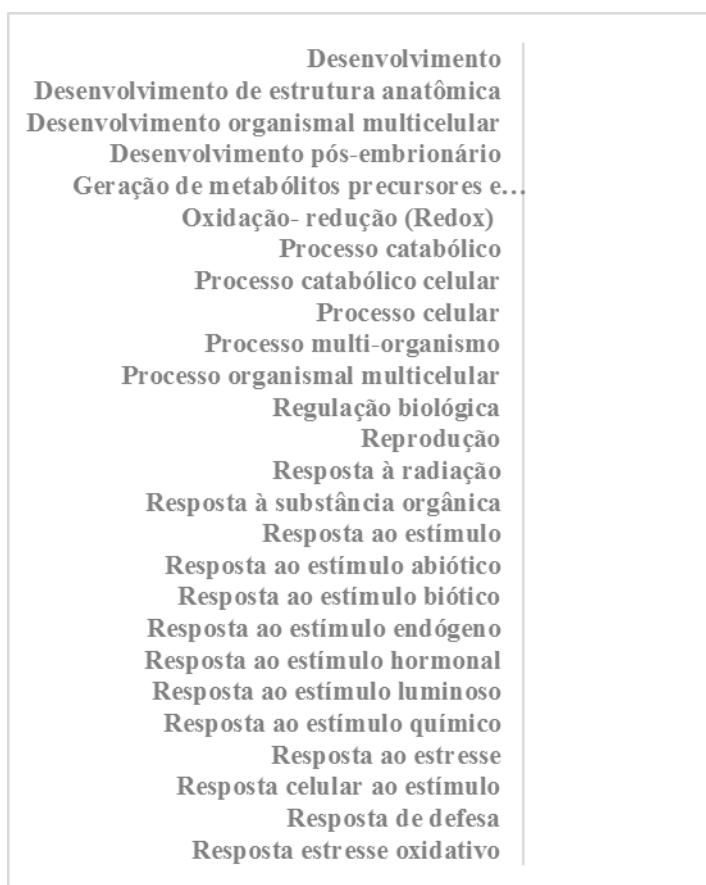


Fig. 4. Categorias de processo biológico para o tempo de 24 h.

A partir do enriquecimento por termos GO para processos biológicos, foi possível observar que processos como resposta ao estresse, resposta a estímulos e hormonais, resposta imune, reprodução, desenvolvimento, e regulação positiva de processos biológicos foram mais enriquecidos no tempo de 6 h. O resultado do enriquecimento pra o tempo de 24 h, mostrou os processos de desenvolvimento, geração de metabólitos precursores e energia, processo catobólico, resposta ao estresse e resposta a estímulos abióticos, luminosos e hormonais.

O mapeamento das DAPs identificadas foi realizado no MapMan e as vias que mais foram representadas foram a de estresse biótico, metabolismo, regulação e resposta

celular para os tempos de 6 e 24 horas (fig. 3 e 4). Ainda em análise no MapMan cinco proteínas (ATP sintase subunidade beta, fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bisfosfoglicerato, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase) do tratamento DH em 24 h foram inseridas na via de glicólise, todas estas também foram agrupadas na categoria geração de precursores metabólicos e energia pela ferramenta AgriGO.

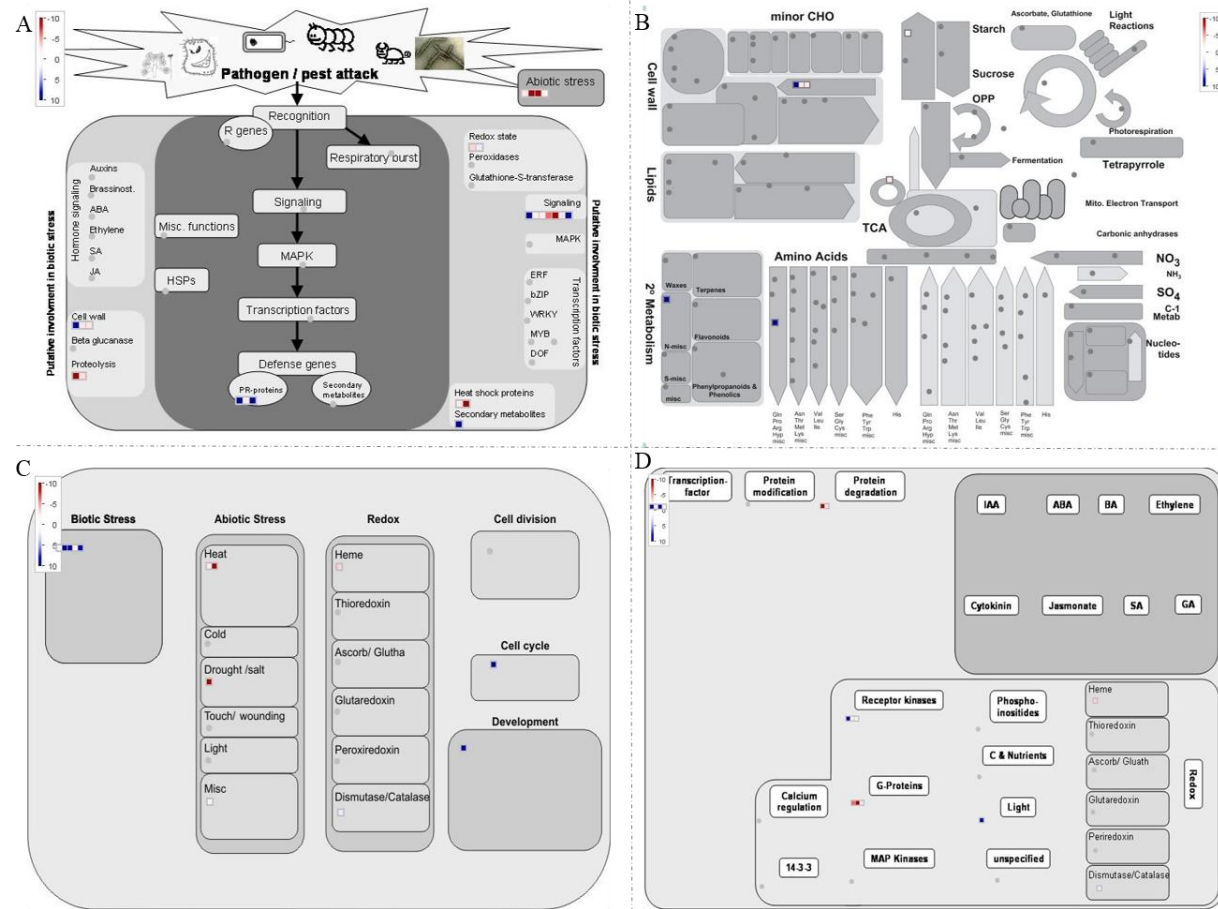


Fig. 5. Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas para o tempo de 6 h nas vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), resposta celular (C) e regulação (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.

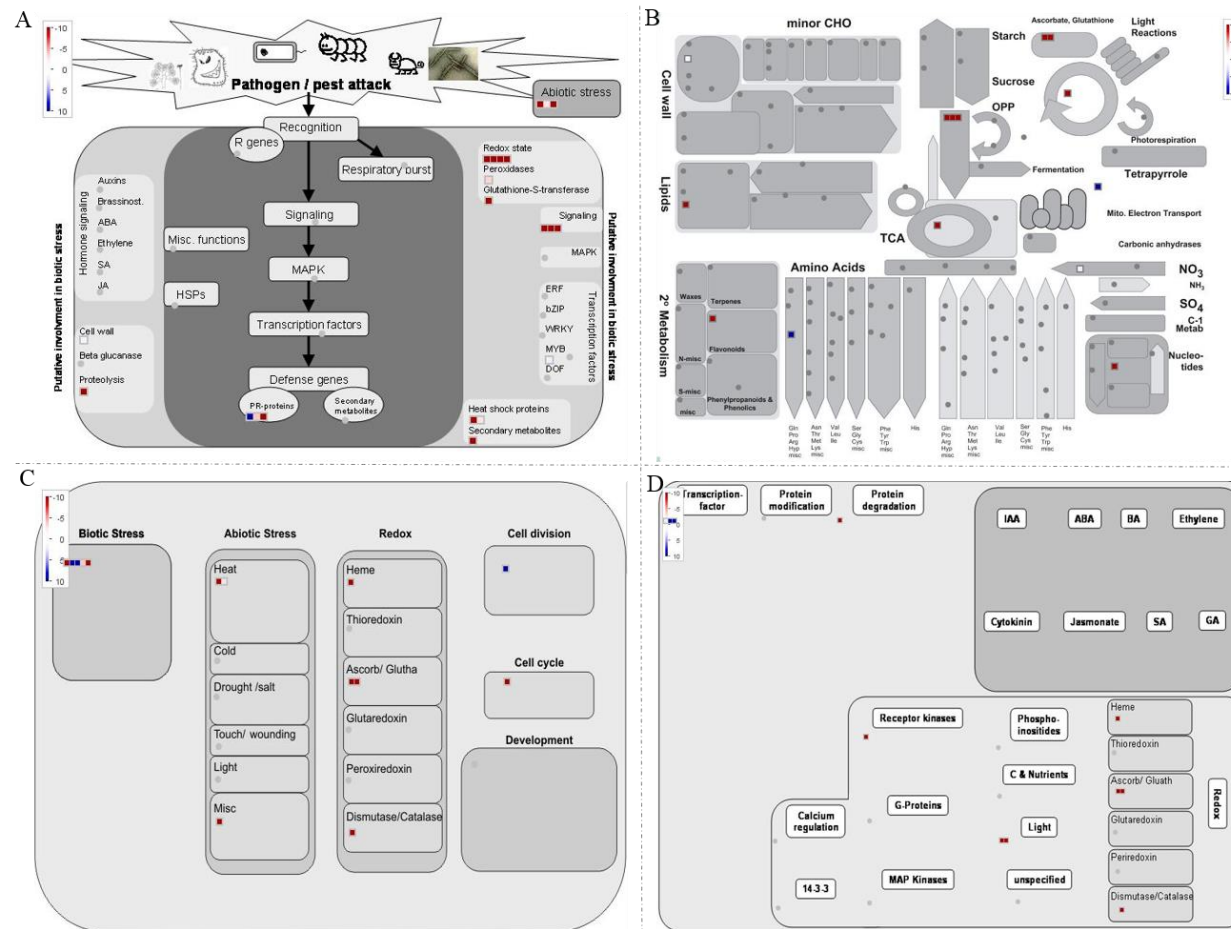


Fig. 6. Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas para o tempo de 24 h nas vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), resposta celular (C) e regulação (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.

Tabela 2. Anotação presumível de DAPs de *Stylosanthes scabra* inseridas nas possíveis vias de resposta ao déficit hídrico por 6 h pelo *software* MapMan.

Spot	Acúmulo	Status/Trat.	Proteína	Acesso*	Via (MapMan)
7	1,54	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	-	Redox
11	1,78	C.DH	Proteína relacionada à patogenicidade família bet V I	-	Estresse abiótico
18	2,15	C.DH	Proteína de resistência à doença (TIR-NBS-LRR)	-	Estresse biótico
19	1,84	C.DH	Proteína relacionada à patogenicidade família bet V I	-	Estresse biótico
69		E.DH	Proteína de ligação ao GTP extra-large	-	Sinalização
100	2,41	C.I	Transducina repetição tipo-WD	-	Sinalização
127	2,1	C.DH	Receptor quinase domínio lectina tipo L	-	Sinalização
138		E.DH	Catalase	-	Redox
157	2,35	C.DH	Proteína choque térmico	-	Estresse abiótico
187		E.DH	Proteína choque térmico 81-2	-	Estresse abiótico
189		E.DH	Família poteica dedo de zinco (Ran-binding)	-	Sinalização
223		E.I	Proteína de resistência à doença domínio LRR e NB-ARC	-	Estresse biótico
239		E.I	Proteína de resistência NBS-LRR	-	Estresse biótico
285		E.I	Proteína da família NPH3 responsiva fototrópica	-	Sinalização
301		E.I	NORK (receptor quinase nodulação)	-	Sinalização

Status: comum (C) e exclusivo (E); Tratamento (Trat.): déficit hídrico (DH), irrigado (I).

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Tabela 3. Anotação presumível de DAPs de *Stylosanthes scabra* inseridas nas possíveis vias de resposta ao déficit hídrico por 24 h pelo *software* MapMan.

Spot	Acúmulo	Status/Trat.	Proteína	Acesso*	Via (MapMan)
7	1,54	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	-	Redox
11	1,78	C.DH	Proteína relacionada à patogenicidade família bet V I	-	Estresse abiótico
19	1,56	C.DH	Inibidor de tripsina tipo Kunitz / alfa-fucosidase	-	Estresse biótico
78	3,27	C.DH	Peroxidase	-	Redox
97	2,69	C.DH	Proteína choque térmico 70 kDa	-	Estresse abiótico
121	3,81	C.DH	Inibidor de tripsina do tipo Kunitz / miraculina	-	Estresse biótico
138		E.DH	Catalase	-	Redox
199		E.DH	Glutathione S-transferase	-	Redox
202		E.DH	Glutathione S-transferase	-	Redox
206		E.DH	Proteína choque térmico 70 kDa	-	Estresse abiótico
207		E.DH	Peroxidase L-ascorbato	-	Redox
213		E.DH	Proteína domínio FAR1 ligação-DNA	-	Sinalização
241		E.DH	Proteína da família NPH3 responsiva fototrópica	-	Sinalização
243		E.DH	Lectina	-	Sinalização
280		E.I	Proteína de resistência à doença (TIR-NBS-LRR)	-	Estresse biótico

Status: comum (C) e exclusivo (E); Tratamento (Trat.): déficit hídrico (DH), irrigado (I).

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

4 Discussão

Perfil proteômico

Na análise do perfil proteômico de *S. scabra* após 6 horas de DH, 110 proteínas foram diferencialmente acumuladas e notou-se proteínas responsivas ao estresse, enquanto que após 24 horas esse número de proteínas diminuiu (85 DAPs), mas o número de proteínas associadas ao DH aumentou. A partir destes dados sugere-se que a *S. scabra* submetida ao déficit hídrico por 6 h, já percebe o estresse imposto, enquanto que para o tempo de 24 h, a planta aprimora esse mecanismo com o acúmulo de mais proteínas responsivas a condição de déficit hídrico

Ontologia gênica e enriquecimento GO

Na comparação entre os dois tempos observou um número maior de processos biológicos para o tempo de 6 h, 35 ao total, enquanto que para 24 h, 26 processos agruparam as DAPs, notou-se também que além de processos vitais para o desenvolvimento e crescimento da planta, processos relacionados à resposta à vários estímulos e resposta ao estresse foram observados, tanto para o tratamento irrigado, como para o tratamento déficit hídrico. Dois processos biológicos que incluíram cinco DAPs do DH chamam atenção, sistema imune e resposta imune, tais processos incluíram as proteínas GroEL-tipo chaperona, de resistência a doença (TIR-NBS-LRR), choque térmico (HSP 81-2), proteína relacionada a patogenicidade (PR-10) e a proteína do complexo promotor da anáfase RING-H2. Muitos dos processos biológicos que apareceram no tempo de 24 h, estão relacionados a resposta e defesa da planta, alguns dos processos que foram observados apenas no tempo 24 h, foram resposta ao estresse oxidativo, oxirredução, processo catabólico e geração de precursores metabólicos e energia. Algumas delas são: catalase, quinona oxidoreductase, fenilcoumarana benzílico éter redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ascorbato peroxidase, NADH-ubiquinona oxidoreductase subunidade B16.6, glutational S-transferase.

No enriquecimento de termos GO para processos biológicos, a resposta aos estímulos luminosos esteve presente no tempo de 6 e 24 h, indicando que vias de

resposta ao DH e vias de resposta a estímulo luminoso de alguma forma podem estar relacionadas, já que com 6 h sob déficit hídrico *S. scabra* apresentou redução significativa nas taxas de condutância estomática e assimilação líquida de CO₂. Esta hipótese já foi relada em estudos que sugerem uma forte ligação entre as respostas ao excesso de luz e o estresse hídrico, onde indicam que cerca de 70% dos genes induzidos por excesso de luz também sejam induzidos pela seca [25,26] Outra categoria GO que demonstra importância e foi observada apenas no tratamento DH no tempo de 24 h é a de resposta ao estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio induz o aumento na regulação de vários genes que se sobrepõem a genes regulados positivamente por diversas condições químicas e ambientais, tais como metil viologênio, calor, frio e seca [27,28].

Estudos têm demonstrado que, quando a planta sofre uma exposição prévia a um estresse, ela tem a capacidade de responder mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente, esse fenômeno é conhecido como *hardening* [29,30]. O que acredita-se fazer parte do “arsenal” de *S. scabra* em respostas aos estresses, já que como foi observado, o número de proteínas ligadas a eventos de estresse é considerado em um curto período de supressão de rega (6 h). Isso implica que as plantas têm a capacidade de memória (*stress imprint*) que é resultado de mudanças bioquímicas e/ou epigenéticas que ocorrem após a primeira exposição ao estresse [31].

Proteínas envolvidas na transdução de sinal

Uma proteína receptora quinase lectina do tipo L (*spot 127*) foi identificada no tempo 6 h, sendo mais acumulada no tratamento déficit hídrico. Sua análise de termo GO em processo biológico, mostra sua participação na regulação do fechamento estomático. O ABA (*Abscisic acid* – Ácido abscísico) atua como um fator chave de vias de sinalização em receptor tipo quinase (RLK) respondendo às tensões de seca e sal, e desencadeia grandes mudanças na expressão gênica e respostas fisiológicas adaptativas, incluindo crescimento radicular, fechamento estomático, modulação do crescimento vegetativo e senescência [32]. As LecRLKs (*lectin receptor-like kinases*), são receptoras e estão presentes em superfícies celulares, realizando papéis importantes na percepção e processamento de sinais que chegam à célula, além do envolvimento no desenvolvimento de plantas e respostas ao estresse Yang et al. [33]. Sua expressão foi aumentada com a privação de nitrogênio em *Medicago truncatula* e foi detectado

aumento no número de nódulos Navarro-Gochicoa et al., 2003. Em ervilha também foi observado aumento na expressão desta proteína, sugerindo tolerância a estresses abióticos como sal, seca e frio Joshi et al. [34]. Em estudo com linhagens de *Arabidopsis* transgênicas superexpressando LecRK-VI.2 foi observado o fechamento estomático constitutivo, sugerindo papel positivo para LecRK-VI.2 na regulação dos estômatos [35]. É possível que em *S. scabra* a LecRLK, apresente papel crucial na percepção do estresse e regulação estomática, já que foi observada no tempo inicial (6 h) e em análise fisiológica a condutância estomática foi significativamente reduzida em 6 h e 24 h após déficit hídrico.

A proteína FAR1 (*FAR-Red impaired response1*) (*spot* 213) de ligação ao DNA foi observada no tempo de 24 h, detectada como exclusiva no tratamento DH. Esta proteína foi identificada como regulador positivo da via de sinalização do fitocromo A (*phyA*) [36,37], sendo descrita como um fator de transcrição que atua em conjunto com *FAR-Red Honopotyl 3* (FHY3), eles atuam para ativar a expressão de FHY1 (*FAR-Red Elongated Hypocotyl1*) e FHY1-Like, que provoca a translocação nuclear de *phyA*, ativando a sinalização de *phyA* [38,39]. De acordo com Lin et al. [40] FAR1 e FHY3 compartilham homologia significativa com sequências de elementos do tipo Mutator (*Mutator-like elements* – MULEs). Estes fatores de transcrição e MULE também compartilham domínio dedo de zinco (*zinc finger*) C2H2, que tem como função a atividade de ligação ao DNA [41,39].

Chen et al. [42] realizaram levantamento dos fatores de transcrição presentes no genoma de *Arachis duranensis* e, para o fator de transcrição FAR1, identificaram 438 membros. Outro estudo realizado para analisar a expressão de genes presentes em genótipos tolerantes e sensíveis à seca de *Cicer arietinum* foi observado que FAR1 apresentou aumento na expressão no tecido radicular e no broto, sugerindo participação na resposta à seca [43]. FAR1 e FHY3 tiveram os genes inibidos em mutantes de *Arabidopsis thaliana* sugerindo que estes fatores de transcrição são regulados positivamente por sinalização de ABA e estresses abióticos, visto que, houve redução da sensibilidade à inibição mediada por ABA da germinação de sementes e crescimento de plântulas, além da regulação estomática ser prejudicada, foi detectado que quando estes fatores de transcrição não estavam ativos a abertura estomática era mais larga 5.69 ± 0.84 (μm), enquanto que na selvagem foi de 2.19 ± 0.50 (μm), indicando maior e mais rápida perda de água [44]. Acredita-se que aconteça *cross talk* entre ABA e vias de

sinalização luminosa, como nas sementes, onde o metabolismo ABA é regulado pelo fitocromo [45].

Proteínas envolvidas na resposta ao estresse

A proteína de resistência à doença que contém o domínio TIR-NBS-LRR (*spot* 18) foi identificada no tempo de 6 h, em ambos os tratamentos. Este domínio é conservado entre diferentes espécies vegetais, sejam elas relacionadas ou não e atua possivelmente na transdução de sinais, sendo o responsável por atividade de ligação ao ATP ou GTP, tais como subunidades da ATP sintetase e fatores de alongação do ribossomo [46]. Sugere-se que os genes de resistência que apresentam o NBS estão envolvidos na ativação de proteínas quinases ou proteínas de transporte [47]. Os membros dessa família se caracterizam por apresentarem um sítio de ligação de nucleotídeo (NBS), repetições ricas em leucina (LRR) e domínios amino-terminal e carboxi-terminal variáveis [48].

Dentre as respostas da planta a fatores de estresse biótico, está a reação de sensibilidade, que é uma morte celular rápida no entorno do local de infecção inicial. Benko-Iseppon et al. [49] relata que genes que resultam em Reação de Hipersensibilidade (HR) estão associados a diferentes estímulos, sendo ativado, devido à percepção patógeno, mas também sob estresse abiótico, enquanto muitos deles são constitutivamente ativos em níveis baixos, também na ausência de qualquer tipo de estresse, o que pode justificar sua presença em *S. scabra* na condição irrigada.

A proteína fenilcoumarana benzílico éter redutase (*spot* 226) foi observada como exclusiva sob déficit hídrico no tempo de 24 h. Estas proteínas, especificamente em plantas, demonstraram catalisar reações de redução nas vias biossintéticas isoflavonóides, lignanas e neolignanas, lignanos que são conhecidos por terem ação antioxidante e eliminar radicais livres causados por estresse [50,51]. Estudos relatam esta proteína ligada a resposta a estresses bióticos [52] e abióticos como seca [53,54] ritmo circadiano [55] e excesso de luz [56]. A fenilcoumarana foi mapeada como pertencente ao metabolismo secundário pelo *software* MapMan, onde foi observada na via de resposta a estresse abiótico como um metabólito secundário, indicando seu envolvimento na resposta de defesa de *S. scabra* frente a condição de déficit hídrico.

A proteína de choque térmico 81-2 (HSP - *Heat shock protein* 81-2), foi detectada como exclusiva no tratamento DH para o tempo de 6 h. Em estudo realizado

com *Arabidopsis thaliana* submetida à desidratação, alguns dos genes que apresentaram diferença na expressão, foram classificados e denominados como proteínas responsivas a desidratação precoce 2 e 8 (ERD - *early responsive dehydration*), após sequenciamento, as proteínas ERD foram anotadas como ERD2 e ERD8, sendo idênticas as HSP 70-1 e HSP81-2 de *A. thaliana* (Athsp70-1 e Athsp81-2), respectivamente. Os genes codificantes destas proteínas foram detectados como diferencialmente expressos após 2 h de desidratação e mantiveram essa expressão após 24 h [57] corroborando com os dados apresentados para *S. scabra*, que apresentou em seu perfil proteômico HSPs acumuladas nos tempos de 6 e 24 h após DH. A HSP81-2, também chamada Hsp90.2, é um membro da família gênica que codifica proteína de choque térmico 90 (Hsp90) [58]. A família de genes Hsp90 desempenha um papel fundamental nas vias de transdução de sinal, comunicação célula-a-célula, controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose [59]. O perfil proteômico do tecido radicular de *Brassica napus* demonstrou que HSP90 foi acumulada no genótipo tolerante, assim como HSP70 mostrou-se mais acumulada em *Glycine max*, ambas submetidas à seca, desempenhando papel importante para tolerância [60,61].

Dois inibidores de tripsina do tipo Kunitz (*spots* 19 e 121) foram observadas no tempo de 24 h, sendo mais acumulados no tratamento déficit hídrico. O inibidor de tripsina Kunitz foi isolado em soja, sendo o primeiro inibidor de protease de planta [62]. Estes inibidores de proteases são encontrados em plantas e codificados por genes expressos em todos os tecidos vegetais, mas principalmente em sementes de algumas leguminosas [63].

As plantas, especialmente àquelas submetidas a fatores estressantes, buscam equilibrar a biossíntese e degradação de proteínas, com o intuito de manter a homeostase para sobreviver às condições adversas. A degradação proteica indiscriminada, muitas vezes induzida por estresses bióticos ou abióticos, é deletéria para as células vegetais, prejudicando o equilíbrio do organismo [63]. A hidrólise proteica controlada acabou sendo reconhecida como fundamental para a adaptação das plantas às condições ambientais [64]. As proteases e seus inibidores endógenos específicos que regulam suas atividades, são os principais integrantes na execução e regulação da quebra de proteínas intracelulares para a manutenção da homeostase proteica. Estudos realizados com *Brassica napus* mostraram a indução do inibidor tripsina do tipo Kunitz em resposta a seca [65,66,67] na figueira a expressão deste inibidor aumentou quando submetido ao tratamento hormonal [68].

Sistema redox

A hemoglobina não simbiótica foi identificada em quatro *spots* (10, 15, 16 e 17) no tempo de 6 h e em dois *spots* (7 e 179) no tempo de 24 h, todos no tratamento DH. Esta proteína pertence à família das hemoglobinas, que nas plantas podem ser: hemoglobinas simbióticas, não-simbióticas e truncadas. As não simbióticas podem ser classificadas na classe 1 (nsHb1, GLB1) e classe 2 (nsHb2, GLB2) que exibem diferentes propriedades de ligação ao oxigênio e padrões de expressão gênica [69,70]. Estudos relatam que o gene nsHb1 apresentara aumento na expressão sob estresses abióticos como osmótico, salino e submersão [71]. Montilla-Bascón et al. [72] relata que o gene da hemoglobina não simbiótica de *Hordeum vulgare* (HvHb1), foi superexpresso em cevada transgênica submetida à seca e foi observado que HvHb1 oxida o NO (óxido nítrico) ao NO_3^- (nitrato), essa redução na produção de NO foi associada a tolerância à seca em cevada transgênica. Estudos indicam que durante a indução do fechamento estomático, o ABA induz a produção de NO juntamente com um aumento no H_2O_2 e pH citoplasmático [73,74]. Em trigo o fechamento estomático provocado por doadores de NO aplicados exogenamente, conferiu tolerância à desidratação [75], o que corrobora com análise fisiológica realizada com *S. scabra* (dados não publicados), em que foi observado que a condutância estomática foi significativamente reduzida em 6 h e 24 h, indicando rápido fechamento estomático.

A principal característica na biologia do NO é a modificação pós-transcricional (PTM) da cisteína (S-nitrosilação) e resíduos de tirosina (nitração) de proteínas que podem mudar sua atividade, localização ou estado de agregação [76,77,78]. As proteínas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio e redox compreendem um grupo de alvos desses PTM dependentes de NO e podem ser fundamentais nas respostas das plantas às mudanças ambientais [78].

Entre as proteínas envolvidas na via de antioxidantes, está a enzima Glutathione S-transferase (GST) (*spots* 199, 202 e 203) observada como exclusiva no tratamento déficit hídrico para o tempo 24 h. A glutathione S-transferase está incluída em uma grande superfamília de enzimas que participam da desintoxicação de compostos xenobióticos e na atenuação de estresses oxidativos, por meio da conjugação da glutathione tripeptídica com substratos hidrofóbicos. Em consonância com nossos resultados, um aumento no acúmulo desta enzima foi relatado em raízes de trigo

submetido ao déficit hídrico [79], em *A. thaliana* transgênica sob estresse salino e seca [80] e na planta típica do deserto Saara *Oudneya africana*, submetida ao déficit hídrico. Neste último, uma análise de componente principal mostrou a correlação de GST, ácido deidroascórbico e ácido ascórbico durante o estresse médio (quatro dias), sugerindo que a planta dispõe a capacidade de acionar um complexo sistema de defesa antioxidante que participa da regulação da tolerância à seca e que uma maior exposição ao estresse médio tem um efeito mais forte do que períodos mais curtos em maior intensidade [81].

Glicólise

As raízes dependem da glicólise para manter os níveis de energia além de precursores do anabolismo, como aminoácidos e ácidos graxos [82]. Em estudo realizado com videira sob déficit hídrico, o perfil proteômico indicou aumento no acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e malato desidrogenase [83], o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo, onde a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase mostrou maior acúmulo em DH e fosfoglicerato quinase e malato desidrogenase foram exclusivas no mesmo tratamento. O fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bisfosfoglicerato também foi observado como exclusivo no DH, esta enzima foi observada em análise proteômica de raízes de pepino sob estresse por nitrato de cálcio, seca e hormônio [84,85], onde tiveram seus níveis aumentados. Zhao e Assmann et al. [86] ainda relatam o envolvimento desta enzima e da atividade glicolítica no funcionamento das células guarda, consequentemente, no movimento estomático de *A. thaliana* mutantes.

5 Conclusão

O proteoma de *Stylosanthes scabra* submetido ao déficit hídrico por 6 h, mostrou-se significativamente responsivo aos fatores de estresse abiótico. Muitas proteínas identificadas estão envolvidas em resposta ao estímulo e resposta ao estresse, mesmo no tratamento irrigado, indicando que *Stylosanthes scabra*, pode utilizar-se de um evento conhecido como *hardening*, respondendo mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente.

O perfil proteômico de *S. scabra* após 24 h sob déficit hídrico demonstrou investimento na resposta a condição imposta, com um número maior de proteínas responsivas ao estresse, enzimas antioxidantes e proteínas envolvidas na glicólise.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado vinculada ao projeto de pesquisa Estudo das respostas fisiológicas, genéticas e bioquímicas a estresses abióticos em plantas cultivadas e nativas da Caatinga (Edital Capes-Embrapa 15/2014). Os autores agradecem à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Embrapa Semiárido (CPATSA), ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e ao Centro de Proteômica Avançada da Universidade de Washington (UW, Seattle, Washington, EUA).

6 Referências

- [1] O.J. Idowu, O.M. Arigbede, P.A. Dele, J.A. Olanite, O.O. Adelusi, V.O Ojo, A.S. Sunmola, Nutrients intake, performance and nitrogen balance of West African dwarf sheep fed graded levels of toasted *Enterolobium cyclocarpum* seeds as supplement to *Panicum maximum*. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 16 (2013) 1806-1810.
- [2] B. Mendieta-Araica, E. Spörndly, N. Reyes-Sánchez, L. Norell, R. Spörndly, Silage quality when *Moringa oleifera* is ensiled in mixtures with Elephant grass, sugar cane and molasses. *Grass and Forage Science* 64 (2009) 364-373.
- [3] M. Pen, D.B. Savage, J.V. Nolan, M. Seng, Effect of *Stylosanthes guianensis* supplementation on intake and nitrogen metabolism of *Bos indicus* cattle offered a basal diet of mixed rice straw and tropical grass. *Animal Production Science* (2013) 453–457
- [4] J.J. Baloyi, N.T. Ngongoni, H. Hamudikuwanda, Milk production by Saanen does given forage and a tree browse legume as supplements to the conventional dairy concentrate and a basal diet of Katambora Rhodes (*Chloris gayana*) grass hay. *South African Journal Education and Science Technology* (2006) 58–64.
- [5] D. Sengupta, M. Kannan, A.R. Reddy, A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta* (2011) 1111-1127.
- [6] E.Gil-Quintana, D. Lyon, C. Staudinger, S. Wienkoop, E.M. González, *Medicago truncatula* and *Glycine max*: different drought tolerance and similar local response of the root nodule proteome. *Journal of proteome research* 14 (2015) 5240-5251.
- [7] D. Nagaich, K.K. Tiwari, N. Srivastva, A. Chandra, Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. *Acta physiologiae plantarum* 35 (2013) 3127-3136.
- [8] N.D.S. Costa, Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw. (2006).
- [9] L.C. Costa, Â.L.B. Sartori, A. Pott, Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae—Papilionoideae—Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rodriguesia* (2008) 547-572.

- [10] A.P.F. Perez, *Stylosanthes* (Leguminosae–Papilionoideae–Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil. Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2011) 89.
- [11] CRIA (CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL). Species link. *Stylosanthes scabra*. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>. Acesso em 25 de abril de 2017.
- [12] S.X. Chen, A.C. Harmon, Advances in plant proteomics. *Proteomics* (2006) 5504-5516.
- [13] F.M. Cánovas, E.D. Gaudot, G. Recorbet, J. Jorin, H.P. Mock, M. Rossingol, Plant proteome analysis. *Proteomics* (2004) 285–298.
- [14] C.M. Pacheco, M.C. Pestana-Calsa, F.C. Gozzo, R.J. Mansur Custodio Nogueira, M. Menoss, T. Calsa Junior, Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *Journal of proteome research* (2013) 5681-5695.
- [15] A. Hashiguchi, N. Ahsan, S. Komatsu, Proteomics application of crops in the context of climate changes. *Food Res Int* 43 (2010) 1803–1813.
- [16] W.J. Hurkma, C.K. Tanaka, Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology* (1986) 802-806.
- [17] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 48-254.
- [18] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P.G. Righetti, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25 (2004) 1327-1333.
- [19] J. Webster, D. Oxley, Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Chemical Genomics: Reviews and Protocols* (2005) 227-240.
- [20] M. Vaudel, H. Barsnes, F.S. Berven, A. Sickmann, L. Martens, SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X! Tandem searches. *Proteomics* 11 (2011) 996-999.
- [21] M. Vaudel, J.M. Burkhardt, R.P. Zahedi, E. Oveland, F.S. Berven, A. Sickmann, H. Barsnes, PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nature biotechnology* 33 (2015) 22-24.
- [21] S. Conesa, J.M. Götz, J. Garcia-Gomez, M. Terol, M. Talon, "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research", *Bioinformatics* 21 (2005) 3674-3676.
- [22] T. Tian, Y. Liu, H. Yan, Q. You, X. Yi, Z. Du, Z. Su, agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research* 45(W1) (2017) W122-W129.
- [23] O. Thimm, O. Bläsing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Krüger, M. Stitt, MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37 (2004) 914-939.
- [24] D.M. Riaño-Pachón, A. Nagel, J. Neigenfind, R. Wagner, R. Basekow, E. Weber, B. Kersten, The GABI Primary Database: GABIPD–Integration of Plant ‘Omics’-Data in Gene Context (2009).
- [25] M. Kimura, Y.Y. Yamamoto, M. Seki, T. Sakurai, M. Sato, T. Abe, S. Yoshida, K. Manabe, K. Shinozaki, M. Matsui, Identification of *Arabidopsis* genes regulated by

- high light- stress using cDNA microarray. *Photochemistry and Photobiology* **77** (2003) 226–233.
- [26] G.M. Estavillo, P.A. Crisp, W. Pornsiriwong, M. Wirtz, D. Collinge, C. Carrie, C. Brearley, Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* (2011) tpc-111.
- [27] S. Vandenabeele, S. Vanderauwera, M. Vuylsteke, S. Rombauts, C. Langebartels, H.K. Seidlitz, F. Van Breusegem, Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39 (2004) 45–58.
- [28] S. Vanderauwera, P. Zimmermann, S. Rombauts, S. Vandenabeele, C. Langebartels, W. Gruissem, F. Van Breusegem, Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* **139** (2005) 806–821.
- [29] J. Walter, L. Nagy, R. Hein, U. Rascher, C. Beierkuhnlein, E. Willner, A. Jentsch, Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany* **71** (2011) 34–40.
- [30] R. Rivas, M.T. Oliveira, M.G. Santos, Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* **63** (2013) 200–208.
- [31] T.J.A. Bruce, M.C. Metthes, J.A. Napier, J.A. Pickett, Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* **173** (2007) 173:603–608.
- [32] H. Kim, H. Hwang, J.W. Hong, Y.N. Lee, I.P. Ahn, I.S. Yoon, S.D. Yoo, S. Lee, S.C. Lee, B.G. Kim, A rice orthologue of the ABA receptor, OsPYL/RCAR5, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth. *J Am Inst Conserv* **63** (2012) 1013–1024.
- [33] Y. Yang, J. Labbé, W. Muchero, X. Yang, S.S. Jawdy, M. Kennedy, J.G. Chen, Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinases in *Populus*. *BMC genomics* **17** (2016) 699.
- [34] A. Joshi, H.Q. Dang, N. Vaid, N. Tuteja, Pea lectin receptor-like kinase promotes high salinity stress tolerance in bacteria and expresses in response to stress in planta. *Glycoconj. J.* **27** (2010) 133–150.
- [35] P. Singh, Y.C. Kuo, S. Mishra, C.H. Tsai, C.C. Chien, C.W. Chen, T. Boller, The lectin receptor kinase-VI. 2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *The Plant Cell* (2012) tpc-112.
- [36] M. Hudson, C. Ringli, M.T. Boylan, P.H. Quail, The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev* **13** (1999) 2017–2027.
- [37] H. Wang, X.W. Deng, *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J* **21** (2002) 1339–1349.
- [38] A. Hiltbrunner, A. Tscheuschler, A. Viczián, T. Kunkel, S. Kircher, E. Schäfer, FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* **47** (2006) 1023–1034.
- [39] R. Lin, L. Ding, C. Casola, D.P. Ripoll, C. Feschotte, H. Wang, Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **318** (2007) 1302–1305.

- [40] R. Lin, Y. Teng, H.J. Park, L. Ding, C. Black, P. Fang, H. Wang, Discrete and essential roles of the multiple domains of Arabidopsis FHY3 in mediating phytochrome A signal transduction. *Plant Physiol* 148 (2008) 981–992.
- [41] M.M. Babu, L.M. Iyer, S. Balaji, L. Aravind, The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 6505–6520.
- [42] X. Chen, H. Li, M.K. Pandey, Q. Yang, X. Wang, V. Garg, H. Upadhyaya, Draft genome of the peanut A-genome progenitor (*Arachis duranensis*) provides insights into geocarpy, oil biosynthesis, and allergens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (2016) 6785–6790.
- [43] K.M. Mashaki, V. Garg, A.A.N. Ghomi, H. Kudapa, A. Chitikineni, K.Z. Nezhad, M. Thudi, RNA-Seq analysis revealed genes associated with drought stress response in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PloS one*, 13 (2018) e0199774.
- [44] W. Tang, Q. Ji, Y. Huang, Z. Jiang, M. Bao, H. Wang, R. Lin, FHY3 and FAR1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant physiology* (2013) 113.
- [45] M. Seo, A. Hanada, A. Kuwahara, A. Endo, M. Okamoto, Y. Yamauchi, Y. Kamiya, Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* 48 (2006) 354–366.
- [46] W.I. Tameling, C. Nooijen, N. Ludwig, M. Boter, E. Slootweg, A. Goverse, K. Shirasu, M.H. Oosten, RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *Plant Cell* (2010) 4176–4194.
- [47] K.E. Hammond-Kosack, J.D.G. Jones, Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol* 48 (1997) 575–607.
- [48] L. McHale, X. Tan, P. Koehl, C.W. Micheltore, Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards REVIEW. *Genome Biology* (2006) 7:212.
- [49] A.M. Benko-Iseppon Brazilian cowpea transcriptome project: over 20 million expressed sequence tags to analyze and breed salinity and virus resistance. *Resumos do III Congresso Brasileiro de Biotecnologia* (2010) 97–98.
- [50] X. Wang, Z. Liu, L. Niu, B. Fu, Long-term effects of simulated acid rain stress on a staple forest plant, *Pinus massoniana* Lamb: a proteomic analysis. *Trees*, 27 (2013) 297–309.
- [51] C. Niculaes, K. Morreel, H. Kim, F. Lu, L.S. McKee, B. Ivens, J. Fromm, Phenylcoumaran benzylic ether reductase prevents accumulation of compounds formed under oxidative conditions in poplar xylem. *The Plant Cell* (2014) tpc-114.
- [52] X. Wang, J. Lu, H. Chen, Z. Shan, X. Shen, B. Duan, S. Chen, Comparative analyses of transcriptome and proteome in response to cotton bollworm between a resistant wild soybean and a susceptible soybean cultivar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 129 (2017) 511–520.
- [53] A. Pandey, S. Chakraborty, A. Datta, N. Chakraborty, Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & cellular proteomics*, 7 (2008) 88–107.
- [54] H. Zhang, Z. Ni, Q. Chen, Z. Guo, W. Gao, X. Su, Y. Qu, Proteomic responses of drought-tolerant and drought-sensitive cotton varieties to drought stress. *Molecular genetics and genomics*, 291 (2016) 1293–1303.

- [55] S.L. Harmer, J.B. Hogenesch, M. Straume, H.S. Chang, B. Han, T. Zhu, X. Wang, J.A. Kreps, S.A. Kay, Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290 (2000) 2110–2113
- [56] M.H. Nam, E.J. Heo, J.Y. Kim, S.I. Kim, K.H. Kwon, J.B. Seo, O. Kwon, J.S. Yoo, Y.M. Park, Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* CA Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data. *Proteomics* (2003) 2351–2367.
- [57] T. Kiyosue, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant molecular biology*, 25 (1994) 791-798.
- [58] P. Krishna, G. Gloor, The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*, 6 (2001) 238.
- [59] J. C. Young, I. Moarefi, Hartl, Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, 154 (2001) 267-274.
- [60] P. P. Mohammadi, A. Moieni, S. Komatsu, Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids*, 43 (2012) 2137-2152.
- [61] X. Yu, A. Yang, A.T. James, Comparative proteomic analysis of drought response in roots of two soybean genotypes. *Crop and Pasture Science*, 68 (2017) 609-619.
- [62] M. Kunitz, Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101 (1945) 668-669.
- [63] M. Kidrič, J. Kos, J. Sabotič, Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Bot Serb*, 38 (2014) 139-158.
- [64] R.D. Vierstra, Proteolysis in plants: mechanisms and functions. In *Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants* (pp. 275-302). Springer, Dordrecht (1996)
- [65] W. L. Downing, F. Mauxion, M.O. Fauvarque, M.P. Reviron, D. De Vienne, N. Vartanian, J. Giraudat, A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *The Plant Journal*, 2 (1992) 685-693.
- [66] G. Ilami, C. Nespoulous, J.C. Huet, N. Vartanian, J.C. Pernollet, Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* 45 (1997) 1-8.
- [67] M. Desclos, L. Dubousset, P. Etienne, F. Le Caherec, H. Satoh, J. Bonnefoy, J.C. Avice, A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology*, 147 (2008) 1830-1844.
- [68] J.S. Kim, Y.O. Kim, H.J. Ryu, Y.S. Kwak, J.Y. Lee, H. Kang, Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant and cell physiology*, 44 (2003) 412-414.
- [69] B. Trevaskis, R.A. Watts, C.R. Andersson, D.J. Llewellyn, M.S. Hargrove, J.S. Olson, W.J. Peacock, Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 12230-12234.

- [70] S.M. Duff, J.B. Wittenberg, R.D. Hill, Express , purificação e propriedades da hemoglobina de cevada recombinante (*Hordeum* sp.). Espectros ópticos e reações com ligantes gasosos . *J Biol Chem* 272 (1997) 16746 – 16752.
- [71] L. Zhao, R.L. Gu, P. Gao, G.Y. Wang, A nonsymbiotic hemoglobin gene from maize, ZmHb, is involved in response to submergence, high-salt and osmotic stresses. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95 (2008) 227–237.
- [72] G. Montilla-Bascón, D. Rubiales, K.H. Hebelstrup, J. Mandon, F.J. Harren, S.M. Cristescu, E. Prats, Reduced nitric oxide levels during drought stress promote drought tolerance in barley and is associated with elevated polyamine biosynthesis. *Scientific reports*, 7 (2017) 13311.
- [73] J. Bright, R. Desikan, J.T. Hancock, I.S. Weir, S.J. Neill, ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45 (2006) 113–122.
- [74] S.J. Neill, R. Desikan, A. Clarke, J.T. Hancock, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128 (2002) 13–16.
- [75] C. Garcia-Mata, L. Lamattina, Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126 (2001) 1196–1204.
- [76] J.M. Souza, G. Peluffo, R. Radi, Protein tyrosine nitration–functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 45(2008) 357–366.
- [77] A. Martinez-Ruiz, S. Cadenas, S. Lamas, Nitric oxide signaling: classical, less classical, and non classical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 17–29.
- [78] M.C. Romero-Puertas, M. Rodríguez-Serrano, L.M. Sandalio, Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in plant science*, 4 (2013) 373.
- [79] E. Faghani, J. Gharechahi, S. Komatsu, M. Mirzaei, R.A. Khavarinejad, F. Najafi, G.H. Salekdeh, Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal of proteomics* 114 (2015) 1–15.
- [80] J. Xu, X.J. Xing, Y.S. Tian, R.H. Peng, Y. Xue, W. Zhao, Q.H. Yao, Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. *PloS one*, 10 (2015) e0136960.
- [81] S. Talbi, M.C. Romero-Puertas, A. Hernández, L. Terrón, A. Ferchichi, L.M. Sandalio, Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: role of antioxidant defences. *Environmental and Experimental Botany* 11 (2015) 114–126.
- [82] W. Plaxton The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology* 47 (1996) 185–214.
- [83] G.R. Cramer, S.C. van Sluyter, D.W. Hopper, D. Pascovici, T. Keighley, P.A. Haynes, Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to water deficit. *BMC Plant Biol* (2013) 13:49.
- [84] Y. An, H. Zhou, M. Zhong, J. Sun, S. Shu, Q. Shao, S. Guo, Root proteomics reveals cucumber 24-epibrassinolide responses under Ca (NO₃)₂ stress. *Plant cell reports*, 35 (2016) 1081–1101.
- [85] C. Li, B. Bian, T. Gong, W. Liao, Comparative proteomic analysis of key proteins during abscisic acid-hydrogen peroxide-induced adventitious rooting in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under drought stress. *Journal of plant physiology* 229 (2018) 185–194.

[86] Z. Zhao, S.M. Assmann, The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 62 (2011) 5179-5189.

Anexo 1. Anotação presumível de DAPs de *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico por 6 h.

Spot	Acúmulo	Status /Trat.	Proteína	S.C (%)	Ms/pI (T)	Ms/pI (O)	Acesso*	Peptide*
10	2,52	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	9	13808/8.85	15.14/9.07	-	-
12	1,63	C.DH	Lectina domínio beta de leguminosas	3	31655/5.03	20.40/6.58	-	-
15	3,35	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	48	16316/7.88	15.15/8.11	-	-
16	2,43	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	11	11565/6.95	15.48/7.89	-	-
17	2,48	C.DH	Hemoglobina não simbiótica	9	13808/8.85	15.29/8.42	-	-
18	2,15	C.DH	Proteína de resistência à doença (TIR-NBS-LRR)	2.40	85.66	15.72/7.25	-	-
19	1,84	C.DH	Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V	9	17481/6.31	16.81/7.05	-	-
33	1,82	C.DH	U5 helicase ribonucleoproteína nuclear pequena 200 kDa	12	11.66	25.21/7.93	-	-
37	2,49	C.DH	Enzima biossintética de ramnose	3.81	23.96	27.07/5.53	-	-
45	1,56	C.DH	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	29232/5.95	29.51/5.12	-	-
48	1,68	C.DH	Glucose-1-fosfato adenililtransferase	6.90	35.12	30.52/6.93	-	-
51	2,59	C.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	31568/5.85	20.07/4.76	-	-
57	2,89	C.DH	Diol-dissulfeto oxirredutase DCC	10.48	14.37	31.84/7.93	-	-
66	1,58	C.DH	Proteína da família da hidrolase glicosilada 18	10.14	31.12	32.86/9.17	-	-
69		E.DH	Proteína de ligação ao GTP extra grande	1.66	54.26	38.39/6.66	-	-
87	1,68	C.DH	Antígeno nuclear de proliferação celular	8.40	13.17	49.25/7.83	-	-
96	2,11	C.DH	Transferência de elétrons flavoproteína ubiquinona oxidoreductase	27	49072/8.20	54.34/9.24	-	-
100	2,41	C.I	Transducina / proteína repetida semelhante a WD	5	17.16	59.93/6.11	-	-
102	2,28	C.I	Catalase	40	53102/6.78	57.00/7.80	-	-
116	3,25	C.DH	Chaperone tipo GroEL, ATPase	6	21549/4.75	57.18/5.59	-	-
122		E.DH	Proteína semelhante à condensação cromossômica	9.17	12.37	65.69/7.03	-	-
127	2,1	C.DH	Receptor quinase do domínio L do tipo L de lectina S.4	2.19	76.34	71.58/4.60	-	-
153	2,35	C.DH	Piruvato ortofosfato dikinase	1.53	105.40	98.56/6.31	-	-
157	2,35	C.DH	GATA tipo proteína da família do fator de transcrição do dedo do zinco	16.16	10.99	34.28/5.84	-	-
160	3,04	C.DH	Proteína de ligação a GTP EngB, putativo	3.01	52.03	51.90/8.36	-	-
161	2,91	C.I	Proteína da família acil-esterase Pmr5 / Cas1p GDSL / SGNH	4.11	25.46	59.85/5.91	-	-
162	1,56	C.I	Repetição de Ankyrin e proteína do domínio BTB / POZ	3.63	68.37	23.61/4.36	-	-
175	1,75	C.I	PPR contendo proteína semelhante a planta	3.25	31.40	22.20/5.75	-	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Spot	Acúmulo	Status /Trat.	Proteína	S.C (%)	Ms/pI (T)	Ms/pI (O)	Acesso*	Peptide*
181		E.DH	Protease de cisteína semelhante à cathepsina B	4.64	41.19	33.21/3.94		-
182		E.DH	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2	30982/5.66	34.30/4.72		-
185		E.DH	Proteína tipo serina / treonina-quinase abkC, putativa	2.09	43.40	23.78/4.94		-
187		E.DH	Proteína de choque térmico 81-2	4.75	38.58	27.19/4.34	-	-
188		E.DH	Proteína quinase não específica de serina / treonina	6.13	17.44	27.54/5.15	-	-
189		E.DH	Proteína da família dedo de zinco (Ran-binding)	1.91	52.73	30.24/9.47	-	-
191		E.DH	Subunidade complexa promotora de anáfase 11 proteína dedo RING-H2	5.29	24.99	32.78/4.42	-	-
220		E.I	Fator de resposta auxiliar	2.22	39.08	17.01/4.23	-	-
222		E.I	Ligase aspartato-tRNA	2.14	41.59	18.07/4.96	-	-
223		E.I	Proteína de resistência a doenças do domínio LRR e NB-ARC	6.98	14.83	17.46/6.10	-	-
224		E.I	Proteína da família RNA-binding (RRM / RBD / RNP motif)	5.77	17.30	18.11/6.19	-	-
229		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2.86	30.98	14.08/4.63	-	-
231		E.I	Proteína relacionada com WAT1	4.17	23.60	16.53/5.79	-	-
232		E.I	Proteína relacionada com WAT2	4.17	23.60	17.22/5.81	-	-
236		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2.86	30.98	19.10/5.31	-	-
237		E.I	Proteína do domínio DUF1767	6.87	14.66	20.21/7.75	-	-
239		E.I	Proteína de resistência NBS-LRR	1.44	63.39	28.73/6.81	-	-
240		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	3.92	27.30	30.52/4.59	-	-
242		E.I	Proteína Ras Rab7, putativo	2.95	46.82	31.40/4.13	-	-
243		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2.86	30.98	31.27/4.35	-	-
244		E.I	Succinato-semialdeído desidrogenase	7.26	26.68	33.18/7.13	-	-
247		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4.27	31.35	34.57/5.42	-	-
249		E.I	Proteína do domínio CBS	2.70	33.56	36.38/7.54	-	-
252		E.I	Proteína ribossômica 40S S6	6.67	15.72	39.25/5.60	-	-
267		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	3.92	27.30	54.47/5.08	-	-
268		E.I	PPR contendo proteína semelhante a planta	3.25	31.40	54.27/5.19	-	-
270		E.I	Proteína da família das ciclinas, putativa	2.16	41.32	54.66/4.98	-	-
275		E.I	N-acetil-gama-glutamyl-fosfato redutase	5.44	15.93	57.08/5.51	-	-
276		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2.80	35.33	57.07/4.97	-	-
280		E.I	Proteína do domínio D111 / G-patch	2.45	34.71	58.31/6.03	-	-
281		E.I	L-fucosinase / GDP-L-fucose pirofosforil	1.01	97.39	57.09/7.63	-	-
283		E.I	Proteína da família RWP-RK reguladora de plantas	3.01	41.96	61.63/6.24	-	-
285		E.I	Proteína da família NPH3 responsiva fototrópica	5.67	15.84	66.45/6.03	-	-
292		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	3.92	27.30	77.19/5.06	-	-
301		E.I	NORK	6.90	12.82	116.873/6.40	-	-
303		E.I	Proteína de domínio zim Jasmonate	4.3	27.57	29.38/3.09	-	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Anexo 2. Anotação presumível de DAPs de *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico por 24 h.

Spot	Acúmulo	Status / Trat.	Proteína	S.C (%)	Ms/pI (T)	Ms/pI (O)	Acesso*	Peptide*
7	1,54	C.DH	Hemoglobina não-simbiótica	12	13808/8.85	15.97/9.08	-	-
11	1,78	C.DH	Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V I	9	17481/6.31	17.63/7.18	-	-
14	1,51	C.DH	Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V I	9	17373/5.97	18.19/6.33	-	-
15	1,95	C.DH	Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V I	9	17461/7.03	17.90/7.57	-	-
17	2,54	C.DH	Cátion vacuolar / trocador de prótons	2.31	55.96	18.83/6.96	-	-
19	1,56	C.DH	Inibidor de tripsina tipo Kunitz / alfa-fucosidase	4	22552/4.70	20.11/4.57	-	-
23	2,49	C.DH	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	30773/5.88	23.32/6.23	-	-
24	1,54	C.I	Proteína do domínio fasciclina	4.89	19.86	22.46/7.11	-	-
44	1,65	C.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	29232/5.95	31.38/5.08	-	-
47	2,99	C.I	Porin / proteína do canal seletivo de ânion dependente de voltagem	11	11174/7.11	33.23/8.83	-	-
56	1,93	C.I	Proteína tipo fator de transcrição de Myb	1.28	71.01	36.01/6.32	-	-
59	3,04	C.DH	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato	4	36611/7.72	40.12/7.47	-	-
78	3,27	C.DH	Peroxidase	5	25548/5.05	49.73/7.10	-	-
97	2,69	C.DH	Proteína de choque térmico de 70 kDa	1	75550/5.34	81.48/4.80	-	-
106	2,03	C.I	Sintetase de glutamina	16	11325/9.43	45.23/6.09	-	-
108		E.DH	Ciclina	6.30	14.54	21.23/5.36	-	-
109	1,97	C.DH	Proteína responsiva ABA	9.86	15.21	20.01/5.11	-	-
110	2,22	C.DH	Proteína responsiva ABA	9	15206/5.06	20.05/4.96	-	-
115	1,72	C.I	Chaperone tipo GroEL, ATPase	13	13159/8.18	63.79/5.43	-	-
116	2,27	C.I	Chaperone tipo GroEL, ATPase	6	27759/6.06	64.37/5.25	-	-
119	2,97	C.DH	Beta da subunidade da sintase de ATP	3	44546/6.43	58.33/5.31	-	-
121	3,81	C.DH	Inibidor de tripsina do tipo Kunitz / miraculina	6	25724/7.15	23.55/4.66	-	-
124	2,09	C.DH	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato	4	36611/7.72	40.25/8.68	-	-
131	2,53	C.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	31568/5.85	33.52/4.34	-	-
138		E.DH	Catalase	19	53102/6.78	63.46/6.87	-	-
149		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	5	34157/8.54	30.80/3.10	-	-
150		E.I	Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	2	30982/5.66	33.64/3.12	-	-
179		E.DH	Hemoglobina não-simbiótica	11	11565/6.95	16.15/6.76	-	-
180		E.DH	Nucleoside difosfato quinase	10	16414/6.30	16.99/6.59	-	-
181		E.DH	Inibidor de tripsina tipo Kunitz / alfa-fucosidase	6	23552/5.04	17.30/4.01	-	-
182		E.DH	Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V I	60	17340/6.31	17.11/6.91	-	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

Continua

Spot	Acúmulo	Status /Trat.	Proteína	S.C (%)	Ms/pI (T)	Ms/pI (O)	Acesso*	Peptide*
184	E.DH		Fosfoglicerato quinase	4	42485/6.57	17.92/5.72	-	-
185	E.DH		Proteína relacionada à patogênese aposta proteína da família V I	7	17481/6.31	18.20/6.73	-	-
197	E.DH		Quinona oxirredutase	10	16305/5.87	27.96/6.15	-	-
199	E.DH		Glutathione S-transferase	8	23619/5.80	28.53/5.86	-	-
202	E.DH		Glutathione S-transferase	37	22087/5.82	29.35/5.84	-	-
203	E.DH		Glutathione S-transferase	5	22087/5.82	20.20/6.11	-	-
205	E.DH		Dedo de zinco, C3HC4 tipo (dedo do dedo) proteína	3.42	27.39	31.42/9.29	-	-
206	E.DH		Choque térmico Proteína de 70 kDa	2.89	38.41	30.90/6.02	-	-
207	E.DH		Peroxidase L-ascorbato	7	27095/5.52	31.34/5.71	-	-
212	E.DH		Proteína do domínio beta de lectina de leguminosas	4	31568/5.85	32.45/4.57	-	-
213	E.DH		Proteína do domínio de ligação ao DNA FAR1	2.01	91.56	32.86/7.50	-	-
214	E.DH		Porin / proteína do canal seletivo de ânion dependente de voltagem	11.54	11.17	33.49/8.50	-	-
216	E.DH		Proteína domínio beta de lectina de leguminosas	2	30982/5.66	33.28/4.21	-	-
219	E.DH		Proteína da família UDP-glicosiltransferase	2.62	46.76	38.47/8.03	-	-
221	E.DH		U4 / U6 ribonucleoproteína nuclear semelhante a Prp3	2.85	94.88	37.86/3.82	-	-
222	E.DH		Malato desidrogenase	4.94	33.82	39.96/6.52	-	-
224	E.DH		Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato	4	36611/7.72	40.52/7.47	-	-
226	E.DH		Fenilcoumarana benzílico éter redutase	3	33853/5.41	41.35/6.23	-	-
235	E.DH		C2 ligação cálcio / lipídio e proteína do domínio GRAM	2.34	53.60	61.16/5.83	-	-
241	E.DH		Proteína da família NPH3 responsiva fototrópica	5.67	15.84	79.32/6.59	-	-
242	E.DH		Fosfoglicerato mutase independente 2,3-bisfosfoglicerato	2	61298/5.74	78.55/6.48	-	-
243	E.DH		Lectina	3	22572/4.83	79.91/6.06	-	-
249	E.DH		Subunidade NADH-ubiquinona oxirredutase B16.6	8.73	14.42	93.63/5.84	-	-
271	E.DH		Isoflavona-7-O-metiltransferase	12.75	11.33	79.91/5.93	-	-
272	E.I		Proteína proteinase aspártica tipo nepentesina	3	34350/9.67	48.60/9.96	-	-
273	E.I		Shugoshina	3.33	33.85	32.23/9.78	-	-
278	E.I		N-acetil-gama- glutamil-fosfato redutase	5.44	15.93	54.07/5.11	-	-
280	E.I		Proteína de resistência a doenças (TIR-NBS-LRR)	4.79	32.44	52.13/8.36	-	-
283	E.I		Proteína semelhante a L8 ribossômica 60S	7.69	11.35	62.24/7.58	-	-
286	E.I		Fator de Uro-aderência A	4.41	30	73.59/6.61	-	-

*Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

3.3 ARTIGO 3

Artigo a ser submetido ao Journal BBA - Proteins and Proteomics

Análise proteômica quantitativa de alto desempenho em raízes de *Stylosanthes scabra* Vogel sob déficit hídrico

Sheyla Carla Barbosa da Silva Lima¹, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva¹, Elton Pedro Nunes Pena, Mara Danielle Silva do Carmo¹, Ana Maria Benko-Iseppon², Valesca Pandolfi², Tiago Santana Balbuena³, Tercilio Calsa Junior^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil;

³ Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, Departamento de Biotecnologia, Laboratório de Proteômica Vegetal, Via de Acesso Pro. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900-Jaboticabal, SP, Brasil

Autor para correspondência:

Tercilio Calsa Junior, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de BioCiências, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Tel. +55 81-2126-7829; Email: terciliojr@yahoo.com.br

Resumo

Com o aumento da população global, a seca pode ocasionar uma grave escassez de alimentos até 2050. O estresse hídrico leva a diminuição do desenvolvimento e produtividade de cultivares. *Stylosanthes scabra* Vogel (Fabaceae) é uma leguminosa, nativa do semiárido brasileiro, sendo amplamente cultivada em ambientes tropicais e subtropicais. Apresenta alta plasticidade frente aos fatores abióticos e destaca-se como uma das espécies de importância econômica, principalmente devido a sua capacidade de restaurar a fertilidade e melhorar as propriedades físicas do solo. A busca por genes e produtos gênicos com novas características em espécies de importância agrícola, biotecnológica e nativas poderá trazer grandes avanços no melhoramento genético desta e de outras leguminosas. Técnicas proteômicas como LC-MS/MS vêm contribuindo imensamente para elucidar o possível proteoma responsivo a diversas condições de estresse. Neste estudo, utilizamos *Stylosanthes scabra* acesso 85/UNEB, submetida ao déficit hídrico por 24 h, as amostras dos tratamentos irrigado e déficit hídrico (DH) foram analisadas por proteômica shotgun com a técnica LC-MS/MS e com ajuda de *softwares* como o MaxQuant, Perseu e ferramentas como AgriGO e MapMan conseguimos quantificar 238 proteínas, onde 34 foram proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), sendo identificadas e mapeadas em vias que podem estar associadas a resposta de *S. scabra* ao déficit hídrico. Na análise de enriquecimento, o tratamento irrigado apresentou significância apenas para ‘componente celular’, sendo o termo mais enriquecido ‘membrana plasmática’. Para o tratamento DH o termo mais enriquecido para processo biológico foi ‘respostas ao estímulo’, em função molecular foi ‘ligação proteica’, já para componente celular ‘citossol’. As proteínas foram mapeadas principalmente em vias de sinalização (calmodulina, anexina e proteínas de ligação a GTP) resposta ao estresse (HSP 70kDa, USP), sistema redox (superóxido dismutase, peroxidase) e glicólise (frutose-bisfosfato aldolase, fosfoenolpiruvato carboxilase). A partir dos dados, sugerimos a rápida percepção da condição de estresse pela planta e o possível empenho em manter produção de energia e a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Palavras-chave: espectrometria de massas, seca, fixação biológica de nitrogênio.

Abstract

With the increase in the global population, drought can cause severe food shortages by 2050. Water stress leads to decreased development and productivity of cultivars. *Stylosanthes scabra* Vogel (Fabaceae) is a legume, native to the Brazilian semiarid region, being widely cultivated in tropical and subtropical environments. It has high plasticity in the face of abiotic factors and stands out as one of the species of economic importance, mainly due to its ability to restore fertility and improve the physical properties of the soil. The search for genes and gene products with new characteristics in species of agricultural, biotechnological and native importance may bring great advances in the genetic improvement of this and other legumes. Proteomic techniques like LC-MS / MS have contributed immensely to elucidate the possible proteome responsive to various stress conditions. In this study, we used *Stylosanthes scabra* access 85 / UNEB, subjected to water deficit for 24 h. The samples of the irrigated and water deficit (DH) treatments were analyzed by shotgun proteomics with the LC-MS / MS technique and with the help of software such as MaxQuant, Perseu and tools like AgriGO and MapMan managed to quantify 238 proteins, where 34 were differentially accumulated proteins (DAPs), being identified and mapped in pathways that may be associated with the *S. scabra* response to water deficit. In the enrichment analysis, the irrigated treatment showed significance only for 'cell component', the most enriched term being 'plasma membrane'. For the DH treatment, the most enriched term for the biological process was 'responses to the stimulus', in molecular function it was 'protein binding', already for cellular components 'cytosol'. The proteins were mainly mapped in signaling pathways (calmodulin, annexin and GTP-binding proteins) response to stress (HSP 70kDa, USP), redox system (superoxide dismutase, peroxidase) and glycolysis (fructose-bisphosphate aldolase, phosphoenolpyruvate carboxylase). From the data, we suggest the quick perception of the stress condition by the plant and the possible effort to maintain energy production and the Biological Nitrogen Fixation (FBN).

Keywords: Mass spectrometry. Drought. Biological nitrogen fixation.

1 Introdução

Stylosanthes scabra Vogel (Fabaceae) é uma leguminosa de hábito herbáceo, nativa do semiárido brasileiro, sendo amplamente cultivada em ambientes tropicais e subtropicais [1,2,3]. Apresenta alta plasticidade frente aos fatores abióticos, ocorrendo desde o agreste até o semiárido do Nordeste do Brasil [4]. Destaca-se como uma das espécies de importância econômica, principalmente devido a sua capacidade de restaurar a fertilidade e melhorar as propriedades físicas do solo, além de fornecer cobertura vegetal permanente, por apresentar tolerância à seca [5], tornando-se alternativa para a melhoria da fertilidade em pastagens consorciadas com gramíneas.

Por outro lado, espécies do gênero *Stylosanthes* destacam-se pela sua relevância na atividade agropecuária, principalmente devido seu alto potencial forrageiro, tanto para a alimentação de gado de corte, como para produção leiteira nas regiões tropicais e subtropicais, além de ser bastante produtiva, com qualidade nutricional significativa, tendo 10% de proteína bruta. Muitas espécies ainda apresentam características de adaptação ao semiárido brasileiro e tolerância às condições bióticas e abióticas, sendo algumas ainda pouco exploradas comercialmente [6,7].

O estresse abiótico afeta negativamente a produção agrícola em todo o mundo, causando reduções de rendimento para a maioria das principais culturas. Entre os vários estresses abióticos, a seca é considerada a mais séria. Com o aumento da população global, a seca pode ocasionar uma grave escassez de alimentos até 2050, quando a população mundial deve chegar a dez bilhões. Situação que pode ser agravada devido às mudanças climáticas globais que podem multiplicar a frequência, duração e severidade do déficit hídrico [8]. O estresse hídrico leva a diminuição do potencial hídrico foliar e da abertura estomática, ocasionando à baixa regulação dos genes envolvidos na fotossíntese e à redução da disponibilidade de CO₂, tem sido reconhecido como um dos principais fatores do estresse [9]. Muitas redes moleculares, incluindo a transdução de sinal, estão envolvidas em respostas de estresse [10,11,12]. Estudos identificaram os genes conservados e responsivos à seca, reguladores e funcionais, incluindo biossíntese de osmoprotetores e ABA, genes abundantes na embriogênese tardia (LEA), chaperona, relacionados a ROS, homeostase de íons e sinalização. Também foram identificados os principais fatores de transcrição que atuam na regulação da transcrição gênica responsiva à seca, como MYB, MYC, DREB/CBF, ABF/AREB, NAC e WRKY [13-17].

A busca por genes e produtos gênicos com novas características em espécies de importância agrícola, biotecnológica e nativas poderá trazer grandes avanços no melhoramento genético desta e de outras leguminosas. É cada vez mais necessário um melhor entendimento dos mecanismos de resposta das plantas em nível celular e molecular frente a tais condições ambientais adversas [18]. Como nem sempre a sequência genômica é suficiente para elucidar tais funções, é um objetivo das pesquisas em proteômica funcional elucidar as funções fisiológicas e definir os mecanismos de ação em nível molecular. O estudo funcional é complexo, uma vez que existem proteínas que, para se tornarem funcionais, dependem da interação com outros complexos proteicos como as vias de sinalização celular que podem levar à elucidação de interações proteína-proteína e de redes moleculares [19].

A LC-MS/MS é uma técnica analítica poderosa que pode ser usada para identificar materiais desconhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das células. É um método que permite a determinação da massa molecular de compostos com alta acurácia. Com equipamentos cada vez mais especializados em proteínas, a LC-MS/MS tornou-se uma ferramenta poderosa para a identificação e o estudo dessas moléculas [20]. No LC-MS/MS as moléculas da amostra são ionizadas e os íons são separados na razão massa/carga (m/z). Basicamente o processo implica em: digestão das proteínas de uma mistura complexa em peptídeos, a separação destes peptídeos por cromatografia líquida (LC), a aquisição em sequência dos espectros de massa do peptídeo por fragmentação espectrométrica e a aplicação de softwares, tais como Mascot, para interpretar cada espectro MS/MS, o que resulta na identificação de proteínas presentes na amostra [20].

Neste contexto, a proteômica comparativa apresenta-se como uma alternativa adequada e promissora para análises globais de expressão gênica em nível traducional e pós-traducional, mais próxima do fenótipo [21,22]. Assim, objetivo deste estudo foi identificar proteínas com acúmulo diferencial em raiz de *Stylosanthes scabra* submetida ao déficit hídrico por 24 h.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido com indivíduos de *S. scabra* propagados por estaquia, utilizando-se como matriz o acesso 85/UNEB, proveniente do Banco Ativo de

Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia, e conduzido na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. O enraizamento das estacas de aproximadamente 10 cm de comprimento foi induzido com a aplicação da auxina ácido indolbutírico (IBA) a 1.000 ppm diluído em talco mineral. O material foi colocado em sacos plásticos (15 x 8 cm) contendo substrato composto por argissolo e vermiculita (3:1), mantidos em telado com 50% de sombreamento e irrigação uma vez ao dia. Nessas condições, obteve-se taxa de enraizamento das estacas de aproximadamente 90%. As plantas foram posteriormente transferidas para vasos plásticos (capacidade 10 L), sendo cultivadas em substrato composto por areia, argissolo, vermiculita, mantidos em casa-de-vegetação.

2.2 Desenho experimental, imposição do estresse e coleta do material

Após quatro meses de cultivo, as plantas foram categorizadas em dois tratamentos: controle (irrigado diariamente) e o déficit hídrico (DH) - suspensão de rega, nos períodos de 6 h e 24 h. Para cada tratamento nove réplicas biológicas foram coletadas, totalizando 27 plantas por tratamento. Tecidos radiculares foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em ultrafreezer.

Alguns resultados fisiológicos e bioquímicos prévios (Araújo et al., dados não publicados) realizados com *S. scabra* nos tempos de 6, 24 e 48 horas após suspensão de rega e 6 horas após reidratação, em folhas e raízes, mostram que a assimilação líquida de CO₂ e a condutância estomática apresentaram redução significativa já com 6 h de supressão de rega e os teores de carboidratos, aminoácidos, proteínas e prolina apresentaram aumento nas raízes a partir de 24 h. A partir destes resultados o tempo de 24 h foi selecionado para análise proteômica *shotgun*, visando identificar proteínas responsivas neste estágio inicial de exposição ao estresse por déficit hídrico.

2.3 Extração e quantificação de proteínas

A extração de proteínas solúveis totais foi realizada usando protocolo com fenol [23] com poucas modificações: alíquota de 1,5 g de tecido radicular de *S. scabra*, foi maceradas em N₂ líquido foi ressuspensa em 10 mL do tampão de extração [Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5); sacarose 0,7 M; KCl 0,1 M; EDTA 50 mM; 2% β-mercaptoetanol e PMSF 2 mM], e mantida sob agitação constante (70 rpm) em banho de gelo por 20 min. Foi adicionado volume igual de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5), misturado por

vortex e incubado sob agitação constante (70 rpm) por 20 min. em banho de gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.200 xg, a 4°C por 20 min. A precipitação proteica foi realizada transferindo-se a fase fenólica (superior) para novo tubo e adicionando-se cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M (em metanol), mantidos a 4°C por 16 h. As amostras foram centrifugadas a 7.200 xg, a 4°C por 30 min. O precipitado foi lavado três vezes com acetato de amônio 100 mM (em metanol gelado) e uma vez com acetona 80% (gelada). Entre as lavagens, as amostras foram vortexadas e incubadas a 4°C por 15 min. As amostras foram secas a 4°C por 10 min e o sedimento solubilizado em 400 µL de tampão ureia/tiourea (8M:2M).

2.4 Digestão do extrato proteico e Análise por LC-MS/MS

Estas etapas metodológicas foram realizadas na Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus Jaboticabal, pelo grupo de Proteômica Vegetal, a partir de protocolos estabelecidos pelo grupo.

2.5 Identificação e quantificação de proteínas

A identificação das proteínas foi realizada utilizando o *software* MaxQuant (versão 1.5.2.6) [24]. Utilizou-se o banco de dados transcriptômico de *Stylosanthes scabra*, onde foi traduzido com a ferramenta TransDecoder [25] e anotado contra as espécies *Arachis hipogae* e *Medicago truncatula*. Na seção de parâmetros, definimos como enzima tripsina e Lys-C, permitindo até duas clivagens perdidas. O comprimento mínimo necessário do peptídeo foi de sete aminoácidos. A carbamidometilação da cisteína e a oxidação da metionina foram determinadas como modificações variáveis. Como nenhuma rotulagem foi realizada, a multiplicidade foi ajustada para 1. Durante a busca principal, foi permitido às massas mães um desvio de massa inicial de 4,5 ppm e os íons dos fragmentos receberam um desvio de massa de 0,5 Da. As identificações PSM (PSM (*peptide spectrum match*)) e proteína foram filtradas usando uma abordagem de alvo-chamariz a uma taxa de falso-positivo (FDR- false discovery rate) de 1%.

A quantificação relativa (LFQ- Label free quantification) das proteínas foi feita usando o algoritmo MaxLFQ integrado no MaxQuant. A opção de correspondência entre execuções foi ativada com uma janela de tempo de partida de 2 min e uma janela de tempo de alinhamento de 20 min. Para a quantificação de proteínas, utilizamos 1

como contagem mínima de razões, peptídeos “Unique + Razor” (ou seja, aqueles compartilhados exclusivamente pelas proteínas do mesmo grupo), peptídeos com modificações variáveis e “descartar peptídeos equivalentes não modificados”.

2.6 Análise de dados

Análise de expressão diferencial entre os tratamentos estresse e controle foi realizada usando ANOVA, onde os valores de p foram corrigidos por Benjamini Hochberg a 5% de FDR. Análises de agrupamento hierárquico foram realizadas usando a distância Euclidiana média e os parâmetros padrão de Perseus (300 agrupamentos, máximo de 10 iterações).

Os valores de LFQ perdidos foram imputados (largura = 0,3, redução de marcha = 1,8) e 0 foi substituído manualmente quando faltavam valores em todas as réplicas de cada tratamento. O teste T (Benjamini Hochberg corrigido a 5% FDR) foi calculado com base nesses dados.

2.7 Análise de ontologia gênica e mapeamento de DAPS

Para análise ontologia gênica (GO), as sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas como diferencialmente acumuladas foram recuperadas no formato MULTIFASTA, na base de dados UniProt. Em seguida foi utilizada a ferramenta Blast2GO 5 Basic [26], para mapeamento de termos de GO, com os seguintes parâmetros: bancos de dados SwissProt (Viridiplantae) e p -value ⁽⁻¹⁰⁾. Para enriquecimento dos termos GO foi utilizada a ferramenta *online* AgriGO [27], com a espécie *Medicago truncatula* como referência. O programa MapMan [28] 3.6.0RC1 foi aplicado para visualização do acúmulo das proteínas identificadas e para mapeamento em vias, os arquivos de *software* e mapeamento de *Phaseolus vulgaris* v1.0 (Common bean) foram baixados do GABI *Primary Database* e utilizados como referência [29].

3 Resultados

Usando a proteômica shotgun baseada em LC-MS/MS um total de 238 proteínas não redundantes foram identificadas e quantificadas através de pesquisa no banco de dados de proteínas traduzidas de *S. scabra* por meio do software MaxQuant. Das 238 proteínas 163 foram utilizadas para análise diferencial, pois 70 significativas após teste estatísticos e cinco possíveis contaminantes. Destas 163 proteínas, 34 apresentaram abundância diferente entre os tratamentos controle e estressado, sendo 12 reguladas no controle e 22 no tratamento de estresse, com estas proteínas diferenciais seguimos as análises de ontologia gênica, enriquecimento e mapeamento. Para análise de ontologia gênica para processo biológico, apenas o termo processo celular foi comum a ambos os tratamentos, para o tratamento irrigado seis das 12 proteínas estão envolvidas neste processo, já para tratamento déficit hídrico (DH) 20 das 22 estão relacionadas a este termo. Para o tratamento DH os processos que envolveram mais proteínas foram os termos: Processo celular (20 proteínas); Processo metabólico (17); Resposta ao estímulo (15); Metabolismo celular (14); Resposta ao estímulo químico (14); Metabolismo primário (12) e Resposta ao estresse (11), como observado na figura 1.

Na análise de enriquecimento, nenhum termo em processo biológico e função molecular foi significativo para o tratamento irrigado, para componente celular os termos mais enriquecidos foram, membrana plasmática, membrana de organela e compartimento intracelular da organela. Para o tratamento DH os termos mais enriquecidos para processo biológicos foram respostas ao estímulo, ao estímulo abiótico e ao estímulo químico. Em função molecular foram, ligação proteica e ligação a íon de cobre, já para componente celular foram citosol, plastídeo e membrana plasmática (anexos 1 e 2)

O mapeamento realizado através do MapMan mostrou em que possíveis vias que mais foram representadas foram a de estresse biótico, metabolismo, regulação e resposta celular, figura 2. Ainda em análise no MapMan três proteínas do tratamento DH foram inseridas na via de glicólise, todas estas também foram agrupadas na categoria geração de precursores metabólicos e energia pela ferramenta AgriGO.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente acumuladas em *Stylosanthes scabra*, após 24 h sob déficit hídrico.

Acesso**	Descrição	Cobertura (%)**	Tratamento*	Acúmulo	Via MapMan
-	Serina hidroximetiltransferase	-	D.H	2,60	Fotossíntese-fostorespiração/Metabolismo C1
-	Proteína dissulfeto isomerase	-	D.H	2,57	Redox
-	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (família 17)	-	D.H	2,23	Diversos
-	Promotor de crescimento independente de auxina	-	D.H	2,06	Metabolismo hormonal
-	Proteína semelhante à Lactoglicilitiona Liase	-	D.H	2,03	Biodegradação de xenobióticos
-	Proteína da família da citosol aminopeptidase	-	D.H	2,03	Degração proteína
-	6-fosfogluconato desidrogenase	-	D.H	1,97	Oxidação pentose
-	Proteína choque térmico 70kDa	-	D.H	1,92	Estresse abiótico
-	Subunidade beta da ATP sintase	-	D.H	1,92	Transporte de elétron mitocondrial
-	ATPase membrana plasmática	-	D.H	1,88	Transporte
-	Frutose-bisfosfato aldolase	-	D.H	1,86	Fotossíntese/Glicólise
-	Proteína nuclear de ligação a GTP	-	D.H	1,83	Sinalização
-	Fosfoenolpiruvato carboxilase	-	D.H	1,67	Glicólise
-	Superóxido dismutase	-	D.H	1,53	Redox
-	Carboidrato quinase da família pfkB	-	D.H	1,52	Metabolismo de nucleotídeo
-	Anexina	-	D.H	1,40	Organização celular
-	Formate desidrogenase	-	D.H	1,40	Metabolismo C1
-	Frutose-bisfosfato aldolase	-	D.H	1,40	Glicólise
-	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5A	-	D.H	1,39	Síntese proteína
-	Calmodulina 2	-	D.H	1,37	Sinalização
-	Fosfopiruvato hidratase	-	D.H	1,35	Glicólise
-	Peroxidase	-	D.H	1,31	Diversos
-	Asparagina sintetase	-	I	1,36	-
-	Malato desidrogenase	-	I	1,46	TCA/transformação orgânica
-	Cadeia pesada da clatrina	-	I	1,47	Transporte vesícula celular
-	Proteína ATPase, AAA-type, CDC48	-	I	1,51	Divisão celular
-	Proteína estresse universal	-	I	1,51	Estresse abiótico
-	Proteína com domínio Band 7	-	I	1,65	Não atribuído
-	Proteína do tipo oxidase multi-cobre	-	I	1,78	Parede celular
-	Adenossilhomocisteinase	-	I	2,81	Metabolismo de Aminoácido
-	Proteína oclusão elemento crivado	-	I	3,05	Não atribuído
-	Lectina Leguminosa domínio beta	-	I	3,48	Diversos
-	Lectina Leguminosa domínio beta	-	I	3,59	Diversos
-	Proibitina	-	I	3,93	Transporte de elétron mitocondrial/Ciclo celular

*DH - déficit hídrico; I - irrigado.

**Dados omitidos por motivo de propriedade intelectual.

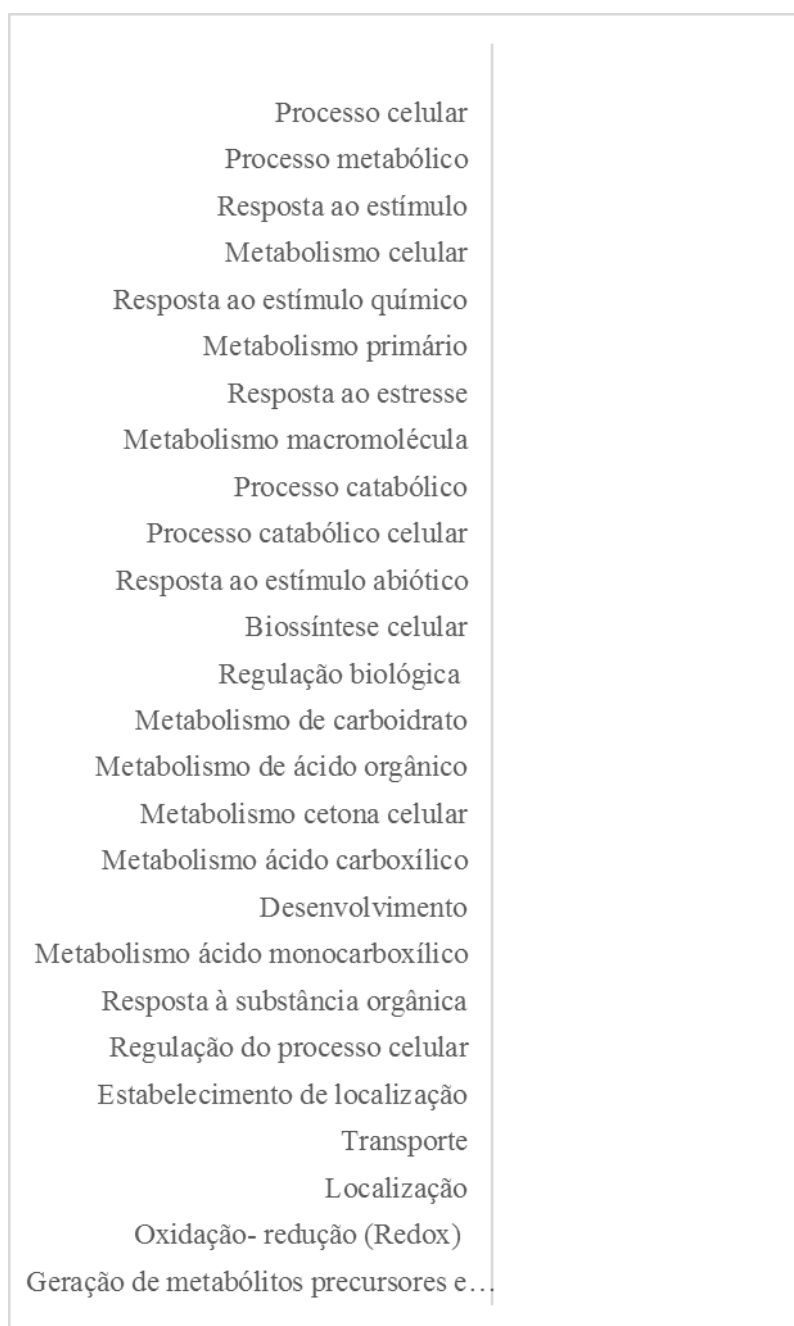


Fig. 1. Categorias de processo biológico para 24 h após déficit hídrico.

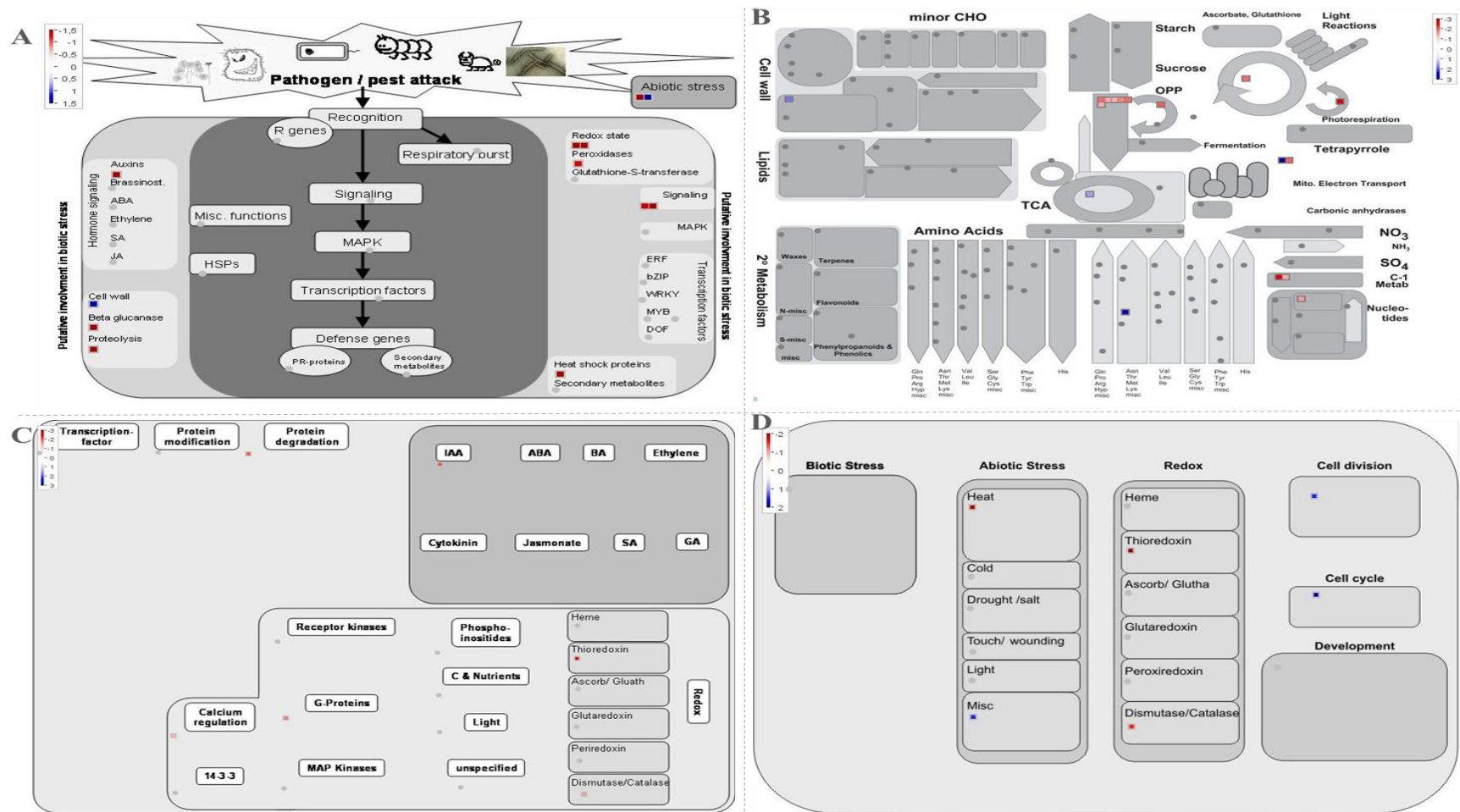


Fig. 2. Mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas após 24 h de déficit hídrico. Vias de estresse biótico (A), metabolismo (B), regulação (C) e resposta celular (D). Quadrados representam DAPs, nuances da cor azul para tratamento irrigado e vermelha para tratamento déficit hídrico.

4 Discussão

As plantas adaptam-se a diferentes estresses regulando a abundância de proteínas responsivas de maneira órgão-específica [30]. As raízes dependem da glicólise para manter os níveis de energia, além de precursores do anabolismo, como aminoácidos e ácidos graxos [31]. O número de proteínas do tratamento déficit hídrico identificadas, enriquecidas e mapeadas foi maior que para o tratamento irrigado, isto pode indicar uma resposta rápida e específica de *S. scabra* para suportar o estresse. Algumas proteínas foram discutidas em alguns processos que estão envolvidos na resposta ao estresse.

No enriquecimento de termos GO, o tratamento irrigado apresentou termos significantes apenas para componente celular, uma das explicações pode ser o número de proteínas identificadas para esse tratamento. Observamos que o termo mais enriquecido foi membrana plasmática, cinco proteínas estavam inseridas nesta categoria, entre elas a proteína universal de estresse que é discutida logo adiante e a proteína clatrina, que já foi relatada como uma das proteínas que pode interagir com a fototropina, assim como com a HSP70 (também identificada e discutida adiante), sendo uma transdutora de sinal em *Arabidopsis* [32-35]. Entre as funções das fototropinas estão, utilizar eficientemente a energia solar para a fotossíntese e proteger o mecanismo fotossintético e o DNA genômico da luz nociva, elas transduzem sinais luminosos em diversas respostas, incluindo fototropismo, abertura estomática, achatamento de folhas e posicionamento de folhas, através do domínio quinase [36]. Pode-se sugerir, que mesmo em condições favoráveis *S. scabra* dispõe de proteínas que podem perceber rapidamente o estresse. Em relação ao tratamento déficit hídrico, todas categorias foram enriquecidas, o que pode indicar que mesmo sob estresse a planta mantém funções vitais para sua sobrevivência. Algumas das proteínas mais acumuladas no déficit hídrico (DH) são detalhadas.

Sinalização

A proteína nuclear de ligação a GTP foi mais acumulada no tratamento DH, esta proteína pertence a família de proteínas de ligação a GTP e participam de pequenas vias de transdução de sinal mediadas por GTPase que são ativadas por sinais externos [37]. Em estudos realizados com *Oryza sativa* e *Triticum aestivum* [38] foi observado aumento do acúmulo da proteína de ligação GTP em resposta ao déficit hídrico, em

trigo foram testadas duas cultivares tolerante e sensível, os níveis de abundância desta proteína foram mais expressivos no cultivar tolerante. Outro estudo constatou a diminuição no acúmulo em linhagens sensíveis de *Zea mays* ao déficit hídrico [39], como existe relatos que *S. scabra* apresente mecanismos de tolerância ao estresse por déficit hídrico, seja justificável que plantas tolerantes apresentem acúmulo desta proteína, o que pode ser indício do papel essencial desta proteína na resposta ao estresse em *S. scabra*.

A calmodulina e a anexina foram mais abundantes no tratamento DH, estas, são proteínas de ligação ao Ca^{2+} que existem em todos os eucariotos [40]. O gradiente de Ca^{2+} através da membrana plasmática, bem como o sistema de membranas internas, estão envolvidos no processo de sinalização celular controlado por canais permeáveis ao Ca^{2+} responsivo ao estímulo [41,42]. O sinal inicial é transduzido da membrana plasmática para o núcleo usando várias vias de sinalização associadas ao estresse, entre elas a sinalização de cálcio (calmodulina, anexina, calexina, calreticulina, caleosina), que asseguram a transdução de sinal inicial e amplificação [43]. Evidências acumuladas revelam que vários estímulos externos, tais como gravidade, luz, frio, calor, seca, água (hipóxia), sal, vento, tato, ferimentos e ataques de patógenos podem induzir rapidamente elevações na concentração de Ca^{2+} citosólico [41,44-46]. Em estudo proteômico realizado com tecido radicular de cultivares de tomate sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico, foi observado o acúmulo da calmodulina no cultivar tolerante, enquanto que na cultivar sensível esta proteína foi menos abundante [47]. A anexina foi acumulada em raízes de *Medicago sativa* após 12 dias de déficit hídrico [48], os autores sugerem a participação desta anexina na resposta ao estresse oxidativo. No presente estudo, o acúmulo da anexina foi detectado em 24 h após o DH, o que indica participação essencial desta proteína em *S. scabra* na transdução de sinal e rápida percepção da condição ambiental, favorecendo seu desempenho frente ao estresse.

Resposta ao estresse e sistema Redox

A proteína de choque térmica 70kDa (HSP70), se mostrou mais acumulada no tratamento déficit hídrico em *S. scabra*. As HSPs estão envolvidas em vários processos intracelulares e desempenham papéis importantes nas interações proteína-proteína, dobramento, montagem, localização intracelular, secreção, transporte, prevenção da agregação e degradação de proteínas e reativação de proteínas danificadas [49]. As

HSPs são tipicamente induzidas quando as células são expostas a vários tipos de estresse ambiental, como a seca, o calor, o frio e a privação de oxigênio [50]. A HSP também foi aumentada pelo estresse hídrico na beterraba sacarina e *Glycine max* [51,52], desempenhando papel importante para tolerância.

A USP (Universal Stress Protein – Proteína de estresse universal) foi mais acumulada no tratamento controle. A proteína de estresse universal foi descoberta e descrita inicialmente em *Escherichia coli* [53]. As proteínas USP das plantas estão envolvidas nas respostas a vários estressores abióticos e bióticos [54-56]. Em estudo realizado com *Solanum pennellii* transgênicas com genes codificantes da proteína universal de estresse inibidos, mostrou aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo, salino e desidratação, enquanto as linhas com altos níveis de expressão dessas proteínas são mais resistentes ao estresse [57]. A abundância desta proteína no tratamento irrigado sugere que *S. scabra* utiliza a estratégia de memória de estresse, onde a planta consegue responder mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente. Talvez, proteínas relacionadas a tais respostas, possam compor o proteoma de *S. scabra*, mesmo que o indivíduo não esteja em condições adversas, como déficit hídrico, neste caso.

A superóxido dismutase e a peroxidase mostraram-se mais abundância no tratamento DH. O estresse hídrico provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que geram defeitos na ultraestrutura das membranas celulares e do DNA, bem como no funcionamento dos processos celulares [58-60]. EROs incluindo radical hidroxila, radical aniônico, peróxido de hidrogênio, radicais alquila e oxigênio singlete são danosas às atividades metabólicas da planta. Essas espécies podem reagir a lipídios, proteínas e DNA, causando danos oxidativos e funções anormais de células [61,62]. As enzimas antioxidantes como as acumuladas neste estudo, entre outras, são requeridas para que plantas sejam capazes de manter processos metabólicos normais ou quase normais sob condições ambientais extremas [63]. Aumento das atividades destas enzimas foram relatadas em diversas espécies sob diferentes condições de estresse vitamina B1 [63], alumínio [64], salinidade [65], déficit hídrico [66,67].

Glicólise

A glicólise é a via metabólica que oxida a glicose para o piruvato e desempenha um papel importante na produção de energia e esqueletos de carbono para a biossíntese de metabólitos primários e secundários [31]. O software MapMan mapeou três proteínas

na via da glicólise, frutose-bisfosfato aldolase, fosfopiruvato hidratase e fosfoenolpiruvato carboxilase, todas mais acumuladas no tratamento déficit hídrico. Em estudo realizado com videira, proteínas envolvidas na glicólise foram significativamente afetadas pelo déficit hídrico, indicando que mudanças no metabolismo da planta pareciam defesas antioxidantes nos estágios iniciais da resposta da planta ao déficit hídrico antes de um dano significativo [68].

Proteínas também envolvidas na glicólise ocorreu em estudo realizado em nódulos de *Medicago truncatula* e *Glycine max*, onde proteínas como a frutose-bisfosfato aldolase e fosfoenolpiruvato carboxilase foram menos abundantes em condições de DH, o que sugeriu redução no metabolismo de carbono e, portanto, uma diminuição na fonte de energia para a fixação biológica de nitrogênio nos nódulos [69]. Com este relato oposto ao resultado observado neste estudo, podemos sugerir que tais proteínas contribuam para produção de energia e manutenção da FBN em *S. scabra* sob déficit hídrico.

Outras proteínas

A lactoilglutamina-liase também conhecida como glioxalase I, mostrou-se mais acumulada no tratamento DH. Esta enzima está envolvida na via do metabolismo do Metilglioxal (MG) que é um α -cetoaldeído reativo que pode formar ligações cruzadas com proteínas e ácidos nucleicos, essa ligação é gerada principalmente como um subproduto de várias vias metabólicas, como glicólise, peroxidação lipídica e degradação da glicose, sendo sua produção nos sistemas biológicos inevitável [70]. A MG em altas concentrações pode agir como uma citotoxina e em baixas concentrações como uma molécula sinalizadora nas plantas [71,72]. Acredita-se que a via glioxalase seja o principal caminho para desintoxicação de MG. O sistema glioxalase via desintoxicação minimiza excesso de MG nas plantas, desestressando-as [70]. Esta enzima foi relatada em estudos com várias espécies que responderam positivamente sob diversos estresses como salinidade, déficit hídrico e deficiência de potássio [73-75].

A proteína ATPase membrana plasmática (MP) foi mais acumulada no tratamento déficit hídrico. Esta proteína é uma bomba eletrogênica que exporta prótons celulares e tem sido relatada como essencial para o crescimento das plantas [76]. Fortes evidências genéticas para papéis fisiológicos ATPase MP na biologia estomática vêm sendo estudados, como estudo realizado por [77]. Outro estudo menciona que a

regulação rápida da atividade da ATPase MP é essencial para a tolerância à salinidade em duas espécies halófitas, *Atriplex lentiformis* e *Chenopodium quinoa* [78]. Estas duas proteínas mencionadas parecem ter papel de extrema importância na resposta de *S. scabra* ao déficit hídrico, no entanto os caminhos destes mecanismos responsivos e suas vias, ainda precisam ser bastante estudados para que a compreensão seja clara e conclusões possam ser confirmadas quanto ao proteoma desta espécie.

5 Conclusão

A análise quantitativa do proteoma de *Stylosanthes scabra*, apresentou algumas proteínas já descritas como responsivas aos diversos estresses ambientais, o que observamos neste estudo foi a presença de algumas destas proteínas no tratamento controle e uma resposta rápida (24 h) desta espécie ao estresse hídrico, considerando que ações proteicas estão nas etapas finais de respostas. *S. scabra* parece apresentar memória de estresse, pois em condições irrigadas, o proteoma apresenta proteínas responsivas ao estresse. Esse fenômeno pode auxiliar a planta a responder com mais eficiência e rapidez a um novo evento de estresse, pois com poucas horas *S. scabra* apresenta proteínas eficientes na resposta ao estresse.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concessão da bolsa. Os autores agradecem à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Embrapa Semiárido (CPATSA), ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Centro de Proteômica Avançada da Universidade de Washington (UW, Seattle, Washington, EUA) e a FAPESP e ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO). Este trabalho foi desenvolvido como parte do projeto de pesquisa: Estudo das respostas fisiológicas, genéticas e bioquímicas a estresses abióticos em plantas cultivadas e nativas da Caatinga. Edital Capes-Embrapa - nº 15/2014.

6 Referências

- [1] R.J. Williams, R. Reid, R. Schultze-Kraft, N.M. Souza-Costa, B.D. Thomas, Natural distribution of *Stylosanthes*. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney, (1984).
- [2] D.F. Cameron, L.A. Edye, S Chakraborty, J.M. Manners, C.J. Liu, R.A. Date, R.M. Boland, An integrated program to improve anthracnose resistance in *Stylosanthes*—a review. In Proc 8th Australian Agronomy Conf, Toowoomba. The Australian Institute of Agricultural Science, Carlton, Victoria, Australia (1996) 112-115.
- [3] L.C. Costa, J.F.M. Da-Valls, *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2015).
- [4] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Bancos de germoplasma. Foa Fiat Panis. (2017) 1: 1.
- [5] D. Nagaich, K.K. Tiwari, N. Srivastva, A. Chandra, Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. *Acta physiologiae plantarum* 35 (2013) 3127-3136.
- [6] M. Ayarza, L. Vilela, B. J. R. Alves, O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, R.M. Boddey, Introdução de *Stylosanthes guianensis* Cv. mineirão em pastagem de *Brachiaria ruziziensis*: Influência na produção animal e vegetal. Embrapa Agrobiologia-Séries anteriores (INFOTECA-E) (1997).
- [7] A.D.O. Barcellos, R.D. Andrade, C.T. Karia, L. Vilela, Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 17 (2000) 297-357.
- [8] M.A. Hossain, S. H. Wani, S. Bhattacharjee, D.J. Burritt, L. P. Tran, (Eds.) Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1 Physiology and Biochemistry Springer (2016).
- [9] K. Osakabe, Y. Osakabe, “Plant light stress,” in *Encyclopaedia of Life Sciences*, ed.S.A.Robinson (London: Nature Publishing Group) (2012).
- [10] Y. Osakabe, S. Kajita, K. Osakabe, Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment. *Physiol.Plant.* 142 (2011) 105–117.
- [11] Y. Osakabe, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, L.S. PhanTran, Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Exp.Bot.* 64 (2013) 445–458.
- [12] R. Nishiyama, Y. Watanabe, M.A. Leyva-Gonzalez, C. VanHa, Y. Fujita, M. Tanaka, *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110 (2013) 4840–4845.
- [13] E.J. Stockinger, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow, *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997) 1035-1040.

- [14] Y. Sakuma, K. Maruyama, Y. Osakabe, F. Qin, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18 (2006) 1292-1309.
- [15] L.S.P. Tran, K. Nakashima, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. In *Methods in enzymology* (Vol. 428, 109-128) (2007) Academic Press.
- [16] K. Nakashima, Y. Ito, K. Yamaguchi-Shinozaki, Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant physiology* 149 (2009) 88-95.
- [17] T. Ishida, Y. Osakabe, S. Yanagisawa, Transcription factors: improving abiotic stress tolerance in plants. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress* (2012) 591-621.
- [18] S.X. Chen, A.C. Harmon, Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6 (2006) 5504-5516.
- [19] M. Monti, S. Orru, D. Pagnozzi, P. Pucci, Functional proteomics. *Clinica chimica acta*, 357 (2005) 140-150.
- [20] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, D.L. Bryce, Spectrometric identification of organic compounds. (2014) John Wiley & Sons.
- [21] F.M. Canovas, E. Dumas-Gaudot, G. Recorbet, J. Jorin, H.P. Mock, M. Rossignol, Plant proteome analysis. *Proteomics* 4 (2004) 285-298.
- [22] C.M. Pacheco, M.C. Pestana-Calsa, F.C. Gozzo, R.J. Mansur Custodio Nogueira, M. Menossi, T. Calsa Junior, (2013). Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *Journal of proteome research*, 12 (2013) 5681-5695.
- [23] W.J. Hurkma, C.K. Tanaka, Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology* (1986) 802-806.
- [24] J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*, 26 (2008) 1367.
- [25] B.J. Haas, A. Papanicolaou, TransDecoder (2016)
- [26] S. Conesa, J.M. Götz, J. Garcia-Gomez, M. Terol, M. Talon, "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research", *Bioinformatics* 21 (2005) 3674-3676.
- [27] T. Tian, Y. Liu, H. Yan, Q. You, X. Yi, Z. Du, Z. Su, agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research* 45(W1) (2017) W122-W129.
- [28] O. Thimm, O. Bläsing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Krüger, M. Stitt, MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37 (2004) 914-939.
- [29] D.M. Riaño-Pachón, A. Nagel, J. Neigenfind, R. Wagner, R. Basekow, E. Weber, B. Kersten, The GABI Primary Database: GABIPD—Integration of Plant ‘Omics’-Data in Gene Context (2009).

- [30] S. Komatsu, Z. Hossain, Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in plant science*, 4 (2013) 71.
- [31] W. Plaxton The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology* 47 (1996) 185–214.
- [32] E. Kaiserli, S. Sullivan, M.A. Jones, K.A. Feeney, J.M. Christie, Domain swapping to assess the mechanistic basis of Arabidopsis phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *Plant Cell* 21 (2009) 3226–3244.
- [33] S. Inada, M. Ohgishi, T. Mayama, K. Okada, Sakai, RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16 (2004) 887–896.
- [34] S. Sullivan, C.E. Thomson, E. Kaiserli, J.M. Christie, Interaction specificity of Arabidopsis 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Lett* (2009) 187–2193.
- [35] M. De Carbonnel, P. Davis, M.R. Roelfsema, S. Inoue, I. Schepens, P. Lariguet, M. Geisler, K. Shimazaki, R. Hangarter, C. Fankhauser, The Arabidopsis PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol* (2010) 1391–1405.
- [36] S.I. Inoue, A. Takemiya, K.I. Shimazaki, Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Current opinion in plant biology*, 13 (2010) 587–593.
- [37] H. Askari, J. Edqvist, M. Hajheidari, M. Kafi, G.H. Salekdeh, Effects of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptiaca leaves. *Proteomics* (2006) 2542–2554.
- [38] S. Alvarez, S. Roy Choudhury, S. Pandey, Comparative quantitative proteomics analysis of the ABA response of roots of drought-sensitive and drought-tolerant wheat varieties identifies proteomic signatures of drought adaptability. *J Proteome Res* 13 (2014) 1688–1701.
- [39] Y. Yang, T. Jiang, J.C. Fountain, B.T. Scully, R.D. Lee, R.C. Kemerait, B. Guo, Protein profiles reveal diverse responsive signaling pathways in kernels of two maize inbred lines with contrasting drought sensitivity. *International journal of molecular sciences*, 15 (2014) 18892–18918.
- [40] L. Du, T. Yang, S.V. Puthanveetil, B.W. Poovaiah, Decoding of calcium signal through calmodulin: calmodulin-binding proteins in plants. In *Coding and Decoding of Calcium Signals in Plants* (2011) (pp. 177–233) Springer, Berlin, Heidelberg.
- [41] A.S.N. Reddy, Calcium: silver bullet in signaling. *PlantSci.* 160 (2001) 381–404.
- [42] J. Kudla, O. Batistic, K. Hashimoto, Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *PlantCell* 22 (2010) 541–563.
- [43] K. Kosová, M.O. Urban, P. Vítámvás, I.T. Prášil, Drought stress response in common wheat, durum wheat, and barley: transcriptomics, proteomics, metabolomics, physiology, and breeding for an enhanced drought tolerance. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 2 (2016) (pp. 277–314). Springer, Cham.
- [44] B.W. Poovaiah, A.S.N. Reddy, L. Feldman, Calcium and signal transduction in plants. *Critical reviews in plant sciences* 12 (1993) 185–211.

- [45] N.H. Evans, M.R. Mcainsh, A.M. Hetherington, Calcium oscillations in higher plants. *Curr.Opin.PlantBiol* 4 (2001) 415–420.
- [46] W.A. Snedden, H. Fromm, Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol.* 151 (2001) 35–66.
- [47] S. Zhou, M. Palmer, J. Zhou, S. Bhatti, K.J. Howe, T. Fish, T.W. Thannhauser, Differential root proteome expression in tomato genotypes with contrasting drought tolerance exposed to dehydration. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138 (2013) 131-141.
- [48] M.A. Rahman, K. Yong-Goo, A. Iftekhar, G.S. LIU, L. Hyoshin, L.J. Joo, L. Byung-Hyun, Proteome analysis of alfalfa roots in response to water deficit stress. *Journal of integrative agriculture*, 15 (2016) 1275-1285.
- [49] D.A. Parsell, S. Lindquist, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics*, 27 (1993) 437-496.
- [50] K.C. Kregel, Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology*, 92 (2002) 2177-2186.
- [51] M. Hajheidari, M. Abdollahian-Noghabi, H. Askari, M. Heidari, S.Y. Sadeghian, E.S. Ober, G. Hosseini Salekdeh, Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5 (2005) 950-960.
- [52] X. Yu, A. Yang, A.T. James, Comparative proteomic analysis of drought response in roots of two soybean genotypes. *Crop and Pasture Science*, 68 (2017) 609-619.
- [53] T. Nystrom, F.C. Neidhardt, Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6 (1992) 3187–3198.
- [54] R.D. Isokpehi, S.S. Simmons, H.H. Cohly, S.I. Ekunwe, G.B. Begonia, W.K. Ayensu, Identification of drought-responsive universal stress proteins in viridiplantae. *Bioinformatics and biology insights*, 5 (2011) BBI-S6061.
- [55] M. Bhuria, P. Goel, S. Kumar, A.K. Singh, The promoter of AtUSP is co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* 7 (2016) 1957.
- [56] G. Merkouropoulos, E. Andreasson, D. Hess, T. Boller, S.C. Peck, An *Arabidopsis* protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 10493-10499.
- [57] R. Loukehaich, T. Wang, B. Ouyang, K. Ziaf, H. Li, J. Zhang, SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal of Experimental Botany* 63 (2012) 5593–5606.
- [58] I. Turkan, *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era* (2011) (Vol. 57). San Diego, CA, USA: Academic Press.

- [59] J. Sun, J. Gu, J. Zeng, Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different droughttolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. *Sci Hort* 161 (2013) 249-258.
- [60] C. Kaya, M. Ashraf, O. Sonmez, A.L. Tuna, T. Polat, S. Aydemir, Exogenous application of thiamin promotes growth and antioxidative defense system at initial phases of development in salt-stressed plants of two maize cultivars differing in salinity tolerance. *Acta Physiol Plant* 37 (2015) 1741.
- [61] S.G. Sarvajeet, N. Tuteja, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48 (2010) 909-930.
- [62] S. Shafiq, N.A. Akram, M. Ashraf, Does exogenously applied trehalose alter oxidative defense system in the edible part of radish (*Raphanus sativus* L.) under water deficit conditions? *Sci Hort* 185 (2015) 68-75.
- [63] A. Ghaffar, N.A. Akram, M. Ashraf, Y. Ashraf, M. Sadiq, Thiamin-induced variations in oxidative defense processes in white clover (*Trifolium repens* L.) under water deficit stress. *Turkish Journal of Botany*, 43 (2019) 58-66.
- [64] I. Cakmak, W.J. Horst, Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83 (1991) 463-468.
- [65] W. Li, F.A. Zhao, W. Fang, D. Xie, J. Hou, X. Yang, S. Lv, Identification of early salt stress responsive proteins in seedling roots of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) employing iTRAQ-based proteomic technique. *Frontiers in plant science*, 6 (2015) 732.
- [66] J. Zhang, M.B. Kirkham, Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, 35 (1994) 785-791.
- [67] A.R.M. Merwad, E.S.M. Desoky, M.M. Rady, Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Scientia Horticulturae*, 228 (2018) 132-144.
- [68] G.R. Cramer, S.C. van Sluyter, D.W. Hopper, D. Pascovici, T. Keighley, P.A. Haynes, Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to water deficit. *BMC Plant Biol* (2013) 13:49.
- [69] E. Gil-Quintana, D. Lyon, C. Staudinger, S. Wienkoop, E.M. González, *Medicago truncatula* and *Glycine max*: different drought tolerance and similar local response of the root nodule proteome. *Journal of proteome research* 14 (2015) 5240-5251.
- [70] C. Kaur, S. Sharma, S.L. Singla-Pareek, S.K. Sopory, Methylglyoxal detoxification in plants: Role of glyoxalase pathway. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21 (2016) 377-390.
- [71] C. Kaur, H.R. Kushwaha, A. Pareek, S.K. Sopory, S.L. Singla-Pareek, Analysis of global gene expression profiles of rice in response to methylglyoxal indicates its possible role as a stress signal molecule. *Frontiers in Plant Science* 6 (2015a) 682.

- [72] C. Kaur, S. Sharma, S.L. Singla-Pareek, S.K. Sopory, Methylglyoxal, Triose Phosphate Isomerase, and Glyoxalase pathway: Implications in abiotic stress and signaling in plants. In Pandey, G. K., (Ed.) *Elucidation of abiotic stress signaling in plants* (2015b) (pp. 347–366) New York: Springer.
- [73] S. Yadav, S.L. Singla-Pareek, M. Ray, M.K. Reddy, S.K. Sopory, Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 337 (2005). 61–67.
- [74] T.M. Oliveira, F.R. Da Silva, D. Bonatto, D.M. Neves, R. Morillon, B.E. Maserti, A.S. Gesteira, Comparative study of the protein profiles of Sunki mandarin and Rangpur lime plants in response to water deficit. *BMC plant biology* 15 (2015) 69.
- [75] Z. Zhang, M. Chao, S. Wang, J. Bu, J. Tang, F. Li, B. Zhang, Proteome quantification of cotton xylem sap suggests the mechanisms of potassium-deficiency-induced changes in plant resistance to environmental stresses. *Scientific reports* 6 (2016) 21060.
- [76] G. Duby, M. Boutry, The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Arch* 457 (2009) 645–655.
- [77] S. Merlot, N. Leonhardt, F. Fenzi, C. Valon, M. Costa, L. Piette, A. Vavasseur, B. Genty, K. Boivin, A. Müller, Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26 (2007) 3216–3226.
- [78] J. Bose, A. Rodrigo-Moreno, D. Lai, Y. Xie, W. Shen, S. Shabala, Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of botany* 115 (2014) 481–494.

4 CONCLUSÃO

Stylosanthes scabra apresenta possíveis nodulinas tardias que parecem desempenhar suas atividades, mesmo sob déficit hídrico. Algumas delas, apresentaram diferença na expressão, podendo estar relacionado com resposta ao estresse e manutenção da Fixação Biológica de Nitrogênio.

O perfil proteômico total sob as técnicas de 2D-PAGE e LC-MS/MS apresentou principalmente proteínas diferencialmente acumuladas que respondem a condições ambientais estressantes, como déficit hídrico. As principais vias que tais proteínas se enquadram são resposta à estímulos, sistema redox e glicólise.

É possível que *S. scabra*/85 UNEB apresente memória de estresse, o que a faz conter em seu proteoma proteínas relacionadas a resposta aos estresses, mesmo quando em condições favoráveis, o que torna mais rápida e eficiente sua percepção a condição ambiental adversa, se for necessário.

REFERÊNCIAS

- ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends Microbiology**, v. 15, p. 135-141, 2007.
- AHSAN, N. et al. Ozone stress-induced proteomic changes in leaf total soluble and chloroplast proteins of soybean reveal that carbon allocation is involved in adaptation in the early developmental stage. **Proteomics**, v. 10, n. 14, p. 2605-2619, 2010b.
- AHSAN, N. et al. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 4189-4204, 2010a.
- AHSAN, N.; NAKAMURA, T.; KOMATSU, S. Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd)-accumulating soybean cultivars under Cd stress. **Amino acids**, v. 42, n. 1, p. 317-327, 2012.
- ALSCHER, R. G.; CUMMING J.R. (Eds.). Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Nova York: Wiley-Liss, 1990, p. 241–264.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. **O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil**. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, Lavras. Anais. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, p.273-309, 2000.
- ARAÚJO FILHO, J. A. Propuestas Tecnológicas para el manejo de la vegetación de la Caatinga com fines pastoriles. In: ROJAS, L. I. **La producción de rumiantes menores en las zonas áridas de Latinoamérica**. Brasília, Embrapa Caprinos e Ovinos, Cap.12, p.281-294, 2013.
- ARRESE-IGOR, C. et al. Physiological responses of legume nodules to drought. **Plant stress**, v. 5, n. 1, p. 24-31, 2011.
- ARRESE-IGOR, C. Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. **Symbiosis**, v. 27, p. 189-212, 1999.
- ASHBURNER, Michael et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25, 2000.
- AVEZUM, Á. et al. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Rio de Janeiro, v. 83, n.4, p. 1-86, Set 2004.
- AYARZA, M. et al. **Introdução de *Stylosanthes guianensis* Cv. Mineirão em pastagens de *Brachiaria ruziziensis*: Influencia na produção animal e vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Boletim técnico 1, 16p. 1997.

- BAHYRYCZ, Agata; KONOPÍŃSKA, Danuta. Plant signalling peptides: some recent developments. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 13, n. 12, p. 787-797, 2007.
- BARCELLOS, A. O. et al. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17, 2000, Piracicaba. A planta forrageira no sistema de produção: anais. Piracicaba: FEALQ, 2000. 2. ed. p. 297-357, 2001
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. October 2011, p. 23–58, 2005.
- BATISTA, Rita et al. Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10624, 2017.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. GENOSOJA-The Brazilian soybean genome consortium: high throughput omics and beyond. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. i-iv, 2012
- BENKO-ISEPPON, A.M. et al. Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e outras angiospermas. In: Elcida de Lima Araújo; Eliana Akie Simabukuro; Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira; Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa; Adriana Mayumi Yano Melo (Org.). Estresses Ambientais: danos e/ou benefícios para as plantas. 1ª edição. Recife: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 1, pp 350-359, 2005.
- BHAGAT, Pawan Kumar et al. Effect of *Rhizobium* inoculation on growth and biomass accumulation in *Leucaena Leucocephala*. **The Ecoscan**, p. 65-74, 2014.
- BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação - O papel da bioinformática em expansão. **Biotecnologia Ciência**, v. 32, p. 28-37, 2004.
- BRAY, E. Molecular response to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035–1040, 1993.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W Buchannan B Jones R (Eds) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p. 1158-1249, 2000.
- BROWN, R.L. et al. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of The PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1020-1032, 2003.

- BRUCE, T. J. A. et al. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603-608, 2007.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, pp 1159-1162, 2000.
- BURT, R. L. et al. Small-sward testing of *Stylosanthes* in northern Australia: preliminary considerations. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 25, n. 4, p. 559-575, 1974.
- CALLES, Teodardo; SCHULTZE-KRAFT, Rainer. *Stylosanthes* (Leguminosae, Dalbergieae) of Venezuela. **Willdenowia**, v. 40, n. 2, p. 305-A8, 2010.
- CANTÚ, Marcelo Delmar et al. Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CAO, Yangrong et al. The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. **Annual review of plant biology**, v. 68, p. 535-561, 2017.
- CARVALHO, Paulo Costa et al. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 6, p. 431-436, 2006.
- CATHERMAN, Adam D.; SKINNER, Owen S.; KELLEHER, Neil L. Top down proteomics: facts and perspectives. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 445, n. 4, p. 683-693, 2014.
- Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA. Disponível em :<www.cria.org.br> Acesso em 10 de janeiro de 2019.
- CHAVES, M. M., MAROCO, J. P., PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239–264, 2003.
- CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33-45, 2013.
- CHEN, S. X.; HARMON A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v.6, p.5504-5516. 2006.
- CHEON, C. I.; HONG, ZONGLIE; VERMA, D. P. Nodulin-24 follows a novel pathway for integration into the peribacteroid membrane in soybean root nodules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 9, p. 6598-6602, 1994.
- CONRATH, Uwe et al. Priming for enhanced defense. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 97-119, 2015.

- CORDEIRO, Y. E. M. et al. Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. **Forest ecology and management**, v. 258, p. 1449-1455, 2009.
- COSTA, L. C.; SARTORI, A. L. B.; POTT, A. Estudo Taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia** n.59, n.3, p.547-572, 2008.
- COSTA, L. C.; VALLS, J. F. M. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>. 2015.
- COSTA, N. M. S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** 2006. 470f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2006.
- CREWS, T. E.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 102, n. 3, p. 279-297, 2004.
- CRUZ, L.P. Caracterização do proteoma de entrenós maduros e imaturos de cana-de-açúcar durante o estágio de maturação – PA. 2012. 200p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CUI, Dezhou et al. Proteomic analysis of seedling roots of two maize inbred lines that differ significantly in the salt stress response. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116697, 2015.
- D’URSO, Agustina; BRICKNER, Jason H. Mechanisms of epigenetic memory. **Trends in genetics**, v. 30, n. 6, p. 230-236, 2014.
- DE FARIA, S. M. et al. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, v. 111, n. 4, p. 607-619, 1989.
- DIAZ, Clara L. et al. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1167-1177, 1995.
- DOWNIE, J. Allan. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.
- DUC, Gérard et al. Breeding annual grain legumes for sustainable agriculture: new methods to approach complex traits and target new cultivar ideotypes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 381-411, 2015.
- EDYE, L. A. et al. A preliminary agronomic evaluation of *Stylosanthes* species. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 24, n. 4, p. 511-525, 1973.

- EDYE, L. A. et al. Comparison of some *Stylosanthes* species at three sites in central Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 16, n. 82, p. 715-722, 1976.
- EDYE, L. A. et al. Sward tests of some morphological-agronomic groups of *Stylosanthes* accessions in dry tropical environments. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 3, p. 481-496, 1975.
- EDYE, L. A. et al. The symbiotic effectiveness and geographic origin of morphological-agronomic groups of *Stylosanthes* accessions. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 14, n. 68, p. 349-357, 1974a.
- EDYE, L.A. et al. Classification of the *Stylosanthes* collections 1928-69. CSIRO Div. Trop. Agron. Tech. Pap. No. 15. 1974b.
- EMBRAPA GADO DE CORTE. **Estilosantes Campo-Grande: estabelecimento, manejo e produção animal**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 8 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 61), 2000.
- FERGUSON, Brett J. et al. Legume nodulation: The host controls the party. **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 1, p. 41-51, 2019.
- FERGUSON, Brett J. et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of integrative plant biology**, v. 52, n. 1, p. 61-76, 2010.
- FERREIRA, B.M.; COSTA, S.M.N. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Epaming, Belo Horizonte. 107p. 1979.
- FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. O gênero *Stylosanthes* Sw. no estado de Minas Gerais. **Epamig, Belo Horizonte**. 52p, 1982.
- FLETA-SORIANO, Eva; MUNNÉ-BOSCH, Sergi. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 143, 2016.
- FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J.; TOZZI, A. M. G. A. *Stylosanthes* (Leguminosae–Papilionoideae–Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, n.62, v.3, p.615-628. 2011.
- GARCIA-SECO, Daniel et al. Transcriptome and proteome analysis reveal new insight into proximal and distal responses of wheat to foliar infection by *Xanthomonas translucens*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10157, 2017.
- GHAZALPOUR, Anatole et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. **PLoS genetics**, v. 7, n. 6, p. e1001393, 2011.

- GIL-QUINTANA, Erena et al. Is N-feedback involved in the inhibition of nitrogen fixation in drought-stressed *Medicago truncatula*?. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 1, p. 281-292, 2012.
- GIL-QUINTANA, Erena et al. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 8, p. 2171-2182, 2013.
- GIL-QUINTANA, Erena et al. *Medicago truncatula* and *Glycine max*: different drought tolerance and similar local response of the root nodule proteome. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 12, p. 5240-5251, 2015.
- GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2006.
- GONZÁLEZ, E. M. et al. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, n. 10, p. 1515-1523, 1995.
- GUENTHER, James F. et al. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. **The Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 981-991, 2003.
- HANSON, A.D.; HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review Plant Physiology**, v. 33, p. 163-203, 1982.
- HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79–102, 1997.
- HASHIMOTO, Yoshiko; KONDO, Takefumi; KAGEYAMA, Yuji. Lilliputians get into the limelight: novel class of small peptide genes in morphogenesis. **Development, growth & differentiation**, v. 50, p. S269-S276, 2008.
- HILKER, Monika et al. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1118-1133, 2016.
- HOFFMANN, A. et al. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período seco. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, Sinop-MT, v. 02, n. 02, p. 119-130, 2014.
- HORVATHY NETO, A. et al. Consórcio sorgo e braquiária para produção de grãos e biomassa na entressafra. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, suplemento, p. 743-749, 2012.
- HSIAO, T. C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 519-570, 1973.

- JUNIOR, Lira; ANDRADE, Mario. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 945, 2015.
- KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, Rio de Janeiro, 452 p. 2004.
- KIRKBRIDE JR, Joseph H.; DE KIRKBRIDE, M. Cristina Garcia. Typification of *Stylosanthes* (Leguminosae) and its sections. **Taxon**, p. 455-458, 1987.
- KOMATSU, S. et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. **Amino acids**, v. 39, n. 5, p. 1435-1449, 2010.
- KOTTAPALLI, K. R. et al. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 4, p. 380-407, 2009.
- KOTTAPALLI, Kameswara Rao et al. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three co
- KRAMER, P. J., BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. Londres: Academic Press, 1995.
- KUMAR, ANISH; DASH, D.; JHARIYA, M. K. Impact of *Rhizobium* on growth, biomass accumulation and nodulation in *Dalbergia sissoo* seedlings. **The Bioscan**, v. 8, n. 2, p. 553-560, 2013.
- LÄMKE, Jörn; BÄURLE, Isabel. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 124, 2017.
- LAPORTE, P. et al. Riboregulators in plant development. 2007.
- LARANJO, Marta; ALEXANDRE, Ana; OLIVEIRA, Solange. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 2-17, 2014.
- LEE, D.; REDFERN, O.; ORENCO, C. Predicting protein function from sequence and structure. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 995-1005, 2007.
- LEWIS, G. P.; MACKINDER B.; LOCK, M. (Eds.) **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 578 p. 2005.
- LI, Xiangnan et al. Drought priming at vegetative stage improves the antioxidant capacity and photosynthesis performance of wheat exposed to a short-term low temperature stress at jointing stage. **Plant and soil**, v. 393, n. 1-2, p. 307-318, 2015.

- LI, Xin et al. MtCAS31 aids symbiotic nitrogen fixation by protecting the leghemoglobin MtLb120-1 under drought stress in *Medicago truncatula*. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.
- LIGHT, William H.; BRICKNER, Jason H. Nuclear pore proteins regulate chromatin structure and transcriptional memory by a conserved mechanism. **Nucleus**, v. 4, n. 5, p. 357-360, 2013.
- LPWG, LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- MACEDO, M. C. M. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 133-146, 2009.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry Biophysics**, 444, 139-158, 2005.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.
- MANSFIELD, T. J.; ATKINSON, C. J. Stomatal behaviour in water stressed plants. In: MARCOTTE, Edward M. How do shotgun proteomics algorithms identify proteins?. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 755, 2007.
- MARINO, Daniel et al. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic?. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1968-1974, 2007.
- MARQUES, André et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals of botany**, v. 122, n. 7, p. 1143-1159, 2018.
- McKEY, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: SPRENT, J. I.; McKEY, D. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, p.211-228, 1994.
- [Media/Html/Stylosanthes_scabra.htm](#)> Acesso em 20 de maio de 2017.
- MENÉNDEZ, Esther et al. Recent advances in the active biomolecules involved in Rhizobia-Legume symbiosis. In: **Microbes for Legume Improvement**. Springer, Cham, 2017. p. 45-74.
- MINCHIN, F. R. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 881-888, 1997.
- MIRANDA, C.H.B.; FERNANDES, C.D.; CADISCH, G. Quantifying the nitrogen fixed by *Stylosanthes* spp. **Pasturas Tropicales**, v.21, p.64-69, 1999.

- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends In Plant Science*, 11, 15–19, 2006.
- MOHAMMADI, P. P. et al. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *Journal of proteomics*, v. 75, n. 6, p. 1906-1923, 2012.
- MONTI, M. et al. Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 357: 140-150, 2005.
- MORAES, J.V. **Parâmetros biométricos, fisiológicos e bioquímicos em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* sob diferentes regimes de irrigação em casa de vegetação**. São Paulo, 78p. Tese(doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2011.
- MOURÃO, S. A.; KARAM, D.; SILVA, J. A. A. **Uso de leguminosas no Semiárido mineiro**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documento 135, 91 p. 2011.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 12 de janeiro de 2019.
- NEILSON, K. A. et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, v. 11, n. 4, p. 535-553, 2011.
- NODA, ROBERTO WILLIAMS NODA; BORGES, Cynthia Maria; DE SOUSA, Sylvia Moraes. **Anotação funcional de sequências com BLAST2GO**. Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
- OLDROYD, Giles ED et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*, v. 45, p. 119-144, 2011.
- OTT, Thomas et al. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, v. 15, n. 6, p. 531-535, 2005.
- OVERALL, Christopher M. Can proteomics fill the gap between genomics and phenotypes?. 2014.
- P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Eds.), **Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation**. Berlin: Springer Verlag, 1982, p. 35–77.
- PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. Fisiologia e Produção Vegetal. Lavras. **Ed. UFLA**, 2006. 104p.
- PARK, O. K. Proteomics studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.37, p.133-138. 2004.
- PAULO, Joao A. et al. Mass spectrometry-based proteomics for translational research: a technical overview. *The Yale journal of biology and medicine*, v. 85, n. 1, p. 59, 2012.

- PEIXOTO, A. M. et al. A Planta forrageira no sistema de produção. In: 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem. Anais...FEALQ, Piracicaba, 2001.
- PRINSI, Bhakti et al. Root proteomic and metabolic analyses reveal specific responses to drought stress in differently tolerant grapevine rootstocks. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 126, 2018.
- PROSDOCINI, F. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 12-25, 2002.
- QURESHI, M.I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **J Plant Physiol** 164:1239-1260, 2007.
- RAMÍREZ, D. A. et al. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Science**, v. 238, p. 26-32, 2015.
- RATHI, Divya et al. Legume proteomics: progress, prospects, and challenges. **Proteomics**, v. 16, n. 2, p. 310-327, 2016.
- SABBATINI, R. M. E. A bioinformática chegou. **Revista Informática Médica**, v. 2, p. 4-6, 1999.
- SACHS, Joel L.; SKOPHAMMER, Ryan G.; REGUS, John U. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 2, p. 10800-10807, 2011.
- SALAH, H. B. H.; TARDIEU, F. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. **Plant Physiology**, v. 114, p. 893-900, 1997.
- SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2015.
- SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant J**. 31: 279-292, 2002.
- SENGUPTA, Debashree; KANNAN, Monica; REDDY, Attipalli R. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Planta**, v. 233, n. 6, p. 1111-1127, 2011.
- SERRAJ, Rachid; VADEZ, Vincent; SINCLAIR, Thomas. Feedback regulation of symbiotic N₂ fixation under drought stress. **Agronomie**, v. 21, n. 6-7, p. 621-626, 2001.
- SILVERSTEIN, Robert M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & sons, 2014.

- SHUKLA, N. et al. Seed biopriming with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 2, p. 171-182, 2015.
- SKRABANEK, L.; SAINI, H.K.; BADER, G.D.; ENRIGHT, A.J. Computational prediction of protein-protein interactions. **Molecular biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2008.
- SPRENT, Janet I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, v. 174, n. 1, p. 11-25, 2007.
- SPRENT, Janet I.; ARDLEY, Julie; JAMES, Euan K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017.
- STACE, H.M. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Austalian Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 87-96. 1982.
- STACE, H.M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and evolution of in *Stylosanthes*. In: Stace, H. M.; Edye, L. A., eds. **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Sidney: Academic Press. p.49 – 71, 1984.
- STIEF, Anna et al. Epigenetic responses to heat stress at different time scales and the involvement of small RNAs. **Plant signaling & behavior**, v. 9, n. 10, p. e970430, 2014.
- SUBBARAO, G. V. et al. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 14, n. 6, p. 469- 523, 1995.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Publishers Sunderland, 705 p. 2006.
- TARAWALI, G. et al. [Online] **Smallholders' use of *Stylosanthes* for sustainable food Production in subhumid West Africa**. In: International Workshop on Green-Manure Cover Crop Systems for Smallholders in Tropical and Subtropical Regions, 6–12 Apr, Chapeco, Brazil. Doc. 18. Homepage; http://www.crdi.ca/es/ev-31918-201-1-do_topic.html>2005.
- TAYLOR, N. L. et al. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 1122-1133, 2005.
- THIMM, Oliver et al. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.
- TIAN, Tian et al. agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W122-W129, 2017.
- TROPICAL FORAGES. Disponível em <<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/>

- TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 1, p.175- 190, 1986.
- TYREE, M. T.; JARVIS, P. G. Water in tissues and cells. In: LANGE, O. L.; NOBEL, UDVARDI, Michael; POOLE, Philip S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 781-805, 2013.
- Universal Protein Resource – UniProt. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/>> Acesso em 12 de janeiro de 2019.
- VERZIGNASE, J. R.; FERNANDES, C. D. **Estilosantes Campo-Grande: Situação Atual Perspectivas**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 3 p. (Comunicado Técnico, nº 70), 2002.
- VIEIRA, E. A. et al. **Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 5, p. 661-667, 2007.
- VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M L.R.; MARTINS, P.S. Cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, 58: 305-311. 1993.
- VILELA, H. **Seleção e Escolha de Espécies Forrageiras**. Formação de Pastagens. CPT. Viçosa. 128p. 2000.
- WALTER, Julia et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34-40, 2011.
- WANG, Xiao et al. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 22, p. 6441-6456, 2014.
- WANG, Xiao et al. Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. **Plant growth regulation**, v. 75, n. 3, p. 677-687, 2015.
- WASINGER, V. C. et al. Humpherysmith. Progress with gene-product mapping of the mollicutes - **Mycoplasma genitalium**. **Electrophoresis**, v.16, p.1090-1094. 1995.
- YAMAGUCHI, M. et al. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 2, p. 223-243, 2010.
- YI, Z.; HONG-BO, S. The responding relationship between plants and environment is the essential principle for agricultural sustainable development on the globe. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 321–328, 2008.

- ZADRAŽNIK, Tanja et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of proteomics**, v. 78, p. 254-272, 2013.
- Contrasting peanut genotypes. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 4, p. 380-407, 2009.
- ZAHARAN, Hamdi Hussein. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.

ANEXO A: INSTRUÇÕES PARA AUTORES: *GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY*

SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage

<http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform

hosted at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

The cover letter should be addressed to:

Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

- a)** The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process. The submitting author must provide an ORCID ID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system.
- b)** Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.
- c)** Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).
- d)** The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office. We strongly encourage co-authors to also provide their ORCID iDs at the time of submission.
- e)** In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).
- f)** Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page,

Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a

date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in Calyptommatus and the karyotypes of Psilophthalmus and Tretioscincus (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), (September 4, 2009)

LEM Software, (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

Table S1 – < short title >

Figure S1 – < short title >

This material is available as part of the online article from

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.

- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Genome Insight For GMB

A new section of articles devoted to genome data (Genome Insight) will be considered for publication in Genetics and Molecular Biology. Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance. Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript. Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the Editor is necessary. Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.m. in our Instructions to Authors.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding other. The latter will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5.Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.

ANEXO B: INSTRUÇÕES PARA AUTORES: *JOURNAL BBA - PROTEINS AND PROTEOMIC*



BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA PROTEINS AND PROTEOMICS
One of the nine topical journals of [BBA](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- Description p.1
- Audience p.1
- Impact Factor p.1
- Abstracting and Indexing p.2
- Editorial Board p.2 • Guide for Authors p.4

ISSN: 1570-9639



DESCRIPTION

BBA Proteins and Proteomics covers **protein** structure conformation and dynamics; protein folding; protein-ligand interactions; enzyme mechanisms, models and kinetics; protein physical properties and spectroscopy; and **proteomics** and **bioinformatics analyses** of protein structure, protein function, or protein regulation.

Concise and comprehensive reviews of recent developments are considered for publication. However, authors are strongly advised to consult one of the [Executive Editors](#) before starting a review.

Types of papers published: regular papers, reviews and mini-reviews.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Enzymologists, Protein chemists, Biochemists

IMPACT FACTOR

2017: 2.609 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus

MEDLINE®

EMBiology

BIOSIS

Chemical Abstracts

Current Contents (Life Sciences, Clinical Medicine)

EMBASE

Index Chemicus

Science Citation Index

Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases

EDITORIAL BOARD

Executive Editors:

Steve Matthews, Imperial College London, London, England, UK

Host-pathogen interactions Protein Structure Biological NMR spectroscopy Protein interactions Protein folding and aggregation

Daniel Otzen, Aarhus University, Aarhus, Denmark

protein aggregation, deposition diseases, protein folding and misfolding, membrane proteins, proteinlipid and protein-surfactant interactions.

Editorial Board Members:

Susan Aitken, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada pyridoxal 5'-phosphate

enzymes, sulfur amino acid biochemistry, protein engineering

Julia Bandow, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany

Bacteria, antibiotics, proteomics, mass spectrometry, protein analytics

Yudong Cai, Shanghai University, Shanghai, China

Computational Biology, Bioinformatics, Systems Biology

Jannette Carey, Princeton University, Princeton, New Jersey,

USA ligand binding, allostery, protein structure.

Barbara Cellini, University of Verona, Verona, Italy

enzymology; protein misfolding and aggregation; molecular bases of disease; pyridoxal phosphate enzymes; spectroscopic and kinetic methods; cellular model systems

Eri Chatani, Kobe University, Kobe, Japan protein aggregation, amyloid formation, protein folding and misfolding, protein structure and stability

Sixue Chen, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
glucosinolate, guard cell, proteomics, metabolomics, mass spectrometry

Martin Eisenacher, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany
Bioinformatics, Biostatistics, Algorithms, Data structures, Standard Formats, Computational Proteomics

Holly Ellis, Auburn University, Auburn, Alabama, USA

Rino Esposito, New York University Abu Dhabi, Abu Dhabi, United Arab Emirates
NMR spectroscopy; Protein NMR; H/D exchange; Protein structure and dynamics; Structure-function relationship

Walter Fast, University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA
Enzymes, Mechanisms, Inhibitors, Chemical Biology

Paul F. Fitzpatrick, University of Texas Health Sciences Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA
enzyme mechanism, kinetics, isotope effect, flavoprotein, hydroxylase

Patrick Frantom, University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama, USA
enzyme mechanisms, protein structure/function relationships, enzyme evolution, and allostery

Noriko Fujii, Kyoto University, Kyoto, Japan
D-amino acids in proteins, isomerization of aspartate residues, aging, protein aggregation, age-related diseases, D-amino acid analysis in proteins

Paul Furtmüller, University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria
Enzyme kinetics, steady-state and pre-steady-state kinetics Time-resolved circular dichroism, fluorescence, UV-vis spectroscopy thermodynamics of protein (un)folding structure-function of metalloproteins

Tom Haertlé, Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA), Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes, France

Xiaolin He, Northwestern University, Chicago, Illinois, USA
Cell-Surface Receptor, Structural Biology, Glycoprotein, Growth Factor, Protein-Protein Interaction, Protein Engineering

Bengt-Harald "Nalle" Jonsson, Linköping University, Linköping, Sweden
Protein engineering, enzyme mechanisms, protein folding and stability, protein-nanoparticle interactions, metagenomics /metaproteomics

József Kardos, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary
Protein folding, misfolding, and aggregation; protein interactions; proteomics; circular dichroism and infrared spectroscopy; calorimetry

Tadashi Kondo, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
Cancer research, proteogenomics, sarcoma

Yutaka Kuroda, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan
Thermodynamics, Protein solubility, structural biophysics, structural bioinformatics, protein folding, amorphous aggregation

Bong-Jin Lee, Seoul National University (SNU), Seoul, The Republic of Korea
protein structure, peptide drug, NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Daniel Martins-de-Souza, University of Campinas, Campinas, Brazil

Antonello Merlino, University of Naples Federico II, Naples, Italy
X-ray crystallography, Molecular dynamics, Protein structure, Protein-metallodrug interaction, Structural analysis.

Hans-Peter Mock, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany
Plant biochemistry, plant proteomics

Henriette Molinari, NMR Laboratory, ISMAC, CNR, Milano, Italy

Nuclear Magnetic Resonance, Protein structure determination, Protein-ligand interaction, Protein folding, Protein-nanoparticles interactions

Graham Moran, University of Wisconsin at Milwaukee, Milwaukee, Wisconsin, USA
Oxygenase, redox, cofactor, kinetics, intermediates, pre-steady state

Andrea Mozzarelli, University of Parma, Parma, Italy
Protein structure, dynamics and function, spectroscopic methods, hemoglobin and hemoglobin-based oxygen carriers, vitamin B6 enzymes, drug design

José Neira, Miguel Hernández University (UMH), Elche (Alicante), Spain
Protein structure, protein folding, macro-molecular interactions, NMR, biophysics, protein stability

Annalisa Pastore, King's College London, London, England, UK
Structural Biology and Biophysics, Proteins and Biochemistry, Molecular Medicine

Robert Stephen Phillips, University of Georgia, Athens, Georgia, USA
Enzyme mechanisms; Pyridoxal-5'-phosphate; lyases; alcohol dehydrogenase; tryptophan metabolism

Loredano Pollegioni, University of Insubria, Varese, Italy
Flavoenzymes; D-amino acids; D-serine; protein engineering; biocatalysis

Charles V. Rice, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, USA
NMR Spectroscopy, Bacterial Cell Wall, Biomaterials.

Jean-Francois Rual, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

Anthony Sauve, Weill Cornell Medical College, New York, USA
Sirtuins, metabolism, enzymology, chemical biology, kinetic isotope effects.

Solange M.T. Serrano, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil
snake venoms, proteomic analysis of animal toxic secretions, serine proteinases, metalloproteinases

Richard Simpson, La Trobe University, Melbourne, Victoria, Australia

James Stivers, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
Enzymology, nucleic acid-protein interactions, inhibitor design, NMR spectroscopy.

Kai Stühler, University of Dusseldorf, Düsseldorf, Germany
Protein secretion, Secretomics, Tissue Proteomics, Biomarker Research, Clinical Proteomics, Neurooncology, Mass Spectrometry

Hernán Terenzi, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
Tyrosine phosphatases; post-translational modifications; protein chemistry; bioinorganic chemistry; phosphatase biomimetics; mass spectrometry

Vito Turk, Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenia
Proteases, cathepsins, protein inhibitors, cystatins, structure

Vladimir N. Uversky, University of South Florida (USF) College of Medicine, Tampa, Florida, USA
Protein misfolding, protein non-folding, intrinsically disordered protein, partially folded protein

Willem J. H. van Berkel, Wageningen University, Wageningen, Netherlands
Molecular enzymology, oxidoreductases, flavoenzymes, biocatalysis, biorefinery

Rebekka Wachter, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
Protein structure-function, mechanistic enzymology, protein folding

Jun-Mei Zhou, Academia Sinica, Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

BBA Proteins and Proteomics section covers protein structure conformation and dynamics, proteinligand interactions, enzyme mechanisms, models and kinetics, physical properties and spectroscopy; and proteomics and bioinformatics analyses of protein structure, protein function, or protein regulation. Concise and comprehensive reviews of recent developments are considered for publication. However, authors are strongly advised to consult one of the Executive Editors before starting a review.

Technological advances in the area of x-ray crystallography have greatly increased the probability of obtaining a structure once diffraction quality crystals have been obtained. As a result *BBA* will no longer consider Short Crystallization Reports for publication in the journal. *BBA* will no longer consider manuscripts dealing with binding of compounds such as drugs or drug analogues to circulatory proteins such as serum albumin. These studies are better accommodated in journals dealing with drug design and development.

Structural data

For papers describing structures of biological macromolecules, the atomic coordinates and the related experimental data (structure factor amplitudes/intensities and/or NMR restraints) must be deposited at a member site of the Worldwide Protein Data Bank (<http://www.wwpdb.org>): RCSB PDB (<http://www.pdb.org>), MSD-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>), PDBj (<http://www.pdbj.org>), or BMRB (<http://www.bmrwisc.edu>). Manuscripts must carry a statement that coordinates and structure factors (or NMR restraints) have been deposited in the Protein Data Bank. The accession number(s) must be cited in the manuscript at the end of the Materials and Methods section. Authors must agree to release the atomic coordinates and experimental data immediately upon publication.

It is increasingly common for coordinates to be deposited in the Protein Data Bank without an associated publication. Before submission to *BBA Proteins and Proteomics*, authors are expected to search the Protein Data Bank for related structures using one or more alignment programs and report the outcome. Prior deposition of related coordinates, without an associated publication, does not necessarily preclude publication in *BBA*. The primary criteria for publication of a structure in *BBA* are that it provides novel structural insights or important new functional and biological insights that are likely to be of general interest.

NMR assignments

Tables listing resonance assignments will no longer be published in the *Journal* but should be supplied as supplementary material for posting on the Internet on ScienceDirect. Supplementary material must be included with the manuscript submitted for review (see below for full instructions). Authors are strongly encouraged to deposit assignment data in the BioMagResBank (BMRB; <http://www.bmrwisc.edu>).

Types of papers

Full-length research articles, Reviews and mini-review papers.

Reviews and mini-reviews are typically commissioned by the Editors. All Review Articles should be authoritative, state-of-the-art accounts of the selected research field, be of high interest, balanced and accurate. Beyond summaries of important scientific developments and ideas, authors are encouraged to identify and discuss how the field may be impacted or develop in the future, including insights that may be of significance to the scientific community. All *BBA* Review Articles undergo rigorous and full peer review, in the same way as regular research papers, and publication cannot be guaranteed. The number of co-authors of review articles is limited to five and each author is expected to make a substantial contribution to the writing of the manuscript.

Unsolicited reviews will be considered only in exceptional cases and should be preceded by a letter of enquiry from the prospective author, who should be a recognized expert in the field of the proposed article. Pre-submission enquires may be sent to the Editorial Office bbareviews@elsevier.com.

Specifically, authors must provide the following in their review proposal: 1) both your own and any co-author(s) affiliation and full contact details; 2) an explanation of the current interest and significance to the broad readership of the journal, that is, compelling reasons why the review should be considered; 3) a 500–600 word summary which clearly outlines what will be discussed in the article, plus up to 20 key references that indicate the intended breadth of the proposed article (please note that references should include work published in the past 2–4 years). Only proposals that include this information will be considered. Please be sure to specify which one of the ten BBA journals you request to consider your proposal.

Reviews (full-length) should provide a comprehensive analysis on topics of broad interest to the journal's readership. Reviews should be thorough, sufficiently critical and accommodate different points of view. They should stand out from other recently published reviews on the same theme. Although Reviews are not of any fixed length, they are usually 6,000 to 10,000 words in length (excluding references and figure legends), include an abstract that is no more than 150 words, up to 100 references (should include titles), and a minimum of three figures/illustrations.

Mini-reviews are succinct, focused updates of the literature related to a question of current interest in the scientific community (typically from the last 2–3 years). Subjects covered in Mini-reviews are generally narrower, either in scope or depth, than those covered in full-length Reviews. They should highlight/analyze/discuss recent and important findings and include the author's viewpoint on how the subject relates to the current state of the field. Mini-reviews are usually 2000 to 4000 words in length (excluding references and figure legends), include an abstract that is no more than 100 words, up to 50 references (should include titles), and one to three figures/illustrations.

Papers should be submitted using the BBA Proteins and Proteomics online submission system, <http://ees.elsevier.com/bbapro>. For questions on the submission and reviewing process, please contact the Editorial Office at bbapro@elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Conflict of interest

BBA Proteins and Proteomics follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: (1) All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. (2) All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. (3) All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. (4) Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. (5) Any relevant patents or copyrights

(planned, pending, or issued). (6) Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work. As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document link directly in the article. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org/>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here: http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the pop-up menu).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

[More details and an example](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the

manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

[Creative Commons Attribution \(CC BY\)](#)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

[Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs \(CC BY-NC-ND\)](#)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

[Green open access](#)

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

[Elsevier Researcher Academy](#)

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

[Language \(usage and editing services\)](#)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

[Submission](#)

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

[Referees](#)

Please submit the names, addresses, and e-mail addresses of 4 potential referees, as well as a brief description of their expertise relevant to your manuscript. Suggested reviewers should be individuals qualified to evaluate the work you have submitted. Editorial Board members who do not have relevant expertise on the topic of your article should not be suggested. Please note that the reviewers suggested

may not be current, recent or extensive collaborators of yours, and cannot have been involved in the preparation of the manuscript.

Please note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. Failure to provide appropriate reviewer suggestions as noted above may result in your manuscript being returned to you without review.

Authors may request exclusion of certain referees if conflicts of interest are anticipated. However, no more than 3 such names should be given. Entire groups, institutions or countries cannot be specified for exclusion.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

A Regular paper should have a Summary of 100-250 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Standards for Reporting Enzymology Data (STRENDa)

This journal follows the recommendations of the STRENDa (**S**tandards for **R**eporting **E**nzymology **D**ata) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this [pdf](#) file. All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational

modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay **must** always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters.

First-order and second-order rate constants: see [pdf](#) for full instructions.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

While it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable as long as they are applied to the entire image and do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Digital images in manuscripts nearing acceptance for publication may be scrutinized for any indication of improper manipulation. *BBA Proteins and Proteomics* reserves the right to ask for original data or images and, if these are not satisfactory, we may decide not to accept the manuscript.

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow

the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bba-proteins-and-proteomics>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).