

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de
arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro**

Renata Juliana Ahlert

Pelotas, 2010

Renata Juliana Ahlert

**Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz
(*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Antonio Costa de Oliveira, Ph.D - FAEM, UFPel

Co-orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida, Dr. – UFV

Fernando Irajá Félix de Carvalho, Ph.D – FAEM, UFPel

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A286a Ahlert, Renata Juliana

Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro / Renata Juliana Ahlert ; orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientadores Fernando Irajá Félix de Carvalho e Andréa Miyasaka de Almeida - Pelotas, 2010.-69f. ; il..- Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.*Oryza sativa* L. 2.Proteômica 3.Ferro 4.Toxidez
5.Espectrometria de massa I. Oliveira, Antonio Costa de (orientador) II .Título.

CDD 633.18

Banca examinadora:

Antônio Costa de Oliveira, Ph.D – FAEM/UFPeI (presidente)

Luciano do Amarante, Ph.D – IQG/UFPeI

Enrique Moliterno, Dr. – CCGL Tec/Fundacep

Agradecimentos

À Deus, por iluminar o meu caminho.

Ao Professor Antonio Costa de Oliveira, pelas oportunidades ao longo desse percurso, confiança, dedicação e ensinamentos na orientação desse trabalho.

À Professora Andréa Miyasaka de Almeida, pelo imenso apoio, preocupação constante, confiança, ensinamentos e paciência durante a execução desse trabalho e pela co-orientação.

Ao professor Fernando Irajá Félix de Carvalho, pelas oportunidades e aprendizado durante esses anos de atividade no Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

À colega e amiga de Viçosa, Rosilene Mesquita, pela imensa contribuição e ensinamentos na área de proteômica e também pela companhia agradável durante as longas horas de trabalho nas dependências da UFV.

Aos pesquisadores Monique Trugilho e Richard Valente do Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo apoio, paciência e atenção na execução das análises proteômicas.

Aos professores, Marcelo Ehlers Loureiro, Marco Oliva Cano e Fábio Da Matta, pela oportunidade de realizar meus trabalhos nos laboratórios do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Aos professores Luciano do Amarante e Denise Colares pelas dicas valiosas na etapa final desse trabalho.

Aos colegas e amigos da Universidade Federal de Viçosa, principalmente do laboratório de Fisiologia Molecular, pela atenção, apoio e por tornarem o período que passei em Viçosa mais alegre.

Aos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento pelo apoio na realização de trabalhos e aos amigos por tornarem essa convivência diária muito mais alegre e agradável.

Aos meus pais Pedro e Lucena e minha irmã Roberta meu eterno agradecimento pelo apoio constante, por todo carinho e dedicação em mais essa etapa da minha vida.

Ao meu namorado Maurício, pela compreensão e carinho.

À todos que de alguma forma contribuíram na execução desse trabalho.

Resumo

AHLERT, Renata Juliana. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O arroz é uma cultura que possui grande importância alimentar e econômica. O ferro é um elemento essencial para o desenvolvimento da cultura e necessário para funções essenciais da planta, como fotossíntese, respiração e síntese de DNA. Porém, em condições de cultivo irrigado, o baixo potencial redox do meio leva a redução do ferro presente na solução do solo o qual torna-se prontamente disponível, podendo se tornar tóxico à planta quando absorvido em excesso. Em áreas de cultivo de arroz do Rio Grande do Sul, o ferro tem causado problemas de toxidez e o uso de cultivares tolerantes torna-se uma importante estratégia para solucionar o problema, sendo necessário o estudo dos mecanismos que conferem essa tolerância às plantas para aplicação em programas de melhoramento. A proteômica é uma importante ferramenta, que através da combinação de técnicas como a eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa permite a análise do complexo de proteínas envolvido nas respostas às condições ambientais adversas. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar e identificar proteínas com expressão diferencial em raízes de cultivares de arroz quando submetidas ao estresse por ferro, para identificar mecanismos envolvidos na tolerância a esse estresse. Foram utilizadas duas cultivares de arroz, Epagri 107 e BR-IRGA 410, tolerante e sensível à toxidez por ferro, respectivamente, que foram submetidas ao tratamento com FeSO_4EDTA 7mM. Através de eletroforese em gel bidimensional, foram identificados 284 spots com diferença de expressão entre as combinações de tratamentos (entre cultivares e plantas tratadas e controle). Desse total, 93 proteínas foram identificadas por espectrometria de massa. As proteínas identificadas estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, transdução de sinais, relacionadas à defesa da plantas, a fatores de transcrição, transposons, ácidos nucleicos, reações redox, entre outras funções. Grande parte das proteínas não possui função conhecida. A proteína glutathione S-transferase e o fator de transcrição tipo GATA que possuem relação direta com o metabolismo do ferro, foram diferencialmente expressos na cultivar tolerante quando submetida ao estresse. Sua associação com o mecanismo de tolerância necessita, no entanto ser confirmada.

Abstract

AHLERT, Renata Juliana. **Differential proteomic analysis for the roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings submitted to iron stress.** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Rice crop has great food and economic importance. Iron is an essential element for the development of crop and necessary for essential plants functions, such as photosynthesis, respiration and DNA synthesis. However, under irrigated cultivation conditions, the low redox potential leads to reduction of iron in the soil solution which is readily available and can become toxic to plants if absorbed in excess. In rice production areas of Rio Grande do Sul, the iron has caused problems of toxicity and the use of tolerant cultivars becomes an important strategy to solve the problem being necessary the study of mechanisms that give this tolerance to plants for application in breeding programs. Proteomics is an important tool, which through a combination of techniques such as two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry allows the analysis of proteins complex involved in response to adverse environmental conditions. The objective of this study was to analyze and identify proteins with differential expression in roots of rice cultivars exposed to iron stress, to identify mechanisms involved in stress tolerance. It was used two rice cultivars, Epagri 107 and BR-IRGA 410, tolerant and sensitive to the iron toxicity, respectively, which were subjected to treatment with 7mM FeSO₄EDTA. Through two-dimensional gel electrophoresis, it was identified 284 spots with differential expression between combinations of treatment (between cultivars and plants treated and control). Of this total, 93 proteins were identified by mass spectrometry. The identified proteins were involved in carbohydrate metabolism, signal transduction, related to plant defense, transcription factors, transposons, nucleic acids, redox reactions, among other functions. Many of the proteins have no known function. The glutathione S-transferase protein and GATA type transcription factor that have direct relation to iron metabolism were differentially expressed in the tolerant cultivar when submitted to stress. Its association with the tolerance mechanism requires, however, be confirmed.

Lista de Figuras

Figura 1	Média da quantidade de ferro, em mg Kg^{-1} (ppm) presente na parte aérea das cultivares Epagri 107 e BR-IRGA 410 submetidas ao tratamento com 7 mM de FeSO_4EDTA	18
Figura 2	Média da quantidade de ferro, em mg Kg^{-1} (ppm) presente em raízes das cultivares Epagri 107 e BR-IRGA 410 submetidas ao tratamento com 7 mM de FeSO_4EDTA	18
Figura 3	Imagens digitalizadas dos quatro géis bidimensionais referência, para cada cultivar e seus respectivos tratamentos (Controle e tratamento com FeSO_4EDTA).....	20
Figura 4	Correlação entre géis de proteínas de raízes de arroz submetidas ao estresse por ferro e controle, dentro de cada cultivar. (A) Cultivar sensível (BR-IRGA 410), correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais tratados com FeSO_4EDTA e controle (não tratado). (B) Cultivar tolerante (Epagri 107) correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais tratados com FeSO_4EDTA e controle (não tratado).....	21
Figura 5	Correlação entre géis de replicatas biológicas de proteínas de raízes do controle da cultivar Epagri 107 (tolerante). Epagri 107 (tolerante) correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais de replicatas biológicas do controle da cultivar Epagri 107.....	22
Figura 6	Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no controle da cultivar Epagri 107 (tolerante) em comparação aos demais tratamentos. Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de <i>Comassie</i>	35
Figura 7	Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no tratamento com FeSO_4EDTA da cultivar Epagri 107 (tolerante) em comparação aos demais tratamentos. Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de <i>Comassie</i>	36
Figura 8	Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no controle da cultivar BR-IRGA 410 (sensível) em comparação aos demais tratamentos. Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de <i>Comassie</i>	37

Figura 9 Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no tratamento com FeSO_4EDTA da cultivar BR-IRGA 410 (sensível) em comparação ao demais tratamentos. Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de *Comassie*.....

38

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise de variância para o acúmulo de Ferro na parte aérea e raízes de duas cultivares submetidas ao estresse de 7mM de FeSO ₄ EDTA.....	19
Tabela 2	<i>Spots</i> diferencialmente expressos entre os tratamentos comparados de acordo com p-valores, q-valores e abundância relativa (volume) de cada <i>spot</i>	24
Tabela 3	<i>Spots</i> diferencialmente expressos para as diversas comparações.....	26
Tabela 4	Relação de <i>spots</i> presentes e ausentes, média e desvio padrão para replicatas biológicas presentes em cada tratamento nas diferentes comparações.....	28
Tabela 5	<i>Spots</i> presentes ou ausentes para as diversas comparações.....	33
Tabela 6	Proteínas identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) em raízes de arroz submetidas ao estresse por ferro e sua descrição funcional.....	39

Sumário

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Sumário.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância do arroz.....	1
1.2 Toxidez por ferro em Arroz.....	1
1.2.1 Importância do ferro na planta.....	3
1.2.2 O ferro no solo.....	4
1.2.3 Estratégias de absorção de ferro.....	4
1.2.3.1 O caso do arroz.....	7
1.3 Proteômica.....	8
1.3.1 Proteômica de raiz.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Obtenção de material vegetal e delineamento experimental.....	11
2.2 Extração de proteínas totais de raízes de <i>Oryza sativa</i> L.....	12
2.3 SDS-PAGE.....	12
2.4 Separação das proteínas citosólicas solúveis em géis bidimensionais.....	13
2.5 Visualização das proteínas e análise de imagem após digitalização dos géis bidimensionais.....	13
2.6 Digestão trípica.....	14
2.7 Análise por espectrometria de massa.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.1 Quantificação de Ferro na parte aérea e raízes das plantas submetidas ao estresse por ferro.....	17
3.2 Análise do proteoma diferencial em raízes de <i>Oryza sativa</i> L. sob estresse por ferro (7mM).....	19

3.3 Identificação do proteoma diferencial em raízes da cultivar de arroz Epagri 107 (tolerante) submetidas ao estresse por ferro.....	34
3.3.1 Vias metabólicas envolvidas.....	45
4. CONCLUSÕES.....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do arroz

O arroz é o alimento mais importante em nível mundial e alimenta mais da metade da população mundial. A cultura desempenhou um papel central na nutrição humana e em nível cultural nos últimos dez mil anos. Estima-se que a produção mundial de arroz deve aumentar em 30% nos próximos 20 anos para atender demandas projetadas de crescimento populacional e desenvolvimento econômico (IRGSP, 2005).

O Brasil é o oitavo produtor mundial e o primeiro país fora da Ásia em produção e consumo de arroz e tem no Rio Grande do Sul a base de sustentação da produção nacional (IRGA, 2010; SCIVITTARO et al., 2008). A produção gaúcha, representa cerca de 39% da área cultivada no país e para safra 2009/10 possui uma previsão de 60% da produção nacional de arroz, representando em torno de 2,1 milhões de toneladas, com uma produtividade média de $6,3 \text{ t ha}^{-1}$ (CONAB, 2010).

Diante da importância desta cultura, os centros de pesquisa em programas de melhoramento desenvolvem periodicamente cultivares de arroz visando atender as mais variadas exigências da lavoura para atingir uma maior produtividade.

Em decorrência da previsão de aumento no consumo de arroz e a limitação no progresso de áreas cultivadas com a cultura, torna-se imprescindível o aumento da produtividade para que a demanda futura seja atendida. Assim, o melhoramento genético é fundamental para ganhos genéticos e a biotecnologia entra como uma grande ferramenta nesse processo.

1.2 Toxidez por ferro em arroz

A toxidez por ferro é uma desordem generalizada de nutrientes que afetam o cultivo de arroz em zonas alagadas nas regiões tropicais úmidas da Ásia, África e América do Sul. Grandes áreas alagadas, ideais para a produção de arroz, são pouco exploradas, especialmente na África Ocidental e Central, devido à toxicidade de ferro como uma restrição. A toxidez por ferro em arroz tem sido relatada como

altamente variável, com 12 a 100% de redução no rendimento, dependendo da intensidade do estresse e da tolerância das cultivares de arroz (SAHRAWAT et al., 1996; SAHRAWAT, 2004). A toxidez por ferro em arroz irrigado é associada a uma alta concentração do íon ferroso na solução do solo (PONNAMPERUMA et al., 1955). A toxidez por ferro foi descrita pela primeira vez, há mais de quarenta anos na Ásia e tem sido estudada intensamente em vários países desde essa época. Esta é ocasionada pelo excesso de ferro solúvel na água. No Rio Grande do Sul, até o final da década de setenta, raramente foram observados problemas com toxidez por ferro, quando as cultivares do tipo intermediário e tradicional predominavam na orizicultura do sul do Brasil. Com o advento das cultivares modernas, de porte baixo, com alto potencial produtivo, porém mais suscetíveis ao problema que as anteriores, aumentou a frequência e a intensidade de relatos de ocorrência deste distúrbio nutricional no estado (GOMES et al., 1990; MAGALHÃES JR. et al., 2007). De fato, cultivares altamente produtivas como BR-IRGA 409, BR-IRGA 410 e BRS Pelota, entre outras amplamente difundidas na lavoura orizícola gaúcha, têm mostrado sensibilidade à toxicidade por ferro (MAGALHÃES JR. et al., 2007).

A toxidez por ferro pode ser *direta* ou *indireta*. A toxidez direta está relacionada com a absorção excessiva do elemento pela planta, o que lhe danifica as células (VAHL, 1991). Um sintoma característico aparece inicialmente nas folhas mais jovens, onde o elemento se concentra em pequenas manchas de cor castanha (BIENFAIT, 1985). Em estágios mais avançados de toxidez, ocorrem necrose e morte das folhas. As folhas tornam-se cloróticas porque o ferro é necessário para a síntese de alguns dos complexos clorofila-proteína no cloroplasto. A baixa mobilidade do ferro deve-se, provavelmente, à sua precipitação nas folhas mais velhas na forma de óxidos ou fosfatos insolúveis ou à formação de complexos com a fitoferritina, uma proteína de ligação de ferro encontrada na folha e em outras partes da planta (OH et al., 1996). A toxidez indireta resulta da limitação à absorção pelas plantas de diversos nutrientes, como cálcio, magnésio, potássio, fósforo e do próprio ferro, devido à precipitação do ferro sobre a epiderme das raízes do arroz. A formação de uma camada de óxido férrico bloqueia os sítios de absorção de nutrientes nas raízes, resultando em deficiências nutricionais múltiplas. Os sintomas desse tipo de deficiência consistem em atrofiamento das plantas, redução do afilamento, alaranjamento das folhas e recobrimento das raízes por camadas avermelhadas de óxidos de ferro. Devido à deposição de ferro nas raízes, estas

apresentam elevadíssimos teores do elemento e, aparentemente, os sintomas de toxidez mantêm relação bastante estreita com esses teores (VAHL, 1991; BARBOSA FILHO, 1994; MAGALHÃES JR. et al., 2009). A toxidez indireta é a forma predominante nas condições brasileiras e a mais importante (BACHA, 1991; MAGALHÃES JR. et al., 2009), podendo causar grandes perdas em produtividade.

Uma alternativa eficiente para evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado, cujos solos apresentam histórico de ocorrência do problema é a utilização de cultivares tolerantes (MAGALHÃES JR. et al., 2005).

1.2.1 Importância do ferro na planta

Em plantas, a nutrição mineral é um dos fatores envolvidos no crescimento e desenvolvimento e, portanto, na produtividade da cultura (BRIAT et al., 1995). Porém, em nível molecular, a informação relativa à aquisição, assimilação e armazenamento da maioria dos metais essenciais é limitada. Entre esses elementos, o ferro é importante devido suas propriedades físico-químicas (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997) e desempenha um papel importante devido à sua implicação nos processos fundamentais, tais como a fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA (BRIAT et al., 1995).

O funcionamento celular é dependente de ferro (Fe) para a sua propriedade única de ser capaz de catalisar a oxidação/redução. O Fe funciona como um grupo prostético em proteínas no qual está associado diretamente, ou através de um grupo heme, ou de um centro ferro-enxofre (Fe-S). Uma vez que na solução o Ferro existe em dois estados redox (ferroso- Fe^{2+} ou férrico- Fe^{3+}), ele pode perder ou ganhar elétrons através de metaloproteínas (BRIAT et al., 1995; BRIAT e LOBRÉAUX, 1997). Uma grande variedade de vias metabólicas dependem de enzimas Fe-redox, incluindo a cadeia transportadora de elétrons da respiração e da fotossíntese (citocromos), a biossíntese de DNA (ribonucleotídeo redutase), lipídios (lipoxigenase) e hormônios, a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (peroxidase, catalase) e de assimilação de nitrogênio (nitrito e nitrato redutase). Estes processos celulares ocorrem em diferentes compartimentos intracelulares que, portanto, devem ser providos de uma quantidade adequada de Fe (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997).

1.2.2 O ferro no solo

Apesar de abundante na crosta terrestre, o ferro está presente no solo, quase exclusivamente, na sua forma oxidada (Fe^{3+}), que possui baixa solubilidade em água, sendo afetado pelo pH e oxigênio (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997).

Em solos inundados, a provável presença de óxidos de ferro amorfos e o baixo potencial redox do meio promovem um aumento nas quantidades de ferro em solução disponível para as plantas. Nestas condições, as pequenas quantidades de Fe^{3+} presentes na solução do solo são reduzidas a Fe^{2+} . Os compostos de ferro ferroso são muito mais solúveis que os compostos férricos. À medida que o potencial redox diminui, a solubilidade do ferro tende a aumentar exponencialmente de modo que praticamente todo o ferro detectável na solução do solo encontra-se na forma reduzida (Fe^{2+}) (LINDSAY, 1979; BECANA et al., 1998). Dessa forma ele é prontamente disponível para a planta, tornando-se facilmente tóxico pelo excesso de ferro absorvido (MAGALHÃES JR. et al., 2009).

Durante o alagamento do solo, a água também funciona como uma barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. Além disso, o oxigênio molecular dissolvido na água é consumido pelos microorganismos aeróbicos, que com o tempo são substituídos pelos anaeróbicos, resultando num ambiente de redução e acúmulo de CO_2 . Este acúmulo de CO_2 diminui o pH favorecendo redução de compostos oxidados (PONNAMPERUMA, 1972). O ferro, ao reagir com formas reduzidas de oxigênio, catalisa a produção de espécies de radicais livres. Estas moléculas altamente reativas podem danificar os componentes celulares, levando a uma perda da integridade celular e possível morte (GUERINOT e YI, 1994). Como consequência destas propriedades de solubilidade e toxicidade, as plantas desenvolveram mecanismos de controle no fluxo de ferro (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997).

1.2.3 Estratégias de absorção de ferro

As plantas desenvolveram duas estratégias para assegurar a absorção do ferro pelas raízes em diferentes condições de solo. A estratégia I inclui todas as dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas. Plantas modelo para a investigação dessa estratégia incluem as dicotiledôneas *Arabidopsis thaliana*,

Lycopersicon esculentum (tomate) e *Pisum sativum* (ervilha). Elas absorvem ferro a partir de três reações: (i) a excreção de prótons por meio de uma ATPase tipo-P do plasmalema para acidificar a solução ao redor e, portanto, aumentar a solubilidade do Fe^{3+} ; (ii) a redução do Fe^{3+} intermediada pela enzima Fe^{3+} -quelato redutase à Fe^{2+} , que é a forma mais solúvel; (iii) e transporte via plasmalema do Fe^{2+} por transportadores de ferro. Todos os três componentes dessa estratégia aumentaram sua atividade em deficiência de ferro. Medidas adicionais de adaptação incluem alterações na morfologia da raiz, pêlos radiculares e no desenvolvimento de células de transferência e o aumento na concentração de citrato no floema. (SCHMIDT, 1999; HELL e STEPHAN, 2003). A redução inicial do Fe^{3+} é realizada pela Fe^{3+} -quelato redutase, codificada pelo gene *FRO2* (*Ferric Reductase Oxidase*). O gene *FRO2* de *Arabidopsis thaliana*, foi clonado com base na seqüência de genes *FRE1* e *FRE2*, seu homólogo de levedura (ROBINSON et al., 1999). O Fe^{2+} resultante é então transportado através da membrana celular da epiderme da raiz por um transportador de Fe^{2+} específico (EIDE et al., 1996). O *IRT1* (*Iron Transport Regulated*), o primeiro membro da família Zip a ser identificado, é um transportador de Fe^{2+} que absorve ferro do solo. O *IRT1* clonado a partir de *Arabidopsis* mostrou ser expresso em resposta a deficiência de ferro nas raízes (EIDE et al., 1996). A proteína IRT1 transportadora de ferro é a principal responsável pela absorção de ferro a partir do solo (VERT et al., 2002).

Outra família gênica relacionada com o transporte de ferro é composta por genes que codificam para as proteínas NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) envolvidas nos mais variados processos. Algumas das proteínas NRAMP em mamíferos e leveduras, são capazes de transportar íons metálicos, incluindo ferro. Nas plantas, o transporte de ferro demonstrou a necessidade de um sistema de transporte de Fe^{2+} . Em *Arabidopsis thaliana* este processo envolve os genes *IRT1* e *FRO2*. Em arroz três genes *Nramp* expressos em diferentes órgãos da planta foram identificados (BELOUCHI et al., 1997). Transcritos de *AtNramp1*, acumulam em resposta a deficiência de ferro nas raízes, mas não em folhas. Finalmente, a superexpressão de *AtNramp1* em plantas de *A. thaliana* transgênicas leva a um aumento na resistência das plantas a concentração de ferro tóxicos, mostrando que o gene *AtNramp1* participa no controle da homeostase de ferro em plantas (CURIE et al., 2000). Essas proteínas estão presentes na membrana do vacúolo e dessa forma devem atuar no transporte de ferro na planta.

A estratégia II de absorção de ferro em plantas compreende as gramíneas, onde encontram-se culturas de importância econômica como o trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*). Suas raízes liberam fitosideróforos (PSs) que quelam Fe^{3+} na rizosfera (HELL e STEPHAN, 2003). Devido à sua alta afinidade por Fe, o PS eficientemente solubiliza Fe^{3+} inorgânico por quelação, produzindo complexos PS- Fe^{3+} que são levados por um transportador específico no plasmalema radicular. Esta estratégia de quelação é mais eficiente que a estratégia de redução usada por outras plantas e assim permite as gramíneas sobreviverem a condições mais drásticas de deficiência de ferro. A produção do PS é aumentada em resposta à deficiência de ferro e a tolerância à deficiência está correlacionada com a quantidade e o tipo de PS secretado. O PS é composto por uma família de ácidos mugineicos (MAs), incluindo ácido mugineico (MA), 2'-ácido desoximugineico (DMA), ácido 3-epiidroximugineico (epi-HMA), e 3-epihidroxí 2' ácido-desoximugineico (epi-HDMA), onde cada espécie gramínea secreta o seu próprio conjunto específico de MA. A via de biossíntese do PS tem sido amplamente estudada e já foi quase completamente decifrada em cevada (MORI, 1999; NEGISHI et al., 2002). As enzimas envolvidas nessa rota demonstram atividade intensificada em condições de deficiência de ferro. O passo inicial na produção dos MAs é a condensação de três moléculas de S-adenosilmetionina (SAM) para produzir uma molécula de nicotianamina (NA). Apesar da NA ser produzida em monocotiledôneas e dicotiledôneas, as etapas subsequentes de síntese de MAs são específicos para gramíneas. A enzima crítica na via específica das gramíneas é o nicotianamina aminotransferase (NAAT), que catalisa a transferência de um resíduo de aminoácidos para a NA, resultando na produção de 2'-ácido desoximugineico (DMA), o precursor de todos outros MAs.

O arroz (*Oryza sativa* L.) e milho (*Zea mays* L.) secretam DMA, assim, as outras espécies, incluindo cevada (*Hordeum vulgare* L.) e centeio (*Secale cereale* L.), adicionam DMA hidroxilado para outros MAs (INOUE et al., 2008).

A família de transportadores YSL (*Yellow Stripe Like*) representa um bom candidato para o transporte de quelados de NA-metal através das membranas de células vegetais. Embora não existam provas concretas, evidências experimentais apontam para um papel das proteínas YSL no transporte de longa distância e intracelular de metais, especialmente Fe, complexado com a NA (CURIE et al., 2009). Várias famílias transportadoras translocam metais no citoplasma, através de

absorção na membrana plasmática ou remobilização de uma organela intracelular. Acredita-se que as proteínas da família YSL mediam a absorção de metais que são complexados com PSs derivados de plantas ou NA (CURIE et al., 2006; COLANGELO e GUERINOT, 2006).

Uma vez dentro das células vegetais, metais em excesso e não utilizados pelo metabolismo, precisam ser armazenados para evitar a sua toxicidade. Isto é conseguido por várias proteínas específicas e peptídeos e por diversas pequenas moléculas orgânicas (BRIAT e LEBRUN, 1999). Todos os ferritinas têm a propriedade de interagir facilmente com íons Fe^{2+} em solução sob condições aeróbicas e para induzir a oxidação do ferro e agregação dentro da cavidade. Essencialmente, a reação com o ferro inicia com a ligação de Fe^{2+} para um sítio específico localizado dentro da subunidade helicoidal, chamado centro ferroxidase. O ferro interage com o oxigênio é oxidado a Fe^{3+} e depois migra para a cavidade onde se agrega para formar o núcleo de ferro (AROSIO e LEVI, 2002). Dois genes de ferritina, *OsFer1* e *OsFer2*, mostraram-se altamente expressos em folhas, porém o mesmo não ocorreu nas raízes (STEIN et al., 2009).

1.2.3.1 O caso do arroz

Até pouco tempo, acreditava-se que as gramíneas utilizavam somente íon férrico disponível na rizosfera através da liberação de fitosideróforos (ROËMHELD e MARSCHNER, 1986).

Porém, Bughio et al. (2002), induziram a expressão do gene *OsIRT1* em raízes e folhas de arroz, sendo o primeiro membro da família de transporte de metais ZIP a ser isolado em gramíneas. Os transcritos de *IRT1* são predominantemente expressos em raízes e são induzidos sob deficiência de ferro, indicando o envolvimento direto do gene na absorção de ferro do solo (BUGHIO et al., 2002), ou seja, um sistema de captação de Fe^{2+} adicional a estratégia II (ISHIMARU, 2006). O arroz é cultivado em condições submersas em que a forma dominante de ferro do solo é de íon ferroso (YOSHIDA, 1981). Portanto, parece razoável que o arroz possa ter um sistema de captação para Fe^{2+} , bem como Fe^{3+} em suas raízes. O arroz também transporta o oxigênio dos brotos para as raízes e secreta oxigênio das raízes para oxidar a rizosfera. Assim, as plantas de arroz

podem induzir um ou outro desses sistemas de transporte de ferro pela detecção da concentração de íon ferroso ou o potencial redox em torno de sua rizosfera.

1.3 Proteômica

O dogma central da biologia é o DNA que codifica RNA, que é traduzido para proteínas. O desenvolvimento de tecnologias de biologia molecular é paralelo a esse dogma central. Embora a bioquímica do DNA, RNA e proteínas tenha sido um ativo campo de estudo por várias décadas, só nos últimos 10-15 anos que novas tecnologias têm permitido maiores estudos de DNA, RNA e proteínas em uma escala que é comparável com o tamanho do genoma, transcriptoma e proteoma humano, respectivamente (TRAUM e SCHACHTER, 2005).

A análise transcriptômica fornece uma grande quantidade de informações, mas saber quais e quando determinados genes são transcritos, não é suficiente para entender toda a extensão das alterações metabólicas devido a modificações pós-transcricionais e pós-traducionais (FUKUDA et al., 2007). De fato, Anderson e Seihamer (1997) relataram que o fator de correlação entre o número de proteínas transcritas e traduzidas é abaixo de 0,5. Segundo Fukuda et al. (2007), somente alguns artigos têm abordado a expressão de proteínas da raiz como um todo (KONISHI et al., 2005; KOLLER et al., 2002; ZHONG et al., 1997).

A identificação sistemática das proteínas contidas em uma amostra complexa e a determinação da abundância relativa de cada proteína (proteína de perfil quantitativo), se duas ou mais amostras estão sendo comparadas, são os objetivos centrais da proteômica (SMOLKA et al., 2002). O estudo proteômico visa à estrutura, função e controle dos sistemas e processos biológicos, isso inclui a sequência (identidade), abundância, atividade e estrutura das proteínas expressas em uma célula, bem como as modificações, interações e translocações que cada proteína pode realizar. Não existe atualmente um único experimento ou plataforma que permita a análise de todas essas propriedades de um proteoma em larga escala. Portanto, tecnologias e plataformas foram desenvolvidas especificamente para o estudo de um subconjunto dessas propriedades (SMOLKA et al., 2002).

A combinação de técnicas como eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa se tornam poderosas ferramentas que permitem separar misturas complexas de proteínas e, posteriormente, analisar e identificar proteínas

que apresentem respostas diferentes diante de condições ambientais distintas, como por exemplo, estresse abiótico, provocado pelo excesso de ferro no solo.

1.3.1 Proteômica de raiz

O proteoma de uma espécie vegetal muda em resposta a estímulos diferentes. Dentro de cada espécie, é possível estudar o proteoma dos diferentes órgãos separadamente frente a condições ambientais distintas. Isso permite comparar proteomas e identificar funções de proteínas devido às diferentes condições fisiológicas provocadas por fatores ambientais.

As raízes são altamente sensíveis e os primeiros órgãos em plantas a exibirem defesas celulares para vários estresses bióticos ou abióticos. Proteínas de raiz têm mostrado rápidas respostas em comparação a proteínas de folhas e caules. Recentemente, um grande trabalho proteômico foi realizado em diferentes tecidos de arroz para investigar os padrões do proteoma durante a fase de crescimento, onde 36% das proteínas foram identificadas como únicas em tecidos de raiz e apenas 2% das proteínas da raiz foram comuns a proteínas do caule (NOZU et al., 2006), mostrando a complexidade do proteoma de raízes. A identificação de novos genes, que determinam os seus padrões de expressão em resposta ao estresse e compreender as suas funções na adaptação ao estresse, servirão de base para a engenharia como estratégias eficazes para melhorar a tolerância a estresses (CUSHMAN e BOHNERT, 2000). Assim, a análise proteômica tem sido amplamente utilizada para investigar o padrão de expressão de proteínas para os mais diversos estresses abióticos (LEE et al., 2009).

Em arroz, existem vários estudos proteômicos relacionados a estresses abióticos (SALEKDEH, et al., 2002; YAN et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2007; ZANG e KOMATSU et al., 2007) porém estudos proteômicos para toxidez por ferro, em raiz, não foram constatados na literatura. Estudos relacionados à deficiência de ferro em raízes, foram constatados em tomate (LI et al., 2008), beterraba-açucareira (ZAHARIEVA et al., 2003) e cevada (SUSUKI et al., 1998). Identificar proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro em raízes de arroz é fundamental para que mecanismos de absorção, transporte, bem como respostas fisiológicas frente ao estresse sejam compreendidas.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar e identificar proteínas com expressão diferencial em raízes de duas cultivares de arroz quando submetidas ao estresse por ferro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi realizado no laboratório e casa de vegetação pertencentes à Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, nos meses de julho e agosto de 2009. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições. As análises posteriores foram realizadas nos meses de setembro de 2009 e janeiro de 2010.

Duas cultivares de arroz irrigado, BR-IRGA 410 e Epagri 107, foram utilizadas nesse estudo por estarem previamente caracterizadas como sensível e tolerante a toxidez por ferro, respectivamente (EMBRAPA, 2010).

Inicialmente, as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10 % durante 10 minutos e lavadas com água destilada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em papel germitex embebido em água desionizada e mantidas em câmara de germinação (BOD), a 27°C, com fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 100%. Após 14 dias foram transferidas para casa de vegetação sob sistema hidropônico não aerado com solução de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1938) 1× força iônica, pH 4,0, ajustado a cada 2 dias. Após 45 dias de crescimento o tratamento com FeSO_4EDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + EDTA) foi aplicado na concentração de 7mM e o pH ajustado diariamente. Após 7 dias sob tratamento foram coletadas amostras de raízes para posterior análise proteômica e conservadas a -80°C.

O conteúdo de ferro foi determinado pelo Laboratório de Análise de Solo de Viçosa Ltda. (Viçosa, MG), utilizando a matéria seca de 2 plantas, separando-se raiz e folha, de cada repetição. No caso das raízes, para evitar a superestimação no conteúdo de ferro, devido à possível formação de placas de ferro nas raízes, foi realizado tratamento com ditionito–citrato–bicarbonato (DCB), segundo Liu et al. (2008). O sistema radicular das plântulas de arroz foi inicialmente incubado por 70 min a 25°C em 80 ml 0,03 mol L⁻¹ de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,125 mol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), com a adição de 1,6 g de ditionito de

sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Posteriormente, as raízes foram lavadas três vezes com água deionizada e secas em estufa a 75°C, por 72 horas. A análise do conteúdo de ferro na parte aérea e raízes foi realizada para evidenciar a absorção de ferro provocada pelo tratamento e sua possível translocação para a parte aérea.

2.2 Extração de proteínas totais de raízes de *Oryza sativa* L.

Para extração das proteínas de raízes de arroz foi utilizado o protocolo de extração descrito por Shen (2002), com modificações (MESQUITA et al., 2009). Raízes de arroz foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) foi ressuspenso e solubilizado por 2 h a 4°C em 10 mL de tampão de extração (Tris HCl, pH 7,5, 40mM; sacarose 250mM; EDTA 10mM; TritonX100 1%; DTT 1mM; PMSF 1mM; 2-mercaptoetanol 2%). Após centrifugação a 6000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado uma vez com 5 mL de tampão de extração e o sobrenadante coletado juntamente com o primeiro. Em seguida as proteínas foram precipitadas adicionando ao sobrenadante 15 mL de TCA 10% em acetona gelada, onde permaneceram *overnight* (12h) a -20 °C para que ocorresse a precipitação das proteínas. Após, foi centrifugado a 6000 g por 15 min, o precipitado lavado (3-4 vezes) com acetona gelada até a clarificação do precipitado e o excesso de acetona foi removido através de lavagem com etanol 80%. O precipitado final foi então seco, dissolvido em tampão de amostra (300-500 µL) para gel bidimensional (7M uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 2% tampão-IPG (Amersham Biosciences), 80mM DTT) e sonificado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas a -20°C até posterior análise.

2.3 SDS-PAGE

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

2.4 Separação das proteínas citosólicas solúveis em géis bidimensionais

No gel bidimensional, a primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF) foi realizada em gradientes de anfólitos de 24cm e pH 3-10 (*Amersham Biosciences*) onde as mesmas foram reidratadas de 14-20 h em 450µl de tampão de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0.002%, tampão IPG 2%, DTT 0.2%) contendo 1mg de proteína das amostras. A IEF foi realizada em um sistema *IPGphor* (*Amersham Biosciences*) a 20°C: 0.5 kVh a 500 V, 0.8 kVh a 1000 V, 16.5 kVh a 10000 V e 27,2 kVh a 10000 V. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas por 15 min, através de duas lavagens, ambas contendo 5 mL de solução de equilíbrio (uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, Tris-HCl 50mM, pH 8.8), sendo que a primeira lavagem conteve 1% de DTT e a segunda lavagem 2,5% de iodoacetamida. A separação da segunda dimensão foi realizada no aparelho *PROTEAN DaltSIX* com espaçadores de 1,0mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram 45min a 20mA/gel e 5h a 40mA/gel. Para os experimentos de 2D/SDS-PAGE foram utilizadas quatro replicatas biológicas para confirmar a reprodutibilidade e permitir a análise estatística das diferenças nas análises densitométricas das imagens.

2.5 Visualização das proteínas e análise de imagem após digitalização dos géis bidimensionais

Os géis foram corados pela técnica de *Coomassie* coloidal. Primeiramente, os géis foram fixados em solução contendo ácido acético 10% e etanol 40% (*overnight*). Em seguida foram lavados com água ultra pura (*MilliQ*) por 30 segundos, para remoção da solução de fixação, sendo então, corados pela adição de azul de *Coomassie* G-250 coloidal a 0,02% por 72 h e mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um scanner *ImageScanner II* (*Amersham Biosciences*) e calibradas com o programa *Labscan* (*Amersham Biosciences*). As análises das imagens digitalizadas de cada gel foram realizadas no programa *ImageMaster 2D platinum* (*Amersham Biosciences*). As massas moleculares das proteínas foram determinadas utilizando padrões de massa molecular (*Amersham Biosciences*) presentes em cada gel. As

diferenças de abundância relativa (volume) entre manchas (usualmente conhecidas pelo termo em inglês, *spot*) equivalentes dos dois grupos experimentais foram avaliadas quanto à significância estatística (diferença de abundância relativa igual ou maior que 1,5x).

A intensidade média de cada *spot*, obtida a partir das 4 replicatas (foram 3 em um dos grupos) de cada grupo experimental, foi submetida à comparação dois a dois entre cada um dos 4 grupos, através de testes t, com p-valores empíricos obtidos a partir de testes de permutação. Os valores obtidos foram então, utilizados para calcular o q-valor, uma abordagem derivada do *False Discovery Rate* (FDR) (STOREY e TIBSHIRANI, 2003), que indica a porcentagem de erros dentro dos *spots* considerados como diferentes pelo teste estatístico. Foram consideradas significativas as diferenças do valor p menores que 0,01 e que apresentavam um q valor de até 0,1151579. Todos os cálculos foram realizados utilizando o ambiente R para Windows, versão 2.6.0 (R Development Core Team).

Para aqueles *spots* onde todos os valores das replicatas de um grupo foram igual a zero, não foi utilizado esse método, pois não havia variância. Assim, foi realizada uma separação, entre os *spots* diferencialmente expressos que possuíram diferença de abundância relativa entre os tratamentos e que foram submetidos à análise estatística, daqueles *spots* que mostraram presença em um tratamento e ausência no outro, dentro de uma comparação.

Esses *spots* presentes/ausentes, não possuem análise estatística e utilizou-se o critério de considerar o *spot* “presente”, quando presente em pelo menos 3 replicatas de um total de 4. Somente serão considerados “ausentes”, quando ausentes nas 4 repetições. Desses, foi obtida média e desvio padrão de cada *spot* para as respectivas replicatas biológicas.

2.6 Digestão trípica

Os *spots* excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,2 mL e digeridos com tripsina. A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (2006), onde os pedaços de géis excisados foram descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, foi deixado *overnight* sob agitação constante e depois se realizou a terceira lavagem. A solução foi removida e

o gel foi desidratado com 200 μL de acetonitrila (100%), depois esta foi removida e os géis secos a vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μL de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente, foram alquilados com 100 μL de iodoacetamida 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10min e desidratados com 200 μL de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μL de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μL de acetonitrila 100%. Após remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos a vácuo por 15 minutos. Foram adicionados 15 μL de uma solução de tripsina 25 ng μL^{-1} por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma solução de 50 μL de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, *overnight* a 37 °C. As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão trípica foram purificadas e desalinizadas utilizando ponteiras de 0,6 μL ZipTip® com resina C₁₈ (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, as ponteiras ZipTip® C₁₈ foram ativadas com uma solução de acetonitrila 100% , usando o volume máximo de 10 μL da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de ativação, as ponteiras foram equilibradas com solução de ácido trifluoacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Após a etapa de equilíbrio, as ponteiras foram carregadas com amostra, aspirando pelo menos 10 vezes a amostra na resina. Após o carregamento, as ponteiras foram lavadas com solução de ácido trifluoroacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 1,5 μL de uma solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1% os peptídeos foram eluidos aspirando e dispensando a amostra 10 vezes dentro do mesmo microtubo.

2.7 Análise por espectrometria de massa

As amostras foram aplicadas na proporção 1:1(1 μL :1 μL) de amostra e matrix (ácido α -ciano-4-hidrocínâmico) em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 800–3500 Da no instrumento MALDI-TOF-TOF (BRUKER) no modo MS, com intervalo de confiança monoisotópica de 0,2 Da/0,6 Da. Os peptídeos foram identificados usando o algoritmo de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Os espectros MS gerados foram

confrontados contra o banco de dados NCBI-Nr (*National Center for Biotechnology Information- Non redundant*) contidos no programa Mascot 4[®], sendo que peptídeos com espectros com *ion score* menor que 40 foram considerados com identificação não validada ou abaixo do nível de confiabilidade. Após identificadas as proteínas referentes aos espectros obtidos, os números de acessos do banco de dados do NCBI foram blastados contra o banco de dados de proteínas atualizado do RAP-DB (*The Rice Annotation Project*), para uma maior confiabilidade através da confirmação das sequências identificadas.

Todo o processo referente a esse estudo proteômico foi realizado nos laboratórios pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, com exceção da digitalização e análise das imagens, que foram realizadas no Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. As demais análises com ferramentas da bioinformática foram realizadas nas dependências do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação de ferro na parte aérea e raízes das plantas submetidas ao estresse por ferro

A análise proteômica foi realizada após quantificação de ferro nas plantas que foram submetidas ao estresse por ferro e seus respectivos tratamentos, para confirmar a absorção e translocação do ferro na planta.

As Fig. 1 e 2, apresentam os valores de ferro acumulado na parte aérea e raiz das plantas de arroz em mg Kg^{-1} (ppm). Os dados apresentados confirmam que houve acúmulo de ferro em relação ao controle, pelo aumento no nível de ferro das amostras das cultivares, possibilitando a continuidade da análise proteômica. A cultivar tolerante Epagri 107, apresentou um acúmulo de $1225,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ de ferro na parte aérea e $473,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ nas raízes quando submetidas ao tratamento com FeSO_4EDTA . Já a cultivar sensível BR-IRGA 410, apresentou um acúmulo de 1102 mg Kg^{-1} de ferro na parte aérea e $1799,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ nas raízes quando submetidas ao tratamento com FeSO_4EDTA .

A tab. 1, mostra a análise de variância para a quantificação de ferro em raízes e parte aérea das duas cultivares de arroz submetidas ao tratamento com FeSO_4EDTA . Houve um acúmulo de ferro significativo para parte aérea das duas cultivares, porém para raiz, o acúmulo foi significativo somente para cultivar sensível BR-IRGA 410. Esses resultados indicam que as cultivares translocam o ferro em excesso para parte aérea e que a cultivar Epagri 107, pode possuir algum mecanismo que evita o acúmulo de ferro nas raízes, o qual pode estar relacionado aos mecanismos responsáveis pela maior tolerância da cultivar ao estresse por ferro.

O coeficiente de variação (CV) revelou valores de reduzida à intermediária magnitude, variando de 21,93% a 46,56%, o que sugere a necessidade de maior controle das técnicas experimentais.

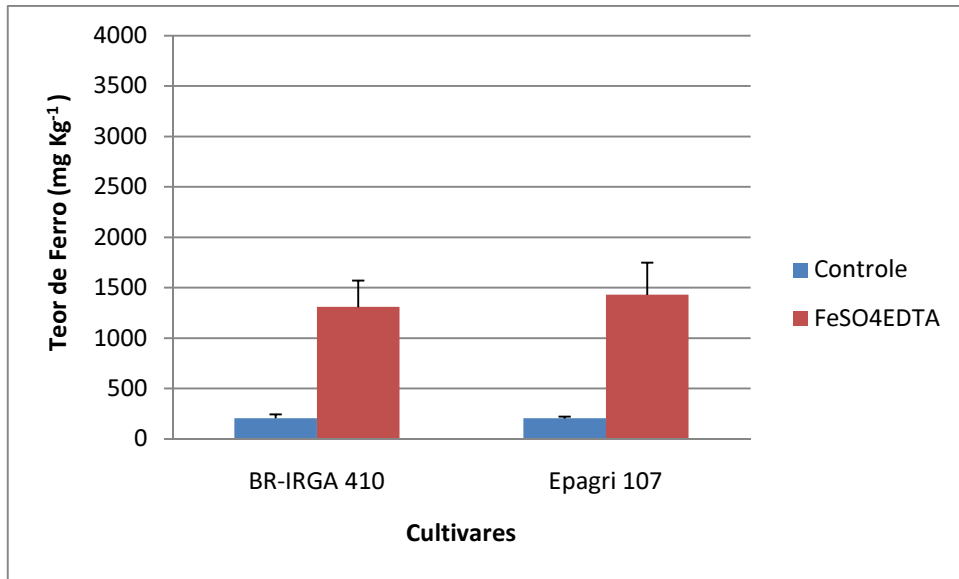


Figura 1 - Média da quantidade de ferro, em mg Kg⁻¹ (ppm) presente na parte aérea das cultivares Epagri 107 e BR-IRGA 410 submetidas ao tratamento com 7 mM de FeSO₄EDTA.

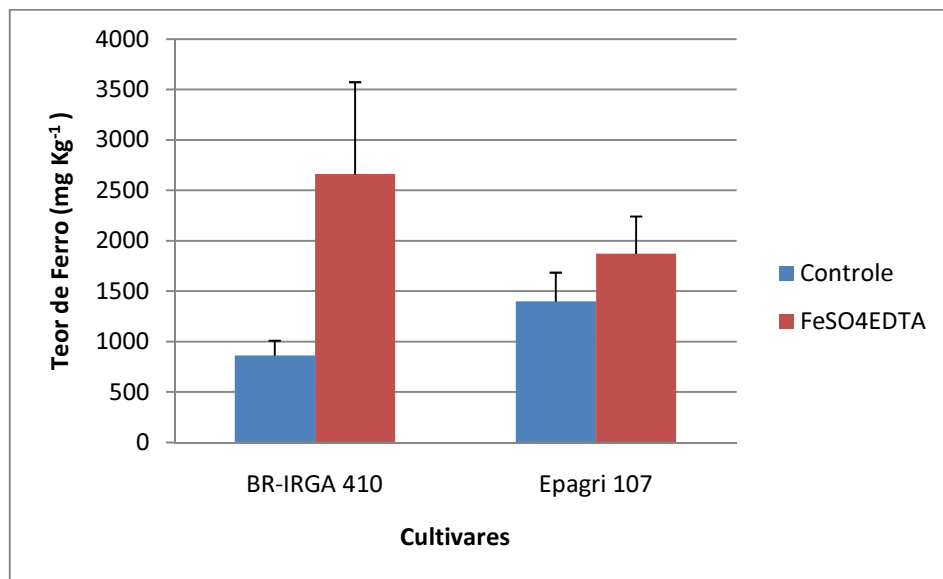


Figura 2 - Média da quantidade de ferro, em mg Kg⁻¹ (ppm) presente em raízes das cultivares Epagri 107 e BR-IRGA 410 submetidas ao tratamento com 7 mM de FeSO₄EDTA.

Tabela 1 - Análise de variância para o acúmulo de ferro na parte aérea e raízes de duas cultivares submetidas ao estresse de 7mM de FeSO₄EDTA.

Cultivares	QM	CV(%)	Média Geral	Erro
Parte Aérea				
BR-IRGA 410	2428808,00*	27,95	757,25	224061
Epagri 107	3002475,12*	32,89	816,62	360737,52
Raiz				
BR-IRGA 410	6478200,12*	46,56	1760,87	3361221,72
Epagri 107	448879,12 ^{ns}	21,93	1634,37	642648,72

* Significativo a 5 % de probabilidade; ns = Não significativo; QM = Quadrado Médio; CV = Coeficiente de variação em percentagem.

3.2 Análise do proteoma diferencial em raízes de *Oryza sativa* L. tratadas com ferro

As análises de proteoma foram realizadas em raízes de duas cultivares de arroz, sendo uma tolerante (EPAGRI 107) e outra sensível à toxidez por ferro (BR-IRGA 410).

Os resultados apresentados anteriormente em relação à efetividade dos tratamentos aplicados possibilitaram a análise proteômica.

Na Fig. 3, são apresentadas as imagens dos géis de referência, para cada tratamento aplicado, sendo que cada *spot* corresponde a uma proteína.

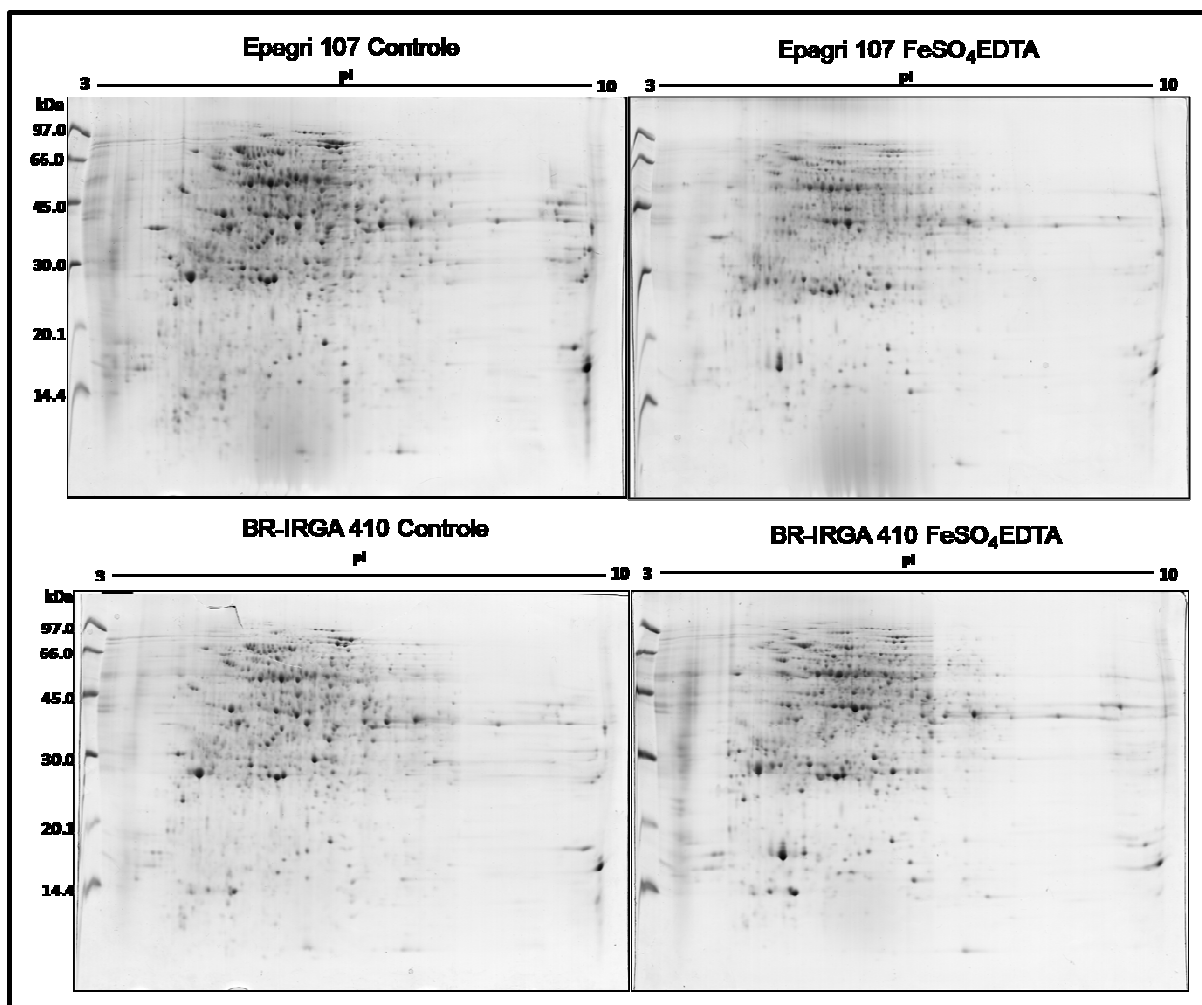


Figura 3 - Imagens digitalizadas dos quatro géis bidimensionais de referência, para cada cultivar e seus respectivos tratamentos (Controle e tratamento com FeSO_4EDTA).

As imagens dos géis bidimensionais foram analisadas por meio do programa *Image Master 2D Platinum*, que possibilitou a análise diferencial dos proteomas das raízes das duas cultivares de arroz submetidas ao estresse por ferro. As análises foram realizadas comparando os géis dois a dois, os quais mostraram reprodutibilidade dos resultados, havendo semelhança entre géis analisados, através da correspondência de *spots*. Na Fig. 4, o gráfico mostra a correspondência de *spots* entre géis de proteínas de raízes, para cada cultivar, para plantas submetidas ao estresse por ferro (FeSO_4EDTA) e plantas controle. Na cultivar BR-IRGA 410 (sensível) foram detectados 188 *spots* que apresentaram correspondência entre planta tratada e planta controle.

Já para a cultivar Epagri 107 (tolerante), um total de 123 *spots* apresentaram correspondência. Para gráficos do tipo *scatter plot*, as diferenças de porcentagem em

volume (abundância relativa) entre géis de amostras obtidas de plantas tratadas (FeSO_4EDTA) e controle significam maiores efeitos quando apresentarem valores de correlação mais distantes de 1 unidade. Já para a comparação entre géis de repetições dentro de um mesmo tratamento e cultivar, valores de correlação mais próximos de 1 unidade significam maiores efeitos. Na Fig. 5, foram comparados géis de duas repetições referentes a cultivar Epagri 107 controle, onde 239 *spots* apresentaram correspondência.

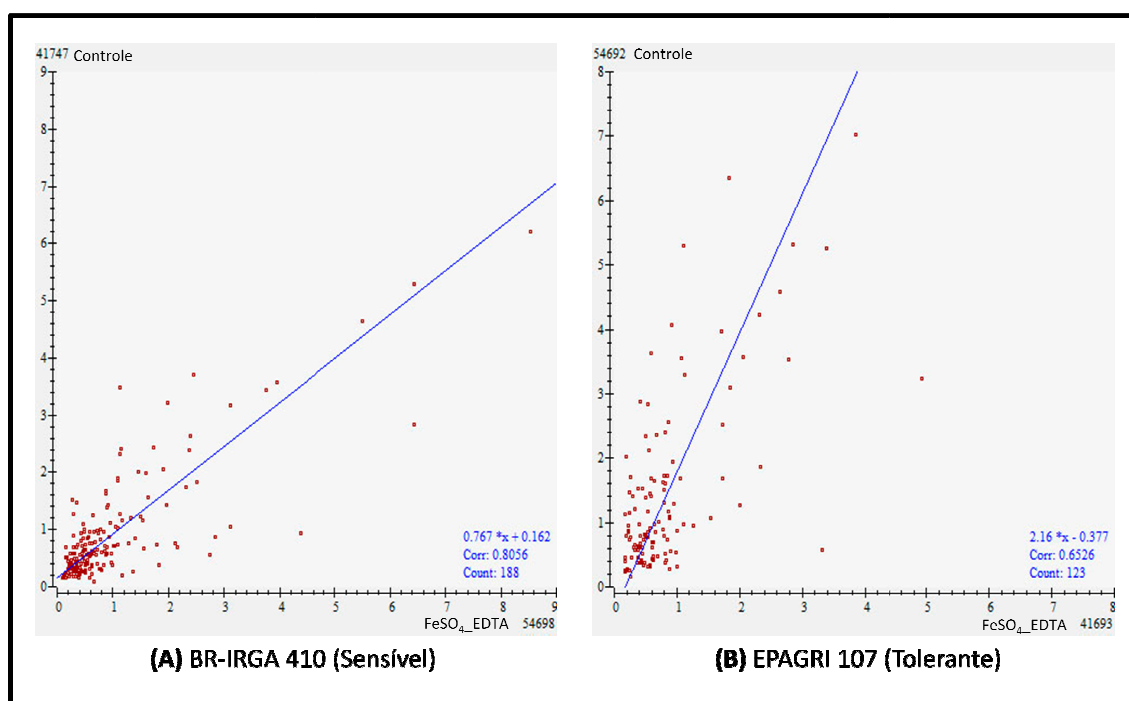


Figura 4 - Correlação entre géis de proteínas de raízes de arroz submetidas ao estresse por ferro e controle, dentro de cada cultivar. (A) Cultivar sensível (BR-IRGA 410), correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais tratados com FeSO_4EDTA e controle (não tratado). (B) Cultivar tolerante (Epagri 107) correlação entre a porcentagem em volume de géis bidimensionais tratados com FeSO_4EDTA e controle (não tratado). Análise foi realizada no *software Image Master 2D Platinum*. Legenda: *Count* refere-se ao número de *spots* onde existe correspondência. *Corr* refere-se à correlação entre porcentagem em volume para um mesmo spot em géis de tratamentos diferentes. O gráfico do tipo *Scatter Plot* é caracterizado por uma equação da reta linear $y=ax+b$, onde valores de “a” próximos de 1 e valores de “b” próximos a zero mostram menores diferenças entre géis controles e tratados. Maiores efeitos de tratamento (diferenças de porcentagem em volume entre géis controles e tratados) denotam valores de correlação (*Corr*) mais distantes de uma unidade. Cada ponto no gráfico significa um *spot* onde foi encontrada correspondência entre gel controle e gel tratado. Cultivar BR-IRGA 410 (sensível) apresenta 188 *spots* correspondentes e a cultivar Epagri 107 (tolerante) apresenta 123 *spots* correspondentes.

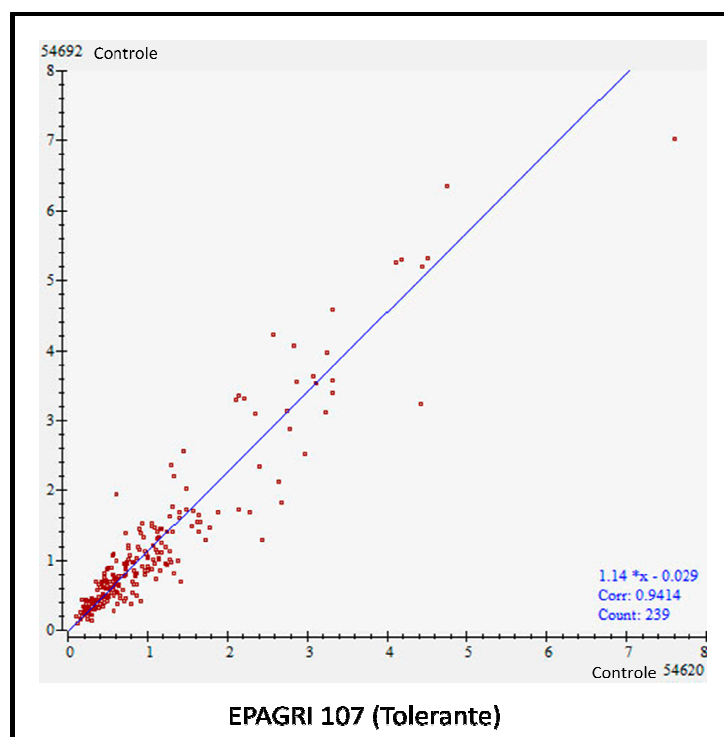


Figura 5 - Correlação entre géis de replicatas biológicas de proteínas de raízes do controle da cultivar Epagri 107 (tolerante). Análise foi realizada no *software Image Master 2D Platinum*. Legenda: *Count* refere-se ao número de *spots* onde existe correspondência. *Corr* refere-se à correlação entre porcentagem em volume para um mesmo *spot* em géis de replicatas biológicas diferentes. O gráfico do tipo *Scatter Plot* é caracterizado por uma equação da reta linear $y=ax+b$, onde valores de “a” próximos de 1 e valores de “b” próximos a zero mostram menores diferenças entre géis das replicatas. Valores de correlação (*Corr*) mais próximos de uma unidade denotam menores diferenças de porcentagem em volume entre as replicatas biológicas dos géis. Cada ponto no gráfico significa um *spot* onde foi encontrada correspondência entre os géis de duas replicatas. A cultivar Epagri 107 (tolerante) apresenta 239 *spots* correspondentes.

A correlação entre os géis das amostras, entre plantas tratadas e controle, para as cultivares BR-IRGA 410 e Epagri 107, foi de 0,8056 e 0,6526, respectivamente. Através dos valores de correlação apresentados é possível afirmar que existe diferença na abundância relativa de proteínas de raízes de plantas sob estresse por ferro e plantas não estressadas. Ainda, as diferenças de abundância relativa apresentadas entre plantas tratadas e controle é maior para a cultivar tolerante Epagri 107, em relação a cultivar sensível BR-IRGA 410, mostrando maior diferença de expressão das proteínas entre tratamentos. Na Fig. 5, onde foram comparadas os géis das replicatas biológicas do controle da cultivar Epagri 107, a correlação foi de 0,9414, como esperado, já que se tratam de replicatas biológicas e a correlação deve ser alta, pois não devem ocorrer diferenças que comprometam a confiabilidade dos resultados.

Para os *spots* onde se verificou correspondência em todos os géis, foi realizada a análise de expressão diferencial através da diferença entre a abundância relativa de cada *spot* sob condições de tratamento sob estresse por ferro e controle dentro de cada cultivar e entre tratamentos das duas cultivares. A abundância relativa de cada *spot* dentro de um mesmo tratamento foi determinada através da média da abundância relativa de quatro replicatas biológicas (com exceção do tratamento Epagri 107_FeSO₄EDTA, onde houve a perda de amostra, restando apenas três replicatas biológicas).

Normalmente, os resultados de análises proteômicas indicam a grande maioria de *spots* diferencialmente expressos, ou seja, quando comparados determinados tratamentos, a maioria das proteínas apresenta diferença de expressão, mas estão presentes em ambos os tratamentos. No caso dessa análise, a grande maioria dos *spots* localizados pelo programa foram presentes em um dos tratamentos e ausentes no outro. Dessa forma, os resultados das análises são apresentados separadamente, para os *spots* diferencialmente expressos (tab. 2) e para aqueles que se apresentaram presentes/ausentes (tab. 4), quando realizada a análise.

Para os *spots* diferencialmente expressos foram calculados p-valores e q-valores. As comparações foram realizadas entre os diversos grupos (BR-IRGA 410_Controle, BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA, Epagri 107_Controle, Epagri 107_FeSO₄EDTA) e na tab. 2 são apresentados os *spots* que apresentaram-se diferencialmente expressos para as comparações de interesse: BR-IRGA 410_Controle x BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA; Epagri 107_Controle x Epagri 107_FeSO₄EDTA; BR-IRGA 410_Controle x Epagri 107_Controle; BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA x Epagri 107_FeSO₄EDTA).

Tabela 2 - Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos comparados de acordo com p-valores, q-valores e abundância relativa (volume) de cada spot.

Nº Spot	Comparação		Volume		qValor	pValor
	A	B	A	B		
Spot 001	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,58	3,85	0,0037	0,0001000
	Epagri_Con	Irga_Con	0,93	1,88	0,0129	0,0012000
	Irga_Fe	Irga_Con	3,85	1,88	0,0129	0,0013000
Spot 005	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,13	0,77	0,0203	0,0040000
Spot 010	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,08	0,55	0,0192	0,0033000
	Irga_Fe	Irga_Con	0,3	0,43	0,0297	0,0093000
Spot 011	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,36	0,58	0,0117	0,0009000
Spot 012	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,23	2,2	0,0295	0,0089000
Spot 013	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,89	0,22	0,014	0,0018000
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,89	0,23	0,0238	0,0056000
Spot 020	Epagri_Con	Irga_Con	0,4	0,09	0,0308	0,0098000
Spot 022	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,07	0,61	0,0149	0,0021000
Spot 033	Epagri_Fe	Epagri_Con	2,37	4,48	0,0274	0,0075000
Spot 035	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,7	1,43	0,0285	0,0082000
Spot 040	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,17	0,94	0,0295	0,0090000
Spot 043	Irga_Fe	Irga_Con	0,68	0,12	0,0112	0,0007000
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,4	0,68	0,0197	0,0036000
	Epagri_Con	Irga_Con	0,4	0,12	0,0297	0,0093000
Spot 044	Irga_Fe	Irga_Con	2,29	0,75	0,0057	0,0002000
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,98	2,29	0,0129	0,0011000
Spot 045	Epagri_Fe	Epagri_Con	2,13	5,57	0,0139	0,0017000
Spot 049	Epagri_Con	Irga_Con	0,75	0,25	0,0238	0,0056000
Spot 054	Irga_Fe	Irga_Con	0,2	0,63	0,0274	0,0074000
Spot 065	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,11	0,53	0,0289	0,0085000
Spot 073	Irga_Fe	Irga_Con	0,07	1,81	0,014	0,0018000
Spot 086	Irga_Fe	Irga_Con	0,29	0,58	0,0274	0,0072000
Spot 088	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,12	1,09	0,0144	0,0020000
Spot 098	Irga_Fe	Irga_Con	0,63	1,74	0,0203	0,0040000
Spot 106	Epagri_Fe	Epagri_Con	1	4,11	0,0083	0,0003000
	Epagri_Fe	Irga_Fe	1	5,21	0,0092	0,0004000
Spot 107	Epagri_Con	Irga_Con	0,62	0,09	0,0203	0,0041000
Spot 108	Epagri_Fe	Epagri_Con	1,05	3,21	0,0033	0,0000000
	Epagri_Con	Irga_Con	3,21	1,94	0,0194	0,0035000
Spot 109	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,76	3,12	0,0083	0,0003000
	Irga_Fe	Irga_Con	1,18	2,37	0,0118	0,0009000
Spot 122	Irga_Fe	Irga_Con	2,26	0,35	0,014	0,0017000
Spot 123	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,43	1,96	0,0169	0,0025000
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,43	1,49	0,0274	0,0077000
Spot 125	Epagri_Fe	Epagri_Con	1,52	2,96	0,0274	0,0073000
Spot 128	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,73	4,1	0,0051	0,0001000
Spot 134	Epagri_Con	Irga_Con	0,65	0,05	0,0093	0,0004000
Spot 138	Irga_Fe	Irga_Con	0,12	0,54	0,0274	0,0070000

Tabela 2 - Continuação

Nº Spot	Comparação		Volume		qValor	pValor
	A	B	A	B		
Spot 145	Irga_Fe	Irga_Con	0,16	0,69	0,0182	0,0030000
Spot 155	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,06	0,48	0,0131	0,0014000
	Epagri_Con	Irga_Con	0,48	0,09	0,0282	0,0081000
Spot 159	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,77	1,35	0,0274	0,0076000
Spot 160	Epagri_Con	Irga_Con	0,84	0,17	0,0129	0,0012000
Spot 164	Epagri_Con	Irga_Con	2,68	1,94	0,0262	0,0064000
Spot 171	Epagri_Fe	Epagri_Con	2,55	6,98	0,0096	0,0005000
	Epagri_Con	Irga_Con	6,98	4,62	0,0129	0,0013000
Spot 177	Epagri_Con	Irga_Con	0,44	0,08	0,0274	0,0068000
Spot 183	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,55	1,34	0,0194	0,0035000
Spot 188	Epagri_Con	Irga_Con	0,74	0,07	0,0153	0,0022000
Spot 192	Irga_Fe	Irga_Con	0,1	0,55	0,0169	0,0025000
Spot 196	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,24	1,08	0,0129	0,0012000
Spot 199	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,39	2,24	0,0203	0,0041000
Spot 205	Irga_Fe	Irga_Con	0,76	0,36	0,0274	0,0074000
Spot 206	Epagri_Con	Irga_Con	0,56	0,23	0,0274	0,0074000
Spot 208	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,63	1,74	0,0102	0,0006000
Spot 226	Epagri_Con	Irga_Con	1,26	0,51	0,0225	0,0050000
Spot 228	Epagri_Con	Irga_Con	2,83	0,52	0,0203	0,0043000
Spot 229	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,39	2,12	0,0051	0,0001000
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,39	1,34	0,0131	0,0014000
Spot 231	Epagri_Con	Irga_Con	0,36	0,16	0,0295	0,0090000
Spot 232	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,34	2,68	0,0116	0,0008000
	Epagri_Con	Irga_Con	2,68	0,4	0,0203	0,0044000
Spot 239	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,35	3,19	0,002	0,0000000
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,35	0,83	0,0225	0,0052000
Spot 252	Epagri_Con	Irga_Con	0,4	0,03	0,0212	0,0047000
Spot 257	Irga_Fe	Irga_Con	0,34	0,1	0,0295	0,0089000
Spot 265	Epagri_Fe	Epagri_Con	0,87	0,08	0,0225	0,0052000
Spot 281	Irga_Fe	Irga_Con	0,83	0,05	0,0147	0,0020000
Spot 289	Irga_Fe	Irga_Con	1,12	0,21	0,0121	0,0010000

* Cada cor refere-se à comparação entre dois tratamentos.

Epagri_Con= cultivar tolerante Epagri 107 controle; Epagri_Fe= cultivar tolerante Epagri 107 tratada com FeSO₄EDTA; Irga_Con= cultivar sensível BR-IRGA 410 controle; Irga_Fe= cultivar sensível BR-IRGA 410 tratada com FeSO₄EDTA.

Para os *spots* diferencialmente expressos (tab. 2 e 3) foram encontrados 74 *spots* entre todas as comparações. Um total de 21 *spots* foi encontrado quando comparados os géis referentes às amostras de Epagri 107_Controle x Epagri 107_FeSO₄EDTA, sendo que 17 *spots* são exclusivos para essa comparação. Ainda, dos 21 *spots* diferencialmente expressos, 17 *spots* tiveram abundância relativa aumentada para Epagri 107_Controle em relação à Epagri 107_FeSO₄EDTA, sendo 16 *spots* exclusivos para a situação e 4 *spots* tiveram abundância relativa

aumentada para Epagri 107_FeSO₄EDTA, na mesma comparação, sendo 1 *spot* exclusivo (totalizando os 17 *spots* exclusivos na comparação entre esses tratamentos).

Quando os tratamentos BR-IRGA 410_Controle e BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA foram comparados, um total de 17 *spots* foram diferencialmente expressos, sendo 12 exclusivos na comparação. Desse total, 9 *spots* tiveram abundância relativa aumentada para BR-IRGA 410_Controle, sendo 7 *spots* exclusivos e 8 *spots* tiveram abundância relativa aumentada em BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA, onde 5 *spots* foram exclusivos (tab. 3).

Na comparação entre os controles das cultivares (BR-IRGA 410_Controle x Epagri 107_Controle), 19 *spots* foram diferencialmente expressos, sendo 13 exclusivos dessa comparação. Para BR-IRGA 410_Controle, 18 *spots* tiveram aumento da abundância relativa, sendo 13 exclusivos e para Epagri 107_Controle, apenas 1 *spot* apresentou aumento de abundância relativa, não sendo exclusivo para essa comparação (tab. 3).

A última comparação considerada, foi entre os tratamentos das cultivares (BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA x Epagri 107_FeSO₄EDTA), obtendo-se um total de 8 *spots* diferencialmente expressos, sendo 2 exclusivos para essa comparação. Apenas 1 *spot* teve abundância relativa aumentada para Epagri 107_FeSO₄EDTA, não sendo exclusivo e 7 *spots* com aumento de abundância relativa para BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA, sendo 2 exclusivos (tab. 3).

Quando totalizados os *spots* com aumento de abundância relativa para cada tratamento, independente da comparação, obteve-se um total de 44 *spots* para Epagri 107_Controle (29 exclusivos), 4 *spots* para Epagri 107_FeSO₄EDTA (1 exclusivos), 10 *spots* para BR-IRGA 410_Controle (7 exclusivos), 15 *spots* para BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA (7 exclusivos).

Tabela 3 - *Spots* diferencialmente expressos para as diversas comparações. EpCon = Epagri 107_Controle; EpFe = Epagri 107_FeSO₄EDTA; IrCon = BR-IRGA 410_Controle; IrFe = BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA.

			Total de Spots			Spots Exclusivos		
1	x	2	1	2	Total	1	2	Total
EpCon	x	EpFe	17	4	21	16	1	17
IrCon	x	IrFe	9	8	17	7	5	12
IrCon	x	EpCon	18	1	19	13	—	13
IrFe	x	EpFe	7	1	8	2	—	2

Para os *spots* presentes em um dos tratamentos dentro das comparações de interesse (foram consideradas as mesmas comparações apresentadas para os *spots* diferencialmente expressos), não foi realizada análise estatística (tab. 4). O número de *spots* que se apresentaram presentes ou ausentes foi muito maior que os diferencialmente expressos, como relatado anteriormente, totalizando 284 *spots* presentes, quando realizadas as comparações.

Tabela 4 - Relação de *spots* presentes e ausentes, média e desvio padrão para replicatas biológicas presentes em cada tratamento nas diferentes comparações.

Comparação					Comparação				
		Volume		Desvio Padrão			Volume		Desvio Padrão
Spot	Presente	Ausente	Média		Spot	Presente	Ausente	Média	
0	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,04	77	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,40	0,18
3	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,02		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,25	0,04
4	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,03	78	Irga_Con	Irga_Fe	1,02	0,46
7	Epagri_Con	Epagri_Fe	2,04	1,06		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,88	0,12
9	Irga_Con	Irga_Fe	0,98	0,79	79	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,22	0,06
16	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,01		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,47	0,03
	Epagri_Con	Irga_Con	0,08	0,01	81	Irga_Con	Irga_Fe	0,48	0,46
18	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,16	0,02		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,23	0,09
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,14	0,02	82	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02
20	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,06	90	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,09
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,03	93	Irga_Con	Irga_Fe	0,35	0,10
23	Irga_Con	Irga_Fe	0,18	0,04		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,37	0,19
24	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,01	94	Irga_Con	Irga_Fe	0,36	0,04
25	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,52	0,16	96	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,11	0,02
26	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,17	0,07	97	Irga_Con	Irga_Fe	0,18	0,02
29	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,17	0,06	98	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,42	0,06
31	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,03		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,53	0,09
32	Irga_Con	Irga_Fe	1,65	0,61	99	Irga_Con	Irga_Fe	0,42	0,08
38	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,01		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,33	0,09
42	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,31	0,03	101	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,29	0,11
47	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,84	0,09	103	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,37	0,06
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,34	0,09	107	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,05
48	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,42	0,09		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,44	0,08
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,29	0,05	111	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,54	0,08
50	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,11	0,02	116	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,11	0,02
51	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,17	0,02	117	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,04
54	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,13	0,06		Irga_Con	Irga_Fe	1,37	0,22
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,04	118	Epagri_Fe	Irga_Fe	1,54	0,17
56	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,26	0,05	119	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,16	0,07
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,03	120	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,30	0,24
57	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,25	0,07		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02
58	Irga_Con	Irga_Fe	0,26	0,08		Irga_Con	Irga_Fe	0,34	0,06
59	Irga_Con	Irga_Fe	0,37	0,07	124	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,33	0,13
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,72	0,19	126	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,31	0,08
61	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,12	0,03	132	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,32	0,06
62	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02	133	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,41	0,29
63	Irga_Con	Irga_Fe	0,14	0,07	134	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,21	0,05
	Irga_Con	Irga_Fe	0,61	0,11		Irga_Con	Irga_Fe	0,18	0,03
66	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,33	0,06	135	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,03
68	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,02	136	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,27	0,18
70	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,31	0,07	137	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,04
71	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,03	138	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02
72	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,02	139	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,19	0,03
73	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,47	0,08	140	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,50	0,22
74	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,28	0,08
	Irga_Con	Irga_Fe	0,18	0,06	141	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,34	0,05
75	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,02	142	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,03
	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,07	143	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,04
76	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,12	0,02	145	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,31	0,05

Tabela 4 - Continuação

Comparação		Volume		Spot	Comparação		Volume		Spot
Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão		Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão	
Irga_Con	Irga_Fe	0,29	0,15	146	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,01	204
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,38	0,05	205
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,03	147	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,02	
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,21	0,09	148	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,02	206
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,04		Irga_Con	Irga_Fe	0,16	0,07	207
Irga_Con	Irga_Fe	0,46	0,71	149	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,06	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,04	150	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,25	0,06	210
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,28	0,09	151	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,07	0,01	
Irga_Con	Irga_Fe	0,21	0,02	154	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,01	211
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,26	0,05	156	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,06	0,02	212
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,02	157	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,05	213
Irga_Con	Irga_Fe	0,21	0,07	158	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,12	0,04	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,04		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,07	214
Irga_Con	Irga_Fe	0,34	0,02	159	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,20	0,03	216
Epagri_Fe	Irga_Fe	0,48	0,18		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,03	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,27	0,05	160	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,06	0,01	217
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,48	0,08	163	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,16	0,01	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,45	0,09		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,32	0,04	218
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,91	0,12	164	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,04	219
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,88	0,14		Irga_Con	Irga_Fe	0,13	0,04	220
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,02	170	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,01	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,03	172	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,16	0,05	221
Irga_Con	Irga_Fe	0,48	0,26	174	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,34	0,11	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,35	0,17		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,01	222
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,66	0,31	176	Irga_Con	Irga_Fe	0,09	0,02	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,74	0,07		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,02	223
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,14	0,04	177	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,49	0,19	224
Irga_Con	Irga_Fe	0,75	0,16	179	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,25	0,09	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,73	0,23	180	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,41	0,04	226
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,05	181	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,97	0,49	228
Irga_Con	Irga_Fe	0,53	0,23	182	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,89	0,15	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,51	0,22		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,31	0,07	230
Irga_Con	Irga_Fe	0,30	0,09	184	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,32	0,07	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,08		Irga_Con	Irga_Fe	0,10	0,02	231
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,07	0,02	185	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,12	0,03	
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,29	0,07	187	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,20	0,07	232
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,25	0,04		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,14	0,01	233
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,23	0,07	188	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,03	234
Irga_Con	Irga_Fe	0,32	0,09	189	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,23	0,08	235
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,20	0,07		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,39	0,11	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,05	190	Irga_Con	Irga_Fe	0,14	0,02	238
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,02		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,03	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,20	0,05	191	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,21	0,03	240
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,02	192	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,29	0,08	
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,38	0,12	193	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,07	0,01	241
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02	194	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,05	0,01	242
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,04	195	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,06	0,02	243
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,22	0,10	200	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,41	0,07	244
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,06		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,01	245
Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,04	203					

Tabela 4 - Continuação

Comparação					Comparação				
Spot	Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão	Spot	Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão
246	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,23	0,04	302	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,25	0,03
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,27	0,04	303	Irga_Con	Epagri_Con	0,31	0,13
247	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,60	0,10		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,15	0,04
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,61	0,15	306	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,45	0,18
249	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,26	0,03		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,45	0,18
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,04	0,00	307	Epagri_Fe	Irga_Fe	2,81	1,93
250	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,24	0,04		Epagri_Fe	Epagri_Con	2,81	1,93
252	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,05	309	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,31	0,12
253	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,10		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,31	0,12
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,26	0,05	310	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,88	0,26
254	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,15	0,06		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,88	0,26
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,02	312	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,24	0,13
255	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,10		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,24	0,13
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,04	313	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,34	0,11
256	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,27	0,07		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,34	0,11
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,28	0,07	315	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,26	0,15
257	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,05		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,26	0,15
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,01	318	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,30	0,11
259	Epagri_Con	Irga_Con	0,29	0,08		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,30	0,11
262	Epagri_Con	Irga_Con	0,13	0,02	319	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,72	0,43
264	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,40	0,11		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,72	0,43
265	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,55	0,35	320	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,20	0,17
266	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,22	0,11		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,20	0,17
267	Epagri_Con	Irga_Con	0,18	0,07	322	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,28	0,08
269	Epagri_Con	Irga_Con	0,21	0,10		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,28	0,08
270	Epagri_Con	Irga_Con	0,41	0,09	323	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,26	0,06
271	Epagri_Con	Irga_Con	1,00	0,47		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,26	0,06
273	Epagri_Con	Irga_Con	0,14	0,03	324	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,68	0,28
274	Epagri_Con	Irga_Con	0,22	0,06		Epagri_Fe	Epagri_Con	0,68	0,28
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,18	0,05	360	Epagri_Con	Irga_Con	0,13	0,02
275	Epagri_Con	Irga_Con	0,41	0,08		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,02
	Epagri_Fe	Irga_Fe	0,97	0,21	361	Epagri_Con	Irga_Con	0,23	0,04
276	Epagri_Con	Irga_Con	0,36	0,15		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,23	0,04
278	Irga_Con	Epagri_Con	0,38	0,07	362	Epagri_Con	Irga_Con	0,26	0,01
	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,55	0,08		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,26	0,01
280	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,26	0,08	363	Epagri_Con	Irga_Con	0,34	0,02
281	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,42	0,16		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,34	0,02
282	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,05	364	Epagri_Con	Irga_Con	0,08	0,02
284	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,24	0,13		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,02
286	Irga_Con	Epagri_Con	0,40	0,24	365	Epagri_Con	Irga_Con	0,13	0,03
287	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,46	0,16		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,03
288	Irga_Con	Epagri_Con	0,48	0,18	366	Epagri_Con	Irga_Con	0,48	0,15
	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,47	0,10		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,48	0,15
289	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,56	0,05	367	Epagri_Con	Irga_Con	0,08	0,01
291	Irga_Fe	Epagri_Fe	1,36	0,46		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,01
292	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,36	0,03	368	Epagri_Con	Irga_Con	0,14	0,02
294	Irga_Con	Epagri_Con	0,64	0,10		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,14	0,02
295	Irga_Con	Epagri_Con	0,13	0,05	369	Epagri_Con	Irga_Con	0,29	0,06
296	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,14	0,01		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,29	0,06
297	Irga_Con	Epagri_Con	0,12	0,07	370	Epagri_Con	Irga_Con	0,08	0,03
298	Irga_Fe	Epagri_Fe	0,38	0,03		Epagri_Con	Epagri_Fe	0,08	0,03

Tabela 4 - Continuação

Comparação					Comparação				
Spot	Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão	Spot	Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão
373	Epagri_Con	Irga_Con	0,10	0,02	425	Irga_Fe	Irga_Con	0,57	0,03
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,57	0,03
374	Epagri_Con	Irga_Con	0,09	0,02	426	Irga_Fe	Irga_Con	2,49	1,33
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,09	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	2,49	1,33
375	Epagri_Con	Irga_Con	0,58	0,12	427	Irga_Fe	Irga_Con	0,46	0,13
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,58	0,12		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,46	0,13
376	Epagri_Con	Irga_Con	0,19	0,05	428	Irga_Fe	Irga_Con	0,32	0,05
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,19	0,05		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,32	0,05
377	Epagri_Con	Irga_Con	0,11	0,04	429	Irga_Fe	Irga_Con	0,17	0,02
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,11	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,02
380	Epagri_Con	Irga_Con	0,16	0,06	430	Irga_Fe	Irga_Con	0,33	0,11
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,16	0,06		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,33	0,11
381	Epagri_Con	Irga_Con	0,25	0,04	431	Irga_Fe	Irga_Con	0,12	0,02
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,25	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,12	0,02
382	Epagri_Con	Irga_Con	0,27	0,06	432	Irga_Fe	Irga_Con	0,46	0,09
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,27	0,06		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,46	0,09
383	Epagri_Con	Irga_Con	0,10	0,01	433	Irga_Fe	Irga_Con	0,10	0,02
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,10	0,02
384	Epagri_Con	Irga_Con	0,15	0,07	434	Irga_Fe	Irga_Con	0,53	0,14
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,07		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,53	0,14
385	Epagri_Con	Irga_Con	0,10	0,03	435	Irga_Fe	Irga_Con	0,31	0,06
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,03		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,31	0,06
386	Epagri_Con	Irga_Con	0,10	0,02	436	Irga_Fe	Irga_Con	0,29	0,08
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,29	0,08
388	Epagri_Con	Irga_Con	0,05	0,01	437	Irga_Fe	Irga_Con	0,15	0,02
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,05	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,15	0,02
390	Epagri_Con	Irga_Con	0,14	0,07	438	Irga_Fe	Irga_Con	0,24	0,10
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,14	0,07		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,24	0,10
391	Epagri_Con	Irga_Con	0,15	0,02	440	Irga_Fe	Irga_Con	0,17	0,07
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,07
392	Epagri_Con	Irga_Con	0,28	0,02	441	Irga_Fe	Irga_Con	0,79	0,22
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,28	0,02		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,79	0,22
393	Epagri_Con	Irga_Con	0,43	0,01	442	Irga_Fe	Irga_Con	0,85	0,04
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,43	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,85	0,04
396	Epagri_Con	Irga_Con	0,13	0,04	443	Irga_Fe	Irga_Con	0,41	0,12
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,13	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,41	0,12
397	Epagri_Con	Irga_Con	0,06	0,04	444	Irga_Fe	Irga_Con	0,42	0,16
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,06	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,42	0,16
402	Epagri_Con	Irga_Con	0,10	0,01	445	Irga_Fe	Irga_Con	0,19	0,04
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,10	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,19	0,04
405	Epagri_Con	Irga_Con	0,15	0,04	447	Irga_Fe	Irga_Con	0,17	0,05
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,15	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,05
406	Epagri_Con	Irga_Con	0,46	0,22	449	Irga_Fe	Irga_Con	0,13	0,04
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,46	0,22		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,13	0,04
407	Epagri_Con	Irga_Con	0,24	0,06	450	Irga_Fe	Irga_Con	0,20	0,04
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,24	0,06		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,20	0,04
408	Epagri_Con	Irga_Con	0,19	0,03	451	Irga_Fe	Irga_Con	0,36	0,08
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,19	0,03		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,36	0,08
411	Epagri_Con	Irga_Con	0,18	0,01	452	Irga_Fe	Irga_Con	0,12	0,02
	Epagri_Con	Epagri_Fe	0,18	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,12	0,02

Tabela 4 - Continuação

Comparação		Volume		Spot	Comparação		Volume		Spot
Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão		Presente	Ausente	Média	Desvio Padrão	
Irga_Fe	Irga_Con	0,10	0,03	453	Irga_Fe	Irga_Con	0,68	0,55	468
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,10	0,03		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,68	0,55	
Irga_Fe	Irga_Con	0,28	0,16	454	Irga_Fe	Irga_Con	0,55	0,05	469
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,28	0,16		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,55	0,05	
Irga_Fe	Irga_Con	0,27	0,05	455	Irga_Fe	Irga_Con	0,30	0,17	470
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,27	0,05		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,30	0,17	
Irga_Fe	Irga_Con	0,18	0,06	456	Irga_Fe	Irga_Con	0,29	0,21	476
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,06		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,29	0,21	
Irga_Fe	Irga_Con	0,10	0,04	457	Irga_Fe	Irga_Con	0,25	0,05	482
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,10	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,25	0,05	
Irga_Fe	Irga_Con	0,31	0,04	458	Irga_Fe	Irga_Con	0,36	0,30	486
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,31	0,04		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,36	0,30	
Irga_Fe	Irga_Con	0,63	0,40	459	Irga_Fe	Irga_Con	0,16	0,00	493
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,63	0,40		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,16	0,00	
Irga_Fe	Irga_Con	0,50	0,22	460	Irga_Fe	Irga_Con	0,23	0,09	494
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,50	0,22		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,23	0,09	
Irga_Fe	Irga_Con	0,23	0,03	461	Irga_Fe	Irga_Con	0,59	0,09	495
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,23	0,03		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,59	0,09	
Irga_Fe	Irga_Con	0,07	0,01	462	Irga_Fe	Irga_Con	0,18	0,04	496
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,07	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,18	0,04	
Irga_Fe	Irga_Con	0,05	0,01	463	Irga_Fe	Irga_Con	0,17	0,06	497
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,05	0,01		Irga_Fe	Epagri_Fe	0,17	0,06	
Irga_Fe	Irga_Con	0,36	0,05	464	Irga_Con	Irga_Fe	0,23	0,16	510
Irga_Fe	Epagri_Fe	0,36	0,05		Irga_Con	Epagri_Con	0,23	0,16	
Irga_Fe	Irga_Con	1,42	1,11	465	Irga_Con	Irga_Fe	0,63	0,12	511
Irga_Fe	Epagri_Fe	1,42	1,11		Irga_Con	Epagri_Con	0,63	0,12	

* Cada cor refere-se à comparação entre dois tratamentos.

Epagri_Con= cultivar tolerante Epagri 107 controle; Epagri_Fe= cultivar tolerante Epagri 107 tratada com FeSO₄EDTA; Irga_Con= cultivar sensível BR-IRGA 410 controle; Irga_Fe= cultivar sensível BR-IRGA 410 tratada com FeSO₄EDTA.

Para a comparação Epagri 107_Control x Epagri 107_FeSO₄EDTA, um total de 169 *spots* foram presentes em Epagri 107_Control e ausentes em Epagri 107_FeSO₄EDTA, sendo 74 exclusivos dessa comparação. Na mesma comparação, 13 *spots* foram presentes no tratamento e ausentes no controle, não havendo *spots* exclusivos para essa comparação (tab.4 e 5).

Quando comparados BR-IRGA 410_Control x BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA, 34 *spots* foram presentes no controle e ausentes no tratamento, sendo 10 exclusivos e 49 *spots* presentes no tratamento e ausentes no controle, não havendo *spots* exclusivos dessa comparação (tab. 5).

Para a comparação entre os controles, Epagri 107_Control x BR-IRGA 410_Control foram presentes 47 *spots* na cultivar Epagri 107 (ausentes na outra

cultivar), sendo 8 *spots* exclusivos e 9 *spots* presentes na cultivar BR-IRGA 410, sendo 4 *spots* exclusivos (tab. 5).

Para a última comparação, entre os tratamentos, Epagri 107_FeSO₄EDTA e BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA, foram 23 *spots* presentes na cultivar Epagri 107, sendo 5 exclusivos e 107 *spots* presentes em BR-IRGA 410, sendo 15 exclusivos dessa comparação (tab. 5).

Quando totalizados os *spots* presentes em cada tratamento (e ausentes no tratamento comparado), independente da comparação, obteve-se um total de 216 *spots* para Epagri 107_Controle (82 exclusivos), 36 *spots* para Epagri 107_FeSO₄EDTA (5 exclusivos), 43 *spots* para BR-IRGA 410_Controle (14 exclusivos), 156 *spots* para BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA (15 exclusivos) (tab. 5).

Tabela 5 - *Spots* presentes ou ausentes para as diversas comparações. EpCon = Epagri 107_Controle; EpFe = Epagri 107_FeSO₄EDTA; IrCon = BR-IRGA 410_Controle; IrFe = BR-IRGA 410_FeSO₄EDTA.

			Total de Spots			Spots Exclusivos		
1	x	2	1	2	Total	1	2	Total
EpCon	x	EpFe	169	13	182	74	—	74
IrCon	x	IrFe	34	49	83	10	—	10
IrCon	x	EpCon	9	47	56	4	8	12
IrFe	x	EpFe	107	23	130	15	5	20

A partir desses resultados pôde-se observar que para a cultivar tolerante ao estresse por ferro, quando submetida ao tratamento com FeSO₄EDTA, houve uma redução da abundância relativa de *spots*, ou seja, a expressão das proteínas foi reduzida. Já na cultivar sensível a resposta ao estresse foi oposta, ou seja, ocorreu aumento da abundância relativa dos *spots* nas raízes das plantas submetidas ao tratamento em relação às raízes das plantas controle.

Quando comparados os controles das cultivares, observou-se um número muito maior de *spots* diferencialmente expressos nas raízes das plantas da cultivar tolerante, sem o tratamento (controle), os quais quando submetidos ao tratamento foram drasticamente reduzidos (relação presentes/ausentes) em número e diferença de expressão. Como houve uma redução principalmente daqueles *spots* que eram presentes e se tornaram ausentes sob tratamento, supõe-se que o estresse provocou direta ou indiretamente a inativação de proteínas de diversas rotas metabólicas, as quais podem estar envolvidas no mecanismo de tolerância apresentado pela cultivar Epagri 107.

3.3 Identificação do proteoma diferencial em raízes da cultivar de arroz Epagri 107 submetidas ao estresse por ferro

A identificação das proteínas de raízes da cultivar Epagri 107, tanto controle como tratamento, foi priorizada, por serem, possivelmente, proteínas relacionadas à tolerância ao estresse por ferro, além de apresentar um grande número de *spots* diferenciais e presentes/ausentes em relação à outra cultivar. Dessa forma, os *spots* diferencialmente expressos e os que apresentaram presença na comparação entre tratamento com FeSO₄EDTA e controle para a cultivar Epagri 107, foram excisados para identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF-TOF. Dentre os *spots* excisados, todos os *spots* apresentaram reprodutibilidade entre todas replicatas biológicas para os *spots* diferencialmente expressos e, no caso dos *spots* apenas presentes em um dos tratamentos, foram retirados aqueles que se mostraram presentes, no mínimo em 3 replicatas biológicas.

Dos 204 *spots* excisados, 94 *spots* foram identificados por espectrometria de massa entre os que apresentaram abundância diferencial ou presença em apenas um dos tratamentos quando em comparação.

Na Fig. 6, são indicados os *spots* que apresentaram abundância diferencial e presença em comparação a outro tratamento ou cultivar em raízes do controle da cultivar Epagri 107, os quais foram retirados para identificação por espectrometria de massa. Os números de identificação de cada um dos *spots* indicados no gel bidimensional da Fig. 6, permitem a verificação da abundância relativa de cada *spot* e a comparação a que foi submetido nas tab. 2 e 4. Os números em cor vermelha e que apresentam sinal + ou -, significam *spots* com diferença de abundância relativa entre tratamentos. Quando apresentados em azul e com sinais, significa que existe em mais de uma comparação a diferença de expressão. Os números sem sinais e de cor preta, são os que estão presentes apenas nesse tratamento em relação a uma determinada comparação. O mesmo ocorre para as Fig. 7, 8 e 9, onde são apresentados os géis do tratamento com FeSO₄EDTA para a cultivar Epagri 107, do controle da cultivar BR-IRGA 410 e do tratamento com FeSO₄EDTA da cultivar BR-IRGA 410, respectivamente. Para espectrometria de massa foram selecionados somente *spots* referentes às proteínas de raízes da cultivar Epagri 107, porém,

como muitas proteínas identificadas são comuns ao tratamento e controle da cultivar BR_IRGA 410, os mesmos são apresentados nas Fig. 8 e 9.

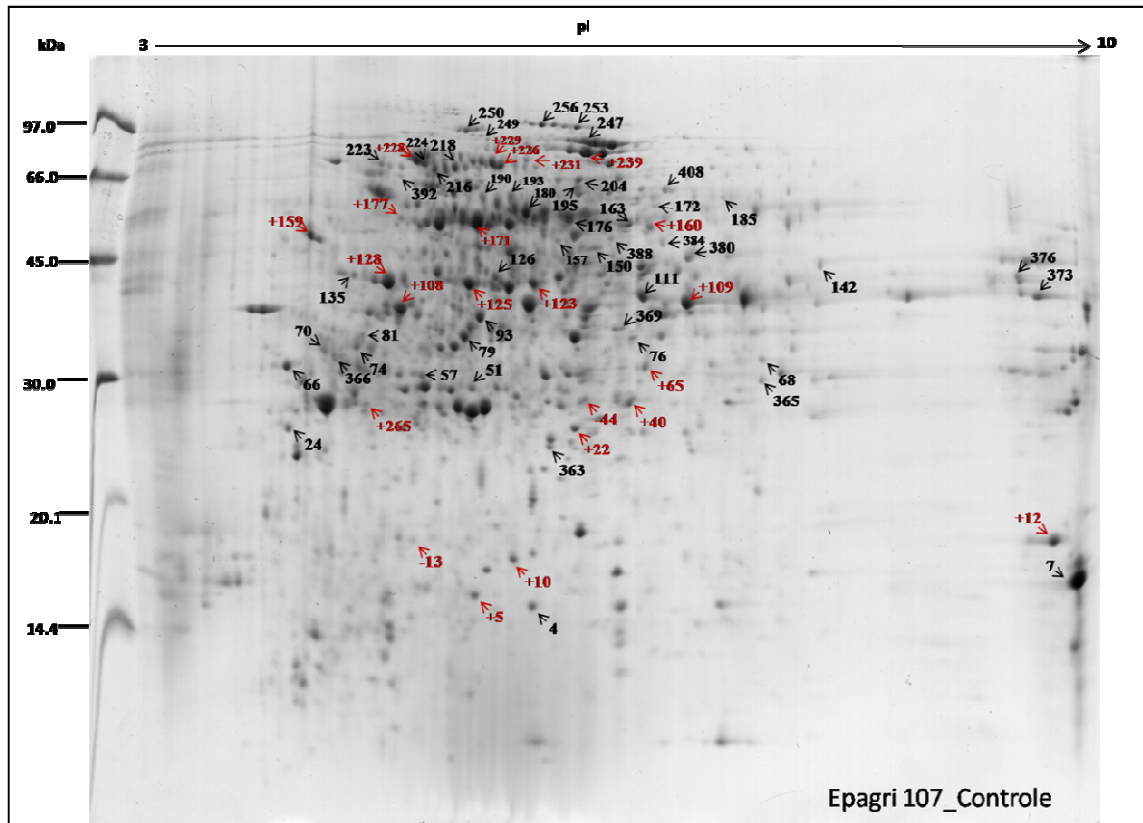


Figura 6 - Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no controle da cultivar Epagri 107 (tolerante) em comparação aos demais tratamentos. Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de *Comassie*. A análise de expressão diferencial e a detecção dos spots presentes/ausentes foi realizada no software *Image Master 2D platinum*. Spots com numeração em cor vermelha significam diferencialmente expressos com maior (+) ou menor (-) abundância relativa em relação ao gel de outro tratamento. Spots em cor preta indicam presença do spot no gel do tratamento em relação a outro.

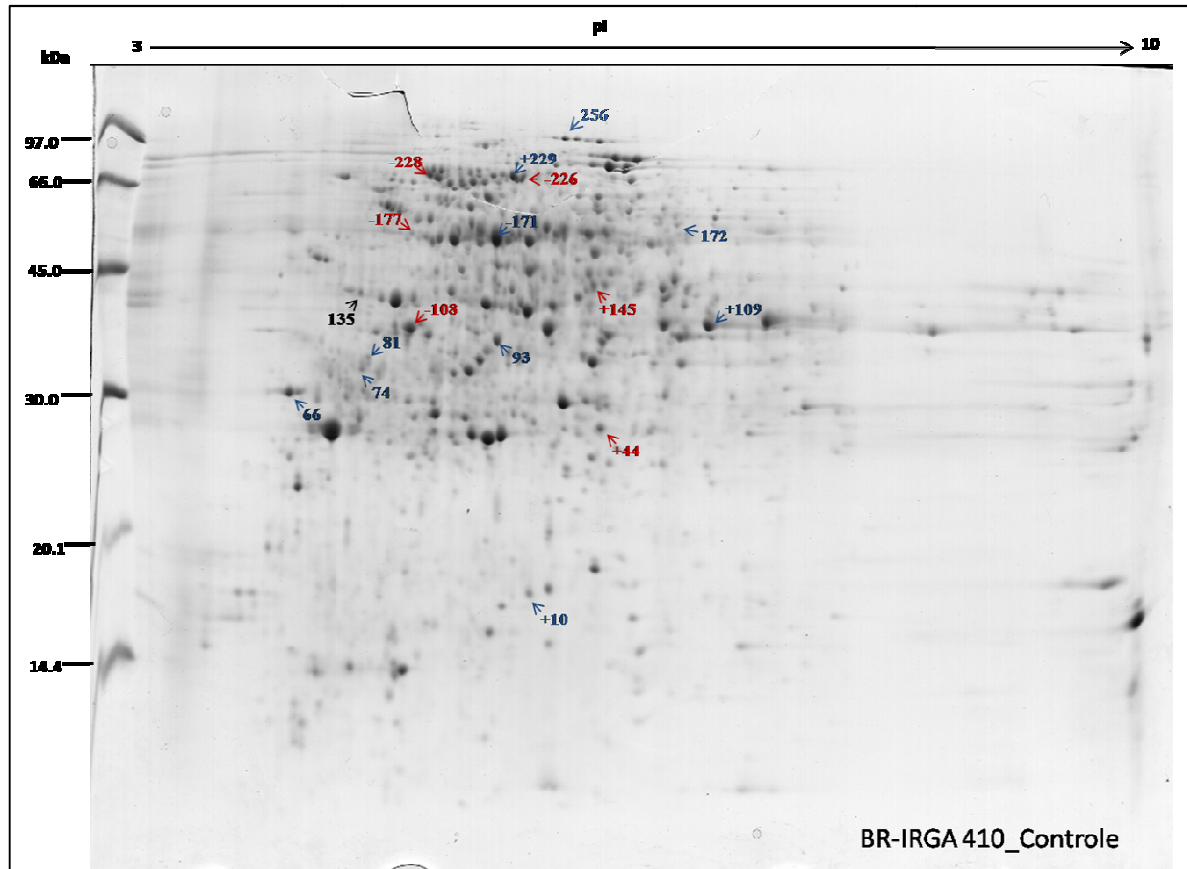


Figura 8 - Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no controle da cultivar BR-IRGA 410 (sensível) em comparação aos demais tratamentos (somente aqueles *spots* comuns aos géis das Fig. 6 e 7). Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de *Comassie*. A análise de expressão diferencial e a detecção dos *spots* presentes/ausentes foi realizada no software *Image Master 2D platinum*. *Spots* com numeração em cor vermelha significam diferencialmente expressos com maior (+) ou menor (-) abundância relativa em relação ao gel de outro tratamento. Quando em cor azul, significam diferença de expressão em relação a mais de um tratamento, já existente em outro tratamento. *Spots* em cor preta indicam presença do *spot* no gel do tratamento em relação a outro.

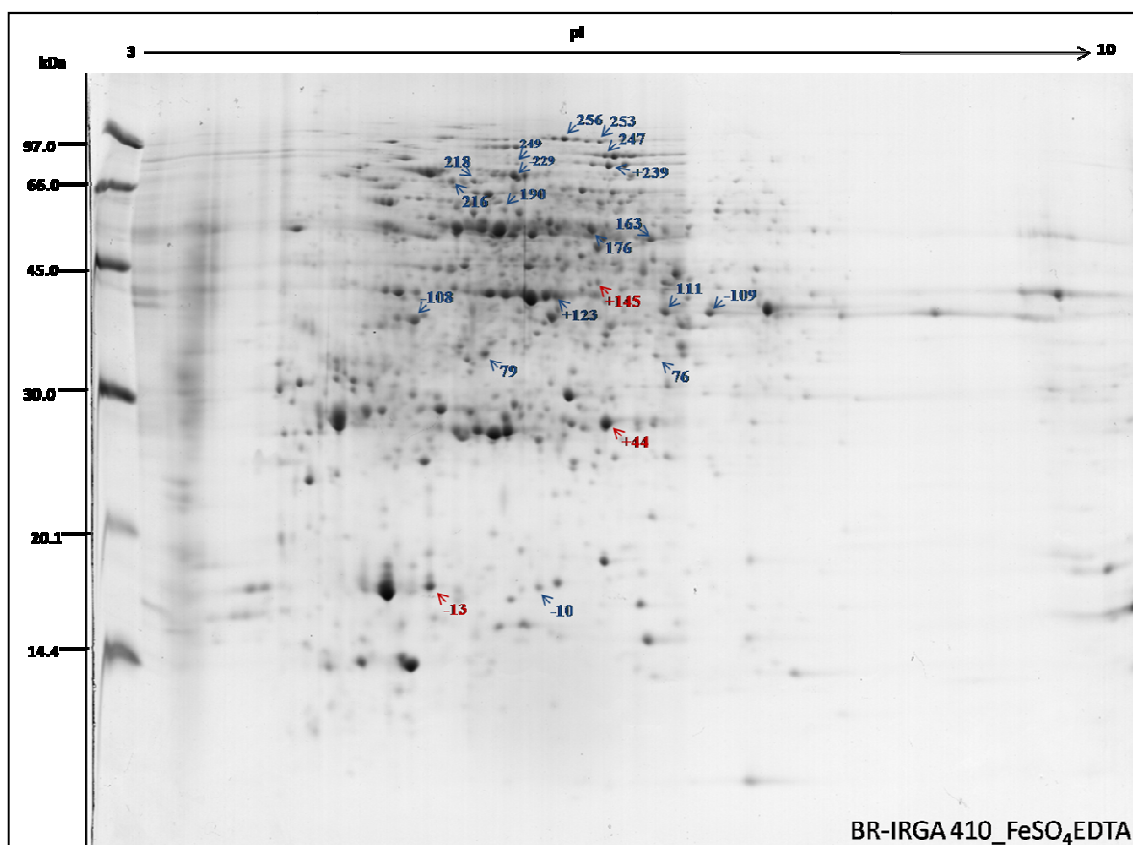


Figura 9 - Proteínas de raízes com expressão diferencial ou presentes no tratamento com FeSO_4EDTA da cultivar BR-IRGA 410 (sensível) em comparação ao demais tratamentos (somente aqueles *spots* comuns aos géis das Fig. 6 e 7). Proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de *Comassie*. *Spots* com numeração em cor vermelha significam diferencialmente expressos com maior (+) ou menor (-) abundância relativa em relação ao gel de outro tratamento. Quando em cor azul, significam diferença de expressão em relação a mais de um tratamento, já existente em outro tratamento. *Spots* em cor preta indicam presença do *spot* no gel do tratamento em relação a outro.

Os *spots* apresentados como diferencialmente expressos e presentes nas comparações dos tratamentos, apresentados nas Fig. 6, 7, 8 e 9 acima, tiveram as proteínas identificadas e agrupadas de acordo com a função a qual estão relacionadas: metabolismo de carboidratos, relacionadas à transdução de sinais, reações de oxidação e redução, fatores de transcrição, envolvidas na defesa do organismo contra estresses bióticos e abióticos, transposons, ácidos nucleicos e aquelas que possuem função desconhecida ou não pertencem às categorias estipuladas (tab. 6).

Tabela 6 - Proteínas identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) em raízes de arroz submetidas ao estresse por ferro e sua descrição funcional.

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
Relacionados ao Metabolismo de carboidratos							
12	gi 57283874	Os01t0899425-00	76	11	19	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
51	gi 115468792	Os01t0899425-00	56	9	19	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
57	gi 1552966	Os01t0758300-01	53	5	17	Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme (EC 4.1.1.31) (PEPCase).	GO:0008964/ GO:0003824
65	gi 222635832	Os06t0594100-01	61	9	33	Crotonase, core domain containing protein.	GO:0003824
74	gi 218185029	Os03t0141200-01	48	7	20	Similar to Beta-amylase PCT-BMYI (EC 3.2.1.2).	GO:0016161/ GO:0003824/ GO:0043169
81	gi 125559927	Os08t0113100-01	71	10	30	Similar to Fructokinase (Fragment).	
93	gi 57283874	Os01t0899425-00	71	11	19	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
108	gi 57283874	Os01t0899425-00	98	15	24	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
109	gi 115459078	Os04t0486600-01	66	11	23	Similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3 (EC 1.2.1.12).	GO:0004365/ GO:0051287/ GO:0003824/ GO:0008943
111	gi 227904570	Os01t0899425-00	63	8	16	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
163	gi 115468792	Os01t0899425-00	94	11	20	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
171	gi 115451911	Os03t0248600-01	48	7	10	Similar to Enolase 2 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 2) (2-phospho- D-glycerate hydro-lyase 2).	GO:0004634
180	gi 3914590	Os12t0291400-01	48	4	17	Similar to Petunia ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA (clone pSSU 51), partial cds. (Fragment)	GO:0016984

Tabela 6 - Continuação

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
185	gi 115448091	Os02t0698000-03	46	8	22	Similar to Phosphoribulokinase, chloroplast precursor (EC 2.7.1.19) (Phosphopentokinase) (PRKase) (PRK).	GO:0005524/ GO:0008974/ GO:0016301
195	gi 62732955	Os11t0171300-01	40	4	17	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor (EC 4.1.2.13) (ALDP)	GO:0003824/ GO:0004332
256	gi 75225211	Os03t0136900-01	44	10	8	Similar to Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Aconitase).	GO:0051539
319	gi 115480571	Os09t0553200-01	138	16	42	Similar to UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9) (UDP-glucose pyrophosphorylase) (UDPGP) (UGPase).	GO:0016779
324	gi 115468792	Os01t0899425-00	49	8	17	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
363	gi 463486	Os10t0563700-01	66	10	16	Similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit.	GO:0016984/ GO:0005506/ GO:0009055/ GO:0020037
373	gi 786178	Os01t0905800-03	69	9	23	Aldolase C-1.	GO:0004332/ GO:0003824
Relacionadas ao transporte na célula							
10	gi 218185994	Os06t0128300-02	52	7	21	Similar to STA1 (STAR1K 1); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances.	GO:0000166/ GO:0017111/ GO:0005524/ GO:0016887
176	gi 89280711	Os01t0711000-01	67	11	22	Similar to Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 2 (EC 3.6.3.14) (V-ATPase B subunit 2) (Vacuolar proton pump B subunit 2).	GO:0016820/ GO:0046933/ GO:0046961
366	gi 91214148	Os01t0711000-01	81	9	20	Similar to Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 2 (EC 3.6.3.14) (V-ATPase B subunit 2) (Vacuolar proton pump B subunit 2).	GO:0016820/ GO:0046933/ GO:0046961
388	gi 218185994	Os06t0128300-02	52	7	25	Similar to STA1 (STAR1K 1); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances.	GO:0000166/ GO:0017111/ GO:0005524/ GO:0016887

Tabela 6 - Continuação

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
Relacionados a Síntese de ATP							
128	gi 115447399	Os02t0625500-01	90	12	39	Similar to Adenosine kinase-like protein (Fragment).	GO:0004001
145	gi 32563430	Os01t0685800-01	48	4	35	Similar to ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14).	GO:0008553/ GO:0046933/ GO:0016820/ GO:0046961/ GO:0000166/ GO:0017111
376	gi 6815115	Os01t0685800-01	67	13	27	Similar to ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14).	GO:0008553/ GO:0046933/ GO:0016820/ GO:0046961/ GO:0000166/ GO:0017111
392	gi 26245403	Os10t0563700-01	50	4	25	Similar to Nucleoside diphosphate kinase I (EC 2.7.4.6) (NDK I) (NDP kinase I) (PP18).	GO:0004550/ GO:0005524
Relacionadas a transdução de sinais							
204	gi 115478294	Os09t0272900-01	56	4		Similar to Skp1 (Fragment).	GO:0005515
223	gi 195655573	Os01t0962400-01	50	3	34	Ubiquitin-like, Ufm1 domain containing protein.	
Relacionadas a atividade REDOX							
5	gi 115469590	Os06t0684000-02	56	11	18	Similar to External rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase.	GO:0005509/ GO:0016491/ GO:0050660
22	gi 218201418	Os08t0507702-01	50	4	20	Cytochrome P450 family protein.	GO:0004497/ GO:0005506/ GO:0020037/ GO:0009055
44	gi 115469590	Os06t0684000-02	53	13	20	Similar to External rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase.	GO:0005509/ GO:0016491/ GO:0050660
229	gi 115452361	Os03t0287900-01	44	4	17	Similar to Protein disulfide isomerase.	
247	gi 37654895	Os06t0115400-01	82	9	36	Similar to Superoxide dismutase [Fe], chloroplast (EC 1.15.1.1) (Fragment).	GO:0004784/ GO:0046872
250	gi 6840824	Os06t0115400-01	58	7	21	Similar to Superoxide dismutase [Fe], chloroplast (EC 1.15.1.1) (Fragment).	GO:0004784/ GO:0046872
218	gi 125539568	Os02t0503900-01	46	5	9	Cytochrome P450 family protein.	GO:0004497/ GO:0005506/ GO:0020037/ GO:0009055

Tabela 6 – Continuação

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
315	gi 47169163	Os06t0107700-01	74	12	32	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor (EC 1.18.1.2) (FNR).	GO:0009055/ GO:0016491/ GO:0004324/ GO:0050660/ GO:0050661
Fatores de Transcrição							
4	gi 15239847	Os03t0831200-01	54	4	20	Similar to GATA transcription factor 19.	GO:0003700/ GO:0008270/ GO:0043565
190	gi 5764199	Os07t0605200-01	50	5	34	MADS box transcription factor 18 (OsMADS18) (MADS box protein 2) (MADS box protein 28) (FDRMADS7).	GO:0003700/ GO:0043565
Defesa							
224	gi 108947210	Os06t0693100-01	43	4	19	NB-ARC domain containing protein.	GO:0005524
249	gi 48475256	Os05t0202800-00	45	3	22	Similar to Metallothionein-like protein 3B.	
253	gi 115468698	Os07t0601900-01	41	5	26	Similar to NADPH HC toxin reductase (Fragment).	GO:0005488
265	gi 115483060	Os10t0528300-01	55	7	27	Tau class GST protein 4	
369	gi 152013376	Os07t0687200-02	45	4	30	Calmodulin (CaM).	GO:0005509
Transposons							
24	gi 22857583	Os08t0215200-01	50	11	12	Transposon, En/Spm-like domain containing protein	
177	gi 22857583	Os08t0215200-01	58	11	13	Transposon, En/Spm-like domain containing protein.	
380	gi 20270075	Os08t0208400-01	47	8	12	Transposon, En/Spm-like domain containing protein.	
Relacionadas a Ácidos Nucleicos							
70	gi 115475163	Os08t0192900-01	58	9	18	Nucleotide-binding, alpha-beta plait domain containing protein.	GO:0000166/ GO:0003676
79	gi 222612692	Os01t0967700-01	61	24	16	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein.	GO:0003676
150	gi 110288699	Os01t0930300-01	41	4	37	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein.	GO:0003676
158	gi 222628516	Os04t0453500-01	51	7	61	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein.	GO:0003676
159	gi 38347001	Os04t0453500-01	66	6	50	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein	GO:0003676
365	gi 16905189	Os08t0164800-01	56	8	11	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase) domain containing protein.	GO:0003723/ GO:0003964

Tabela 6 - Continuação

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
384	gi 222612692	Os01t0967700-01	58	20	14	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein.	GO:0003676
408	gi 222628516	Os04t0453500-01	50	7	61	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase), related domain containing protein	GO:0003676
Outras							
7	gi 115481370	Os10t0191300-01	44	3	22	Similar to PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a) precursor.	
40	gi 108706511	Os03t0180400-02	84	10	35	Proteasome subunit alpha type 6 (EC 3.4.25.1) (20S proteasome alpha subunit A) (20S proteasome subunit alpha-1).	GO:0004175/ GO:0004298
66	gi 125545841	Os07t0478232-00	62	7	37	Similar to H0815C01.6 protein.	
76	gi 125554588	Os06t0221200-01	157	18	48	Similar to Annexin p33/*Hypothetical protein OsI_22198	GO:0005509/ GO:0005544
125	gi 115448531	Os02t0735200-02	60	10	27	Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2) (Glutamate--ammonia ligase) (Clone lambda-GS28).	GO:0004356/ GO:0003824
126	gi 218187528	Os01t0150800-01	40	5	20	Protein-tyrosine phosphatase-like, PTPLA domain containing protein.	
135	gi 125545841	Os07t0478232-00	56	7	37	Similar to H0815C01.6 protein.	
142	gi 218187528	Os01t0150800-01	49	7	20	Protein-tyrosine phosphatase-like, PTPLA domain containing protein.	
193	gi 164460286	Os11t0517350-00	43	5	12	Similar to Maturase K (Fragment).	
216	gi 218187528	Os01t0150800-01	58	6	25	Protein-tyrosine phosphatase-like, PTPLA domain containing protein.	
226	gi 115477469	Os08t0531000-01	135	18	28	Similar to Diphosphonucleotide phosphatase 1 precursor.	GO:0003993/ GO:0046872/ GO:0016787
228	gi 125550886	Os05t0153300-00	56	5	8	Lipase, class 3 family protein.	GO:0004806
231	gi 116309474	Os04t0353600-01	41	4	19	Similar to OSIGBa0092G14.1 protein.	GO:0005488
239	gi 125570704	Os01t0535900-01	47	4	17	tRNA (guanine-N-7) methyltransferase domain containing protein.	GO:0008176
Sem função definida							
16	gi 115446503	Os02t0533700-01	43	4	21	Conserved hypothetical protein.	
32	gi 222628444	Os01t0519700-00	41	4	33	Hypothetical conserved gene/*OsJ_13945	GO:0008270
56	gi 50726232	**NO HITS FOUND	64	7	60	*Hypothetical protein	
62	gi 218200774	Os08t0516900-01	46	3	23	Conserved hypothetical protein/*OsI_28458	
68	gi 222631221	Os07t0457100-00	50	8	27	Hypothetical conserved gene.	GO:0003677
71	gi 23617088	**NO HITS FOUND	42	3	26	*Hypothetical protein	
77	gi 50252847	**NO HITS FOUND	40	3	20	*Hypothetical protein	

Tabela 6 - Continuação

Spot	Acesso NCBI ^{nr}	Acesso RAP-DB ^{***}	Score (a)	Match (b)	Cov (%) (c)	Descrição Banco de Dados ****(d)	Gene Ontology Função Molecular ^(e)
82	gi 125536674	Os09t0322800-00	54	7	17	Hypothetical conserved gene.	GO:0005524/ GO:0005515/ GO:0000166/ GO:0017111/ GO:0031072
132	gi 37572967	**NO HITS FOUND	57	7	54	*Hypothetical protein	
149	gi 77550848	**NO HITS FOUND	49	5	34	*Hypothetical protein LOC_Os11g28220	
157	gi 34394067	Os07t0461800-01	46	4	37	Conserved hypothetical protein.	
160	gi 115435260	Os01t0214400-01	49	7	17	Similar to predicted protein.*****	
172	gi 115458740	Os04t0457100-01	42	4	26	Conserved hypothetical protein.	
174	gi 125581322	Os02t0218600-00	52	7	9	Hypothetical conserved gene.	GO:0004713/ GO:0005524/ GO:0004674/ GO:0004842/ GO:0004672
188	gi 50509458	**NO HITS FOUND	51	4	33	*Hypothetical protein	
210	gi 23617088	**NO HITS FOUND	41	4	40	*Hypothetical protein	
211	gi 115472393	Os07t0518200-01	44	3	29	Conserved hypothetical protein.	
221	gi 47900451	Os05t0125100-01	65	6	19	Conserved hypothetical protein.	
238	gi 77550848	**NO HITS FOUND	42	4	31	*Hypothetical protein LOC_Os11g28220	
242	gi 53792901	**NO HITS FOUND	58	4	41	*Hypothetical protein	
368	gi 37572967	**NO HITS FOUND	42	4	39	*Hypothetical protein	
406	gi 15289856	**NO HITS FOUND	45	3	48	*Hypothetical protein	
407	gi 218200774	Os08t0516900-01	41	3	23	Conserved hypothetical protein/*OsI_28458	

Frame = +1 tradução correta do contig;

(a) pontuação dos espectros referente aos íons que identificam peptídeos. Maiores que 40 são considerados como confiáveis.

(b) número de trechos de sequência encontrados para o *contig* que identifica a proteína

(c) porcentagem de cobertura do contig sobre a proteína

(d) identificação putativa através do MASCOT MS/MS *Ion Search*;

(e) função molecular segundo o Gene Ontology. <http://amigo.geneontology.org/>

* Acesso do NCBI^{nr} quando não foram encontradas sequências correspondentes no RAP- DB

** NO HITS FOUND = Não foram localizadas identificações correspondentes ao número de acesso do NCBI^{nr} no RAP-DB

*** Acesso no banco de dados RAP-DB, após os acessos do NCBI^{nr} blastados contra esse banco (exceto *)

**** Descrição proveniente do banco de dados RAP-DB, após *Blast* realizado com os acessos do NCBI^{nr} contra o RAP-DB.

Do total de 93 proteínas identificadas, 21 estão envolvidas ou associadas ao metabolismo de carboidratos.

3.3.1 Vias metabólicas envolvidas

Metabolismo de carboidratos

Na maioria das espécies a sacarose é a principal forma de carboidrato translocado através da planta pelo floema. O amido é uma reserva estável e insolúvel de carboidratos, presente em quase todas as plantas. Tanto o amido como a sacarose são sintetizados a partir da triose fosfato gerada pelo ciclo de Calvin (BECK e ZIEGLER, 1989; TAIZ e ZEIGER, 2004).

A β -amilase é uma enzima que possui como função primária o envolvimento na quebra do amido em plantas (KOSSMANN e LLOYD, 2000). Kaplan e Guy (2004), através da busca em banco de dados, revelaram que *Arabidopsis* contém 9 genes para β -amilase (*BMY1* até *BMY9*). Por razões que permanecem desconhecidas, *BMY1* (*ram1*), responde por mais de 90% da atividade total da β -amilase em células do mesófilo de *Arabidopsis*, é localizado no vacúolo ou em rotas de secreção (MONROE e PREISS, 1990; KAPLAN e GUY, 2004).

Vários estudos demonstraram que a β -amilase é induzida em resposta a estresses abióticos, como frio em *Arabidopsis*, (SEKI et al., 2001; SUNG, 2001), estresse salino e osmótico em cevada e milho (DREIER et al., 1995; DATTA et al., 1999). Porém, quando as raízes de arroz foram submetidas ao estresse por ferro, a proteína β -amilase PCT-BMY1, referente ao *spot* 74 (tab. 6, Fig. 6 e 7), indicou ausência de expressão sob tratamento com FeSO_4EDTA , em relação ao controle do genótipo tolerante. A ausência de expressão do gene *BMY1*, também foi constatada por Kaplan e Guy (2004), quando plantas de *Arabidopsis* foram submetidas a temperaturas extremas de 45°C por 1h e 0°C por 12h, indicando a possível perda de atividade sob estresses abióticos severos. Ainda, Koller et al. (2002), constataram a presença de β -amilase em raízes de arroz (não foram submetidas a nenhum tipo de estresse).

Já o *spot* 319 (tab. 6, Fig. 6 e 7), identificado como UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase (ou UDP-glicose pirofosforilase), mostrou-se presente somente no tratamento com FeSO_4EDTA do genótipo tolerante (Epagri 107) e ausente no controle. Li et al. (2008), evidenciaram em raízes de tomate sob deficiência de ferro

o aumento da expressão dessa enzima. Nas etapas iniciais da glicólise, a sacarose é decomposta nos dois monossacarídeos, glicose e frutose, que podem prontamente ingressar na rota glicolítica (TAIZ e ZEIGER, 2004). Na maioria dos tecidos vegetais, a sacarose sintase, localizada no citosol, é usada para degradar sacarose, combinando sacarose com UDP para produzir frutose e UDP-glicose (TAIZ e ZEIGER, 2004). A UDP glicose-pirofosforilase, então, converte UDP-glicose e pirofosfato (PPi) em UTP e glicose-1-fosfato e, posteriormente, em glicose-6-fosfato. Esta, por ação de uma isomerase é convertida em Frutose-6-fosfato, a qual, por ação de uma fosfofrutoquinase, com gasto energético (ATP), produz então moléculas de trioses fosfato. A reação da fosfofrutoquinase é um dos pontos de controle da glicólise, tanto em plantas como em animais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As frutoquinases participam na catalisação de reações irreversíveis de fosforilação especificamente em açúcares do tipo frutose (PEGO e SMEEKENS, 2000). Fosforilação de hexoses é especialmente importante em plantas onde o uso de fosfatos livres é particularmente complexo (KRUGER, 1997; DAVIES et al., 1997). Lee et al. (2009), observaram um aumento na expressão da enzima sob estresse por frio em raízes de arroz. Porém, tanto para as plantas da cultivar tolerante como a sensível a toxidez por ferro, as plantas quando submetidas ao estresse, apresentaram ausência da proteína em relação ao controle (*spot* 81, tab. 6, Fig. 6, 7, 8 e 9).

Assim, essas duas enzimas estão relacionadas tanto com o metabolismo da sacarose, bem como com a glicólise. A β -amilase, também está relacionada à glicólise, já que o metabolismo do amido também fornece substrato para as reações glicolíticas.

A enzima aldolase atua na glicólise, podendo estar presente em cloroplastos e no citosol. Sua atuação em nível de citosol está relacionada à síntese e degradação de sacarose. Os *spots* 195 e 373 (tab. 6, Fig. 6, 7, 8 e 9), estão relacionados à enzima aldolase e apresentaram ausência de expressão nas raízes quando a planta foi submetida ao estresse por ferro. Li et al. (2008), detectaram a redução da expressão dessa enzima em raízes de tomate sob deficiência de ferro, porém não ausentes. Konishi et al. (2004) detectaram o aumento da expressão dessa enzima em raízes de arroz tratadas com giberelina, relacionando a síntese da proteína ao crescimento das raízes. A aldolase é abundantemente acumulada em raízes de arroz, especialmente na região apical (KONISHI et al., 2004).

Também na via glicolítica, a enzima enolase foi detectada, referente ao *spot* 171 (tab. 6, Fig. 6 e 7), onde houve redução de 2,74 vezes na expressão da enzima para as raízes da cultivar Epagri 107 quando submetidas ao estresse por ferro. Quando comparados os controles das cultivares sensível e tolerante, a expressão na cultivar tolerante é 1,51x maior em relação a cultivar sensível. Bona et al. (2007), detectaram redução da expressão da enolase em raízes de *Cannabis sativa* submetidas ao estresse por cobre. A enolase é uma proteína multifuncional e em estudos proteômicos de plantas tem sido relatada como uma proteína responsiva a vários estresses ambientais, como estresse salino, frio e seca (YAN et al., 2005; BONA et al., 2007; DEGAND et al., 2009). Gomes et al. (2006), mostraram uma modificação pós-traducional em resíduos de arginina e lisina que reagiram com moléculas de carbonil da proteína enolase, exercendo profundo efeito na sua função, causando perda de atividade glicolítica desta enzima. Em células fotossinteticamente não ativas a glicólise possui um papel preponderante no metabolismo energético. Van der Straeten et al. (1991), analisando atividade enzimática e RNA mensageiro em tomate e *Arabidopsis* demonstrou que a expressão da enolase é prevalente em raízes em relação a tecidos verdes o que sugere uma alta demanda de energia via glicólise nesses órgãos.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 109, tab. 6, Fig. 6 e 7), também está relacionada à via glicolítica, atuando no citosol, na redução do NAD^+ a NADH. O *spot* também apresentou redução na abundância relativa quando submetida ao estresse por ferro em 4,1x na cultivar tolerante e 2x na cultivar sensível, sendo que a abundância relativa do controle da cultivar sensível foi menor que da tolerante, mostrando maior expressão já no controle da cultivar tolerante. O excesso de ferro potencializa o estresse oxidativo, com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Hancock et al. (2005) demonstraram que a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é inibida na presença de altas concentrações do peróxido de hidrogênio em extrato protéico de *Arabidopsis* e relataram a possibilidade desta e de outras enzimas do metabolismo energético estarem envolvidas em processos metabólicos diferentes, ainda desconhecidos.

As enzimas identificadas, envolvidas no processo de obtenção de energia pelas raízes, foram drasticamente afetadas em sua expressão, quando submetidas ao tratamento com FeSO_4EDTA . Isso indica que raízes sob toxidez por ferro têm sua

aquisição de energia comprometida, o que é essencial para o crescimento e desenvolvimento das mesmas. Ou ainda, a presença de ROS pode contribuir para redução e inibição da expressão de diversas proteínas no organismo pelo estresse oxidativo causado pelo excesso de ferro.

O *spot* 256 foi identificado para a proteína aconitase que também intermedia o processo de respiração na transformação de metabólitos. Porém sua expressão também está relacionada ao estresse oxidativo. A aconitase é uma enzima encontrada tanto na matriz mitocondrial como também no citosol, sendo que sua forma citosólica participa do ciclo do glioxilato em células vegetais (HAYASHI et al., 1995) e a isoforma mitocondrial é componente do ciclo dos ácidos tricarboxílicos onde cataliza a isomerização reversível do citrato em isocitrato (MOEDER et al., 2007). Nesse trabalho, o *spot* relacionado à enzima, foi presente no controle da cultivar tolerante (Epagri 107) e da cultivar sensível (BR-IRGA 410) e ausente no tratamento (tab. 6, Fig. 6, 7 e 8). A média de abundância relativa dos *spots* dos controles foi semelhante, não mostrando diferença de expressão entre esses controles. Navarre et al. (2000) identificaram uma aconitase de tabaco sensível à inativação por óxido nítrico e por ROS, convertendo essa proteína em uma IRP (*Iron responsive element*). Basilion et al. (1994) mostraram que existe uma aconitase citosólica que contém um domínio funcional IRP (*Iron-regulatory-protein*), que interage com IREs (*Iron-responsive element*). Esse domínio está presente em aconitases que se ligam a mRNAs que contêm elementos responsivos a ferro (IRE), controlando dessa forma a expressão de genes relacionados à homeostase do ferro dentro da célula. Outro fato importante seria relacionado ao envolvimento de aconitases em eventos de morte celular programada (PDC), porém pouco se sabe realmente sobre o papel na PDC (MOEDER et al., 2007). As aconitases possuem domínios ferro-enxofre que seriam perdidos sobre condições de estresses oxidativos, aumentando Fe^{+2} livre no citosol que pode reagir com peróxido de hidrogênio formando radicais livres induzindo a morte celular programada (NAVARRE et al., 2000). Este fato sugere que a ausência da aconitase em raízes de arroz poderia estar relacionada também com a proteção contra o aumento na produção de radicais livres pela célula sob condições de toxidez por ferro.

Para a enzima PEP carboxilase, o mesmo comportamento foi apresentado, pois o *spot* 57 (tab. 6, Fig. 6, 8 e 9) se mostrou presente nas raízes do controle da cultivar tolerante ausente no tratamento. Essa enzima está relacionada a uma das

vias que suplementa o ciclo de Krebs como à síntese de malato que é oxidado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e posterior fornecimento de esqueletos carbônicos para assimilação de nitrogênio.

Também relacionada à assimilação de nitrogênio pela planta, mais precisamente assimilação de amônio, está a enzima glutamina sintetase identificada pelo *spot* 125 (tab. 6, Fig. 6 e 7) a qual apresentou redução de 1,95x na sua expressão em raízes da cultivar tolerante quando submetida ao estresse por ferro. Essa enzima realiza a combinação do amônio com o glutamato para formar a glutamina. As plantas possuem duas classes de glutaminas sintetases, uma no citosol e outra nos plastídeos das raízes e cloroplastos da parte aérea. As formas citosólicas são expressas durante a germinação de sementes ou no feixe vascular das raízes e parte aérea, produzindo a glutamina para o transporte de nitrogênio intracelular. A glutamina sintetase nos plastídeos das raízes forma o nitrogênio amida que é consumido localmente (LAM et al., 1996; TAIZ e ZEIGER, 2004). Tanto os níveis de carboidratos quanto os de luz alteram a expressão das formas dessa enzima presente nos plastídeos (TAIZ e ZEIGER, 2004). Lee et al. (2010) constataram drástica redução na atividade dessa enzima sob tratamento com excesso de cádmio em folhas. Devido o glutamato ser requerido na biossíntese da glutathione necessária ao processo de detoxificação do cádmio, essa redução na expressão da enzima pode ser explicada (GILLET et al., 2006). O mesmo processo pode estar relacionado à detoxificação de ferro nas raízes de plântulas de arroz.

Do total de 12 *spots* relacionados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos, 9 foram identificados para a enzima Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase). A Rubisco é a responsável pela entrada de CO₂ no Ciclo de Calvin pela reação com a ribulose-1,5- bifosfato. A enzima também possui uma atividade oxygenase, na qual o O₂ compete com o CO₂ pelo substrato comum ribulose-1,5- bifosfato (TAIZ e ZEIGER, 2004). A oxigenação é a reação primária da fotorrespiração. A fotossíntese e a fotorrespiração ocorrem em sentidos opostos, portanto a oxigenação limita a fixação líquida de CO₂. Porém, o estudo foi realizado através de extrato protéico de raízes, as quais não estão diretamente relacionadas à fotossíntese, ou seja, a enzima não é relacionada aos processos metabólicos que ocorrem na raiz. No presente trabalho, várias isoformas da subunidade maior da Rubisco (*spots* 12, 51, 93, 108, 111, 163, 324 e 363) (tab. 6, Fig. 6, 7, 8 e 9) foram detectadas e uma subunidade menor da Rubisco (*spot* 180), sugerindo uma contribuição para o papel

antioxidativo em outras vias não fotossintéticas como em plastídeos fotossinteticamente não ativos. A maioria dos *spots* relacionados à enzima mostrou-se presente no controle das raízes da cultivar tolerante Epagri 107 e ausente sob tratamento (12, 51, 93, 111, 163, 363 e 180). O *spot* 108 foi o único que apresentou abundância relativa sob tratamento, porém a redução da abundância foi de 3,1x em relação ao controle. Já o *spot* 324 foi a única Rubisco presente no tratamento da cultivar e ausente no controle. Quatro das subunidades da Rubisco, além de estarem presentes no controle da cultivar Epagri 107, mostraram presença no tratamento com FeSO₄EDTA da cultivar sensível BR-IRGA 410.

A enzima fosforibuloquinase está diretamente relacionada à formação do substrato de ação da rubisco, a ribulose-1,5-bifosfato, através da adição de fosfato inorgânico (Pi) na molécula de ribulose-5-fosfato. O *spot* 185, referente a essa enzima apresentou comportamento semelhante à maioria das rubiscos identificadas, pois foi presente no controle da cultivar tolerante Epagri 107 e ausente quando submetida ao tratamento (tab. 6, Fig. 6 e 7). Essa enzima também deve estar relacionada à formação do substrato presente em outra via metabólica das raízes.

A regulação negativa, ou a ausência das diversas enzimas quando as raízes são submetidas ao estresse, pode estar associado à necessidade de deslocamento de compostos produzidos anteriormente a sua posição na rota metabólica, para outras vias.

Os produtos da rota de degradação do amido são direcionados a duas principais rotas, uma é a glicólise para degradação adicional e a outra é o ciclo do ascorbato (LI et al., 2008). O ascorbato age no metabolismo das células como doador de elétrons e tem várias funções no desenvolvimento e defesa da planta, especialmente em vias reguladas pelo sistema redox (NOCTOR e FOYER, 1998; ZAHARIEVA et al., 2003; KIDDLE et al., 2003; LI et al., 2008). Um aumento no nível de ascorbato em resposta à deficiência de ferro foi observado em raízes de beterraba-açucareira (ZAHARIEVA et al., 2003) e de tomate (LI et al., 2008) e no presente trabalho algumas enzimas detectadas estão envolvidas no metabolismo do ascorbato e são apresentadas a seguir.

Relacionados à síntese de ATP

A ATP sintase mitocondrial é um complexo enzimático localizado na membrana interna da mitocôndria que contém um sítio catalítico para conversão de

ADP e Pi em ATP. Isso ocorre através de um gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, realizando a fosforilação oxidativa (BOYER, 1997; STOCK et al., 1999; SOARES, 2008). A subunidade β da ATP sintase, para o *spot* 145, mostrou uma redução de 4,3x na abundância relativa para a cultivar sensível sob condições de estresse (tab. 6, Fig. 8 e 9). Já o *spot* 376, com a mesma identificação, foi presente no controle da cultivar tolerante e ausente quando submetida ao estresse por ferro (tab. 6, Fig. 6 e 7). O estresse causado pelo ferro pode causar um declínio na taxa respiratória, diminuindo a demanda de ATP para a respiração.

Relacionadas ao transporte na célula

Para a ATP sintase vacuolar (V-ATPase), subunidade B, os *spots* 176 e 376 foram presentes no controle da cultivar tolerante e ausentes no tratamento com FeSO₄EDTA (tab. 6, Fig. 6 e 7). A V-ATPase difere estrutural e funcionalmente da ATPase da membrana plasmática. Elas transportam prótons do citoplasma para o vacúolo (TAIZ e ZEIGER, 2004). Sasaki et al. (1998) salientam que o vacúolo possui uma importante função na manutenção intracelular da concentração de ferro. Yang et al. (2003), indicam também o envolvimento dessa enzima com o ferro. Lee et al. (2010), apontam a importância do seqüestro de cádmio pelo vacúolo para detoxificação desse elemento em folhas e raízes de arroz.

Até o momento, poucas proteínas envolvidas no transporte de ferro através das membranas das organelas de células vegetais têm sido caracterizadas (BRIAT et al., 2007). O efluxo de ferro em mitocôndrias de *Arabidopsis* poderia ocorrer através de transportadores tipo ABC, proteína STARIK 1 (STA1), um homólogo da levedura ATM1p (ABC *Transporter Mitochondria 1 protein*), que está localizado na membrana mitocondrial interna (KUSHNIR et al., 2001). ATM1p é necessária para a montagem de centros Fe-S em proteínas citosólicas e é projetado para exportação de centros que são complexados para compostos não identificados até o momento, a partir da matriz mitocondrial para o citoplasma (LILL e KISPAL, 2001). Os *spots* 10 e 388 estão relacionado à proteína STA 1. No *spot* 10, há uma redução na abundância relativa de 6,9x sob tratamento na cultivar tolerante e apenas 1,4x de redução na abundância do *spot* quando a cultivar sensível foi submetida ao tratamento (tab. 6, Fig. 6, 7, 8 e 9). Já para o *spot* 388 não houve detecção no tratamento da cultivar tolerante e também não houve sua detecção no controle da

cultivar sensível. Isso sugere uma redução no transporte de ferro por essa proteína quando o ferro estiver presente em excesso. Porém, como os mecanismos e compostos relacionados a esses transportadores ainda não são completamente elucidados, não há como inferir sobre a atuação do ferro sobre esse transportador.

Relacionadas à atividade Redox

Em células vegetais a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE) é um importante local de produção de ROS. Além dos complexos I-IV, a CTE mitocondrial possui enzimas dissipadoras de energia sendo uma oxidase alternativa e duas NAD(P)H desidrogenases insensíveis a rotenona, uma em cada lado da membrana interna: NAD(P)H desidrogenase na superfície externa e NAD(P)H desidrogenase na superfície interna. Por possuírem dependência de Ca^{2+} , as duas NAD(P)H desidrogenases podem ser ativadas quando a célula da planta estiver estressada (MOLLER, 2001). O *spot* 44 (tab. 6, Fig. 6 e 7), referente a uma NAD(P)H Desidrogenase externa insensível a rotenona, apresentou aumento na abundância relativa dessa enzima em 3x na cultivar sensível, sob estresse por ferro. Assim, é possível relacionar a presença da proteína diante das condições estressantes provocadas pelo excesso de ferro. Para a cultivar tolerante o aumento na abundância relativa foi de 2,34x em relação ao controle. Já para o *spot* 5, conferido a mesma enzima, houve redução de 5,9x na abundância relativa do *spot* quando submetida ao tratamento, para a cultivar tolerante (tab. 6, Fig. 6 e 7).

As superóxidos dismutases (SODs) constituem uma família de metaloenzimas que catalisam a dismutação de radicais ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Ferro superóxidos dismutases (FeSODs) são expressos somente em alguns procariotos e plantas (MUÑOZ, 2005) e protegem as células de estresses oxidativos, evitando danos. No entanto, os *spots* 247 e 250, referentes à FeSOD, foram presentes no controle da cultivar tolerante e ausentes no tratamento, quando seria esperado o contrário. Ainda, o *spot* 247 se mostrou presente, também no tratamento da cultivar sensível, porém somente quando comparada com o tratamento da cultivar tolerante, que não apresentou detecção dessa enzima.

O *spot* 315 corresponde a Ferredoxina-NADP⁺ redutase, que foi detectada apenas nas raízes da cultivar tolerante, quando submetida ao estresse (tab. 6, Fig. 6 e 7).

Após a redução pelo fotossistema I (PSI) em cloroplastos e cianobactérias, a ferredoxina transportadora (Fd), de baixo potencial solúvel, passa seus elétrons para uma série de compostos associados solúveis que estão envolvidos em muitos processos metabólicos, como a assimilação do enxofre e do nitrogênio, redução de NADP^+ , regulação do ciclo de Calvin e cadeia transportadora de elétrons (CASSAN et al., 2005). Entre os compostos associados da Fd, a ferredoxina- NADP^+ redutase (FNR) é bastante abundante. Esta enzima catalisa a redução do NADP^+ a NADPH, utilizando os elétrons fornecidos pela ferredoxina reduzida. O sistema redox FNR / Fd também pode funcionar no sentido inverso, usando NADPH para reduzir a Fd. Isso ocorre em tecidos não fotossintetizantes de plantas (ONDA et al., 2000; ALIVERTI et al., 2001) e em heterocistos de cianobactérias (WEBER-MAIN et al., 1998), onde isoformas possuem potencial redox que favorecem o fluxo reverso de elétrons (CASSAN et al., 2005). Fd e FNR também foram encontradas em apicoplastos (VOLLMER et al., 2001) onde podem funcionar no sentido inverso com a Fd reduzida, possivelmente envolvidos na biossíntese de centros ferro-enxofre (Fe-S) (THOMSEN-ZEIGER et al., 2004). Se for reduzida pelo PSI ou pela FNR / NADPH, a Fd também pode estar envolvida em processos como a redução de prótons de hidrogênio em algumas algas verdes, catabolismo da clorofila, biossíntese de fitocromos, entre outros (CASSAN et al., 2005).

Essa proteína pode estar relacionada à tolerância da cultivar Epagri 107 a toxidez por ferro, através do sistema inverso de atuação.

A citocromo P450 é a família das hemoproteínas, uma importante monooxigenase vegetal. As monooxigenases adicionam um dos átomos do oxigênio molecular a um composto de carbono; o outro átomo de carbono é convertido em água. As monooxigenases possuem a capacidade de realizar simultaneamente a reação de oxigenação e de oxidase (redução do oxigênio a água). A reação monooxigenase também necessita de um substrato reduzido (NADH ou NADPH) como um doador de elétrons. As citocromo P450, catalisam a hidroxilação do ácido cinâmico em ácido p-cumárico. O oxigênio é primeiramente ativado, por ser combinado com o átomo de ferro do grupo heme (TAIZ e ZEIGER, 2004). Dois *spots* foram identificados como Citocromo P450 (*spots* 22 e 218). O *spot* 22 apresentou apenas diferença significativa de abundância entre os controles das cultivares em estudo, sendo 4,4x mais abundante na cultivar tolerante. Já o *spot* 218, foi presente no tratamento da cultivar sensível e no controle da tolerante (tab. 6, Fig. 6, 7, 8 e 9).

Fatores de transcrição

Fatores tipo-GATA são fatores de transcrição, que regulam ou estão previstos para regular a expressão dos genes envolvidos na produção de sideróforos, transporte de sideróforos e de ferro livre. São fatores de transcrição caracterizados por motivos conservados de Dedo de Zinco e por sua capacidade de se ligar a elementos tipo 5'-GATA-3. A resposta dos fatores tipo GATA ao ferro reprimem a transcrição de seus genes alvo em resposta ao aumento de ferro (RUTHERFORD e BIRD, 2004). Esse fato é evidenciado pela presença da expressão desse fator de transcrição no controle da cultivar Epagri 107 (tolerante), indicado pelo *spot* 4, o qual não está presente na cultivar, quando submetida ao estresse por ferro (tab. 6, Fig. 6 e 7).

Transposons

Os transposons identificados nesse trabalho referem-se aos *spots* 24, 177 e 380, dos quais dois (24 e 380) foram presentes no controle da cultivar tolerante e ausentes no tratamento e o *spot* 177 teve sua expressão reduzida quando a planta foi submetida ao tratamento. De forma geral, os elementos transponíveis, conhecidos por seu efeito aditivo (*Enhancer-En*) ou Supressor (*Supressor-mutator* – *Spm*) podem atuar como elementos autônomos e não-autônomos. Como autônomos desencadeiam importante função no processo de transposição. Os elementos não autônomos são deleções derivadas de *En/Spm* defeituosos ou são conhecidos como elementos inibidores e tem sua ação dependente dos elementos autônomos. Os elementos autônomos podem suprimir a expressão de certos genes nos quais pequenos elementos inibidores são inseridos na região transcrita (FREY et al., 1990). Na ausência dos *En/Spm*, os genes são expressos, pois a sequência do inibidor é removida. Assim, a ausência desses elementos pode desencadear a expressão de genes envolvidos no metabolismo do ferro e/ou no processo de defesa da planta quando o tratamento foi aplicado.

Defesa

Metalotioninas de plantas estão envolvidas na tolerância a metais (MOISYADI e STILES, 1995), pois tem a capacidade de se ligar a metais como ferro, formando quelados. Porém, os resultados apresentados não mostram relação na conferência

de tolerância à toxidez por ferro, pois o *spot* 249 foi presente no controle da cultivar tolerante e no tratamento da cultivar sensível (tab. 6, Fig. 6 e 9).

A glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas detoxificadoras, principalmente citosólicas, que detoxificam compostos naturais e exógenos através da conjugação com a glutathione, importante agente redutor. Essa molécula alivia a toxicidade química em plantas pela reação com GST e o conjugado pode ser transportado para o vacúolo ou apoplasto (MOHSENZADEH et al., 2009). Existem 7 classes de GST para plantas, entre elas a TAU. As GSTs das classes Phi e TAU, as quais são específicas de plantas e as mais abundantes, possuem uma importante função no desenvolvimento das plantas, tolerância a estresses e no metabolismo secundário. Os membros da família Tau, se sobrepõem no desempenho de funções, diferindo quanto à especificidade do substrato, promovendo a planta uma ampla gama de proteção, embora os mecanismos moleculares para várias funções em grande parte são ainda desconhecidos (MOHSENZADEH et al., 2009). A função da GST é claramente evidenciada pelo aumento de cerca de 11x na expressão dessa proteína pelo *spot* 265 na cultivar tolerante Epagri 107, quando as plantas foram submetidas ao estresse por ferro (não havendo expressão dessa proteína no tratamento da cultivar sensível). Assim, é possível relacionar a presença dessa proteína em raízes de arroz como um possível mecanismo de tolerância a toxidez por ferro da cultivar Epagri 107 (tab. 6, Fig. 6 e 7).

A maioria das enzimas que apresentaram diferença de expressão está relacionada à aquisição de energia pela planta. O metabolismo, principalmente de carboidratos é profundamente alterado sob condições de estresse por ferro. O estresse parece provocar a formação de um grande número de espécies reativas de oxigênio que são altamente prejudiciais às enzimas envolvidas devido ao estresse oxidativo provocado. As demais proteínas identificadas, também não aparentam relação direta com o estresse provocado. Proteínas relacionadas à defesa da planta são proteínas identificadas como protetoras em relação a doenças, não mostrando a relação com o estresse abiótico provocado. Ainda, existe um grande número de proteínas sem função conhecida (24) que podem estar associadas ao metabolismo do ferro e até mesmo ao mecanismo de tolerância apresentado pela cultivar Epagri 107.

De uma forma geral, a grande maioria das enzimas identificadas está relacionada à respiração vegetal, sendo a maioria inibidas ou tendo redução na

expressão sob efeito do tratamento, evidenciando profundas alterações nos processos de glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de elétrons. Outra possibilidade, já que as proteínas com mudança de expressão estão relacionadas a processos bastante complexos e amplos em nível de metabolismo vegetal, é que parte do mecanismo de tolerância apresentado pela cultivar não esteja presente na raiz, ou melhor, tenha maior relevância na parte aérea da planta onde o ferro em excesso pode ser, por exemplo, complexado através das ferritinas.

O tratamento com excesso de ferro provocou profundas alterações metabólicas no sistema radicular da planta, que podem estar diretamente relacionadas ao metabolismo do ferro ou ainda, por motivos desconhecidos, desencadear processos relacionados a outros estresses abióticos.

Lasanthi-Kudahettige et al. (2007), evidenciaram a redução de expressão de proteínas como Citocromo P450 e PEP carboxilase sob anoxia em arroz, demonstrando que o tratamento com ferro pode influenciar nesse processo, ou ainda, alterações provocadas pelo tratamento no metabolismo dos carboidratos e nas outras rotas metabólicas afetadas poderia desencadear um processo abiótico estressante no sistema radicular da plântula.

4. CONCLUSÕES

A cultivar Epagri 107 apresenta um maior número de proteínas expressas nas raízes do que a cultivar BR-IRGA 410, onde a maioria é inativada ou tem sua expressão reduzida a níveis não detectáveis quando a planta é submetida ao estresse por ferro.

Um total de 93 proteínas foram identificadas com diferença de expressão, o que permitiu a relação da maioria dessas proteínas com função conhecida na espécie.

Grande parte das enzimas identificadas com diferença de expressão sob tratamento está relacionada à respiração vegetal, através da via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de elétrons. Porém, a relação direta da maioria dessas enzimas com o metabolismo do ferro não pode ser completamente elucidada. A proteína glutathione S-transferase (*spot* 265) e o fator de transcrição tipo GATA (*spot* 4) que possuem relação direta com o metabolismo do ferro, foram diferencialmente expressos na cultivar tolerante quando submetida ao estresse. Sua associação com o mecanismo de tolerância necessita, no entanto, ser confirmada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIVERTI, A.; FABER, R.; FINNERTY, C. M.; FERIOLI, C.; PANDINI, V.; NEGRI, A.; KARPLUS, P. A.; ZANETTI, G. **Biochemical and crystallographic characterization of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase from nonphotosynthetic tissues**, *Biochemistry*, v.40, p.14501–14508, 2001.
- ANDERSON, J.; SEILHAMER, L. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v.18, p.533–537, 1997.
- AROSIO, P. e LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, v.33, n. 4, p. 457–463, 2002.
- BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 19. 1991, Balneário Camboriú. *Anais...* Florianópolis: EMPASC, 1991. p.156-159.
- BASILION, J.P.; ROUAULT, T.A.; MASSINOPLE, C.M.; KLAUSNER, R.D.; BRUGESS, W.H. The iron-responsive element binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitases active-site cleft. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v.91, p.574-578, 1994.
- BECANA, M.; MORAN, J. F. e ITURBE-ORMAETXE, I. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection, *Plant and Soil*, The Hague, n. 201, p. 137-147, 1998.
- BECK, E. e ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.40, p.95–118. 1989.
- BELOUCHI, A.; KWAN, T. e GROS, P. Cloning and characterization of OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, v.33, p.1085-1092, 1997.

BIENFAIT, H. F. Regulated redox process at the plasmalemma of plant root cells and their function on iron uptake. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Baltimore, n. 17, p. 73-83, 1985.

BONA, E., MARSANO, F., CAVALETTO, M., BERTA, G., Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. **Proteomics**, 2007, 7, 1121-1130.

BOYER, P.D. The ATPsynthase: A splendid molecular machine. **Annual Review of Biochemistry**, v.66, p.717-749, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248–254, 1976.

Briat J.F. e Lobréaux, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2 n.5. p.187–193, 1997.

BRIAT, J. F.; CURIE, C. e GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. v.10, p. 276–282, 2007.

BRIAT, J.F. e LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Plant biology and pathology**, v.322, p.43-54, 1999.

BRIAT, J.F.; FOBIS-LOISY, I.; GRIGNON, N.; LOBRÉAUX, S.; PASCAL, N.; SAVINO, G.; THOIRON, S.; von WIREN, N.; WUYTSWINKEL, O.L. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biology of the cell**, v. 84, n. 1, p. 69-81, 1995.

BUGHIO, N.; YAMAGUCHI, H.; NISHIZAWA, N.K.; NAKANISHI, H.; MORI, S. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1677–1682, 2002.

CASSAN, N.; LAGOUTTE, B.; SÉTIF, P. Ferredoxina-NADP⁺ reductase. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n.28, p. 25960-25972, 2005.

COLANGELO, E.P. e GUERINOT, M.L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.322–330, 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>.

CURIE, C.; ALONSO, J.M.; LE JEAN, M. et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. **Biochemical Journal**, v.347, p.749–755, 2000.

CURIE, C.; CASSIN, G.; COUCH, D.; DIVOL, F.; HIGUCHI, K.; JEAN M.L.; MISSON, J.; SCHIKORA, A.; CZERNIC, P.; STEPHANE, M. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, v.103, p.1–11, 2009.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S.L.; BRIAT, J.F.; WALKER, E.L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v. 409, p.346-349, 2001.

CURIE, C. e BRIAT, J.F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Reviews of Plant Biology**. v.54, p.183-206, 2003.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H.; Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3 p.117–124, 2000.

DATTA, R.; SELVI, M.T.; SEETHARAMA, N.; SHARMA, R. Stress-mediated enhancement of beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.657–664, 1999.

DAVIES, C.; BOSS, P.K. e ROBINSON, S. P. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**. v.115, p.1155–1161, 1997.

DEGAND, H.; FABER, A-M.; DAUCHOT, N.; MINGEOT, D.; WATILLON, B.; VAN CUTSEM, P.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Proteomic analysis of chicory root identifies proteins typically involved in cold acclimation. **Proteomics**, v.9, p. 2903–2907, 2009.

DREIER, W.; SCHNARRENBURGER, C. e BÖRNER, T. Light- and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: beta-amylases are stress-induced proteins. **Journal of Plant Physiology**, v.145, p.342–348, 1995.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M.L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.93, p.5624-5628,1996.

EMBRAPA Clima Temperado. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-CPACT**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br>.

FREY, M.; REINECKE, J.; GRANT, S.; SAEDLER, H.; GIERL, A. Excision of the En/Spm transposable element of Zea mays requires two element-encoded proteins. **The EMBO Journal**, v.9, n.12, p. 4037-4044, 1990.

FUKUDA, T.; SAITOA, A.; WASAKIB, J.; SHINANOB, J.; OSAKI, M. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. **Plant Science**, v.172, p.1157–1165, 2007.

GILLET, S.; DECOTTIGNIES, P.; CHARDONNET, S.; LEMARE´ CHAL, P. Cadmium response and redoxin targets in Chlamydomonas reinhardtii: a proteomic approach. *Photosynthesis Research*. v. 89, p.201– 211, 2006.

GOMES, A . da S.; SOUSA, R.O.; DIAS, A.D.; MACHADO, M.O.; PAULETTO, E.A. A problemática da toxicidade do Fe em arroz irrigado no RS. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz, 4., **Anais...**Goiânia,CNPAF/EMBRAPA, 1990. p.116.

GOMES, R.A.; MIRANDA, H.V.; SILVA, M.S.; GRACA, G.; COELHO, A.V.; FERREIRA, A.E.; CORDEIRO, C.; FREIE, A.P.; Yeast protein glycation in vivo methylglyoxal: Molecular modification os glycolytic enzymes and heat shock proteins. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.273, p.5273-5287, 2006.

GUERINOT, M. L.The ZIP family of metal transporters, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.190-198, 2000.

GUERINOT, M.L e YI, Y. Iron: nutritious, noxious, and not ready available, **Plant Physiology**, v.104, p.815-820, 1994.

HANCOCK, J.T.; HENSON, D.; NYIRENDA, M.; DESIKAN, R.; HARRISON, J. LEWIS, M.; HUGHES, J.; NEILL, S.J. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.828–835, 2005.

HASHIMOTO, M. e KOMATSU, S. Proteomics analysis of rice seedling during cold stress. **Proteomics**, v.7, 1293–1302, 2007.

HAYASHI, M.; DeBELLIS, L.; ALPI, A.; NISHIMURA, M. Cytosolic aconitase participates in glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. **Plant Cell Physiology**, v.36, p.669-680, 1995.

HELL, R. e STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants, **Planta**. v.216, p. 541-55, 2003.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil, **California Agr. Exp. Stat. Circ.** p. 347, 1938.

INOUE, H.; KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; TAKAHASHI, M.; KAKEI, Y.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p.3470–3479, 2009.

IRGA. O arroz no Rio Grande do Sul. **Lavoura Arrozeira**.-Edição especial. Cachoeirinha, 2010. v. 58, n.452, 44p.

IRGSP, International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p. 793-800, 2005.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; KOBAYASHI, T. et al. Rice plants take P iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} . **The Plant Journal**, v.45, p.335–346, 2006.

KAPLAN, F. e GUY, C. L. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. **Plant Physiology**, v.135, p.1674–84, 2004.

KIDDLE, G.; PASTORI, G. M.; BERNARD, S.; PIGNOCCHI, C. et al., Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.5, p.23–32, 2003.

KOLLER, A.; WASHBURN, M.P.; LANGE, B.M.; ANDON, N.L.; DECIU, C.; HAYNES, P.A.; HAYS, L.; SCHIELTZ, D.; ULASZEK, R.; WEI, J.; WOLTERS, D.; YATES, J.R. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 99, p.11969–11974, 2002.

KONISHI, H.; KITANO, H. e KOMATSU, S. Identification of rice root proteins regulated by gibberellin using proteome analysis. **Plant Cell & Environment**, v. 28, p.328–339, 2005.

KONISHI, H.; YAMANE, H.; MAESHIMA, M.; KOMATSU, S. Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.839–848, 2004.

KOSSMANN, J. e LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**; v.35, p.141–196, 2000.

KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. In Plant Metabolism. Editado por Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lebebvre, D.D. and Layzell, D.B. Longmann, Harlow, p.83–104. UK, 1997.

KUSHNIR, S.; BABIYCHUK, E.; STOROZHENKO, S.; DAVEY, M.W.; PAPENBROCK, J.; DE RYCKE, R.; ENGLER, G.; STEPHAN, U. W.; LANGE, H.; KISPAL, G. et al. A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the Arabidopsis mutant starik. **The Plant Cell**, v.13, p.89-100, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680–685, 1970.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p. 569-593, 1996.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, p. 218–231, 2007.

LEE, D.G.; AHSAN,N.; LEE, S.H.; LEE, J.J.; BAHK, J.D.; KANG K.Y. Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p. 1–11, 2009.

LEE, K.; BAE, D.W.; KIM, S.H.; HAN, H.J.; LIU, X.; HYEONG, C.P.; LIM C.O.; LEE, S.Y.; CHUNG, W.S. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.161–168, 2010.

LI, J.; WU, X.D.; HAO, S.T.; WANG, X.J.; LING, H.Q., Proteomic response to iron deficiency in tomato root. **Proteomics**, v.8, p.2299–2311, 2008.

LILL, R. e KISPAL, G. Maturation of cellular Fe–S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochemistry Science**, v.25, p.352-356, 2001.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibrium in soils**, New York: J. Wiley, 1979. 449 p.

LIUB, H.; ZHANG, J.; CHRISTIE, P.; ZHANG, F. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Science of the total environment*, v.304, p. 361-368, 2008.

MAGALHÃES Jr, A.M.; FADUNDES, P.R.R.; GOMES, A.S.; FRANCO, D.F.; SEVERO, A. Avaliação de Linhagens de Arroz Irrigado quanto à Toxidez por Ferro. In: Arroz Irrigado: resultados de pesquisa do melhoramento genético para tolerância à estresses abióticos, na Embrapa Clima Temperado, 2007/2008. Pelotas:Embrapa Clima Temperado, 2009, p.37-44.. (Documentos, 257). Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_257.pdf

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A. S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A. S; PETRINI J.A.; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. SOARES, R. C.; BENDER, R. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa à toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MESQUITA, R. O.; SOARES, E. A.; RAMOS, H. J.; LOUREIRO, M.E Otimização de método de extração de proteínas de folhas e raízes de soja para análise proteômica. In: Congresso Brasileiro de Soja e Mercosoja, 5. **Anais...**Goiânia: 2009.

MOEDER, W.; Del POZO, O.; NAVARRE, D.A.; MARTIN, G.B.; KLESSIG, D.F. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. **Plant Molecular Biology**, v.63, n.2, p.273-287, 2007.

- MOHSENZADEH, S.; SAFFARI, B. e MOHABATKAR, H. New member of TAU-class glutathione s-transferase from barley leaves. **EXCLI Journal**, v.8, p.190-194, 2009.
- MOISYADI, S. e STILE, J. I. A cDNA Encoding a Metallothionein I-Like Protein from Cofee Leaves (*Coffea Arabica*), **Plant Physiology**, v.107, p.295-296, 1995.
- MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p. 561-591.
- MONROE, J.D. e PREISS, J. Purification of a β -amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. **Plant Physiology**, v.94, p.1033–1039,1990.
- MORI, S. Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.250–53,1999.
- MUÑOZ, I.G.; MORAN, F.M.; BECANA, M.; MONTROYA, G. The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. **Protein Science**, v.14, p.387– 394, 2005.
- NAVARRE, D. A.; WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; NOAD, R.; KLESSING, D.F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. **Plant Physiology**, v.122. p.573-582, 2000.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- NEGISHI, T.; NAKANISHI, H.; YAZAKI, J.; KISHIMOTO, N.; FUJII, F. et al. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fedeficient barley roots. **The Plant Journal**, v.30, p.83–94, 2002.
- NOCTOR, G. e FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.249–279, 1998.
- NOZU, Y.; TSUGITA, A.; KAMIJO, K. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. **Proteomics**, v.6, p.3665–3670. 2006.

OH, S-H.; CHO, S-W.; KWON, T-H.; YANG, M-S. Purification and characterization of phytoferritin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Baltimore, n. 29, p. 540-544. 1996.

ONDA, Y.; MATSUMURA, T.; KIMATA-ARIGA, Y.; SAKAKIBARA, H.; SUGIYAMA, T.; HASE, T. Differential interaction of maize root ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase with photosynthetic and nonphotosynthetic ferredoxin isoproteins. **Plant Physiology**. v.123, p.1037-1045, 2000.

PEGO, J. V. e SMEEKENS, S.C.M. Plant fructokinases: a sweet family get together. **Trends in Plant Science**, v.5, p.531–536, 2000.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy**, v.24, p. 29-96, 1972.

PONNAMPERUMA, F.N.; BRADFIELD, R.; PEECH, M. Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. **Nature**, p.175-265, 1955.

R Development Core Team, **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2006.

RAP-DB, The rice annotation project data base. Disponível em: <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>.

ROBINSON, N.J.; PROCTOR, C.M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferricchelate reductase for iron uptake from soils. **Nature**, v.397, p.694-697,1999.

RUTHERFORD, J.C. e BIRD, A. J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryotic Cell**, v.3, p.1–13, 2004.

SAHRAWAT, K. L. Managing iron toxicity in lowland rice: The role of tolerant genotypes and plant nutrients. In: Rice is life: Scientific perspectives for the 21st century. **Proceedings of the World Rice Research Conference, 2004**, Japan, 452-454, 2004.

SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K.L.; MULBAH, C.K.; DIATTA, S.; DELAUNE, R.D.; PATRICK, W.H. JR; SINGH, B.N.; JONES, M.P. The role of tolerant genotypes and plant nutrients in

the management of iron toxicity in lowland rice. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.126, p.143-146, 1996.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, v.2, p.1131–1145, 2002.

SASAKI, T.; NATALIA, A.; PRONINA, M.; MAESHIMA, I.; IWASAKI, N.; KURAN, S. MIYACHI. Development of Vacuoles and Vacuolar H-ATPase Activity under Extremely High CO₂ Conditions in *Chlorococcum littorale* Cells **Plant biology**, v.1, p.68—75, 1999.

SCHMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. **New Phytologist**, v.14, p.1–26, 1999.

SCIVITTARO, W.B.; THEISEN, G.; GONÇALVES, D.R.N.; VALE, M.L.C.; BRAUN, J.A.F. Tratamento de Sementes e Uso de Micronutrientes na Adubação de Arroz Irrigado. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, 30p. (Embrapa Clima Temperado: Boletim de pesquisa e Desenvolvimento 69). Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/boletins/boletim_69.pdf

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **The Plant Cell**, v.13, p.61–72, 2001.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. v.1, n.6, p.2856-60, 2006.

SMOLKA, M.; ZHOU, H. e AEBERSOLD, R. Quantitative Protein Profiling Using Two-dimensional Gel Electrophoresis, Isotope-coded Affinity Tag Labeling, and Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.1, p.19-29, 2002.

SOARES, C. G. Q. **Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico**. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

- STEIN, R. J.; RICACHENEVSKY, F. K. e FETT, J. P. Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). **Plant Science**, v.177, p.563–569, 2009.
- STOCK, D.; LESLIE, A.G.W. e WALKER, J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. **Science**, 286: 1700-1705, 1999.
- STOREY, J.D. e TIBSHIRANI R., Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.100, n.16. p. 9440-9445, 2003.
- SUNG, D. Y. **Characterization of Arabidopsis heat shock protein 70 (Hsp70) gene family and microarray analysis of gene expression in response to temperature extremes**. PhD thesis. University of Florida, Gainesville, 2001.
- SUZUKI, K.; ITAI, R; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N.K.; YOSHIMURA, E.; MORI, S. Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. **Plant Physiology**, v.116, 1998.
- TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.
- THOMSEN-ZIEGER, N.; PANDINI, V.; CAPRINI, G.; ALIVERTI, A.; CRAMER, J.; SELZER, P. M.; ZANETTI, G.; SEEGER, F. **FEBS Lett.** v.576, p.375–380, 2004.
- TRAUM, A.Z. e SCHACHTER, A.D. Transplantation proteomics. **Pediatric Transplantation**, v.9, n.6, p.700-771, 2005.
- WEBER-MAIN, A. M.; HURLEY, J. K.; CHENG, H.; XIA, B.; CHAE, Y. K.; MARKLEY, J. L.; MARTINEZ-JULVEZ, M.; GOMEZ-MORENO, C.; STANKOVICH, M. T.; TOLLIN, G. An electrochemical, kinetic, and spectroscopic characterization of [2Fe–2S] vegetative and heterocyst ferredoxins from *Anabaena*7120 with mutations in the cluster binding loop. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.355, p.181–188, 1998.
- VAHL, L. C. **Toxidez de Ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. 1991. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- VAN DER STRAETEN, D.; RODRIGUES-POUSADA, R.A.; GOODMAN, H.M.; VAN MONTAGU, V. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. **The Plant Cell**, v.3, p.719-735, 1991.

VERT, G.; GROTZ, N.; DÉDALDÉCHAMP, F.; GAYMARD, F.; GUERINOT, M.L.; BRIAT, J.F.; CURIE, C. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. **Plant Physiology**, v.4, p.1223-1233, 2002.

VOLLMER, M.; THOMSEN, N.; WIEK, S.; AND SEEBER, F. Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase and ferredoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.5483–5490, 2001.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W.; **Proteomics**, v.5, p.235–244. 2005.

YAN, S.P.; ZHANG, Q.Y.; TANG, Z. C.; SU, W. A.; SUN, W. N. Comparative proteomic analysis provides new insight into chilling stress response in rice. **Molecular & Cellular Proteomics**, n.5, v.484–96, 2006.

YANG, Y.L.; ZHANG, F.; HE, W. L.; WANG, X. M.; ZHANG, L. X. Iron-mediated inhibition of H⁺-ATPase in plasma membrane vesicles isolated from wheat roots. **Cellular and molecular life sciences**, v.60, p.1249–1257, 2003.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Laguna: International Rice Research Institute, 1981.

ZAHARIEVA, T. B.; ABADIA, J. Iron deficiency enhances the levels of ascorbate, glutathione, and related enzymes in sugar beet roots. **Protoplasma**, v.221, p.269–275, 2003.

ZANG, X. e KOMATSU, S.; A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. **Phytochemistry**, v.68, p.426–437, 2007.

ZHONG, B.; KARIBE, H.; KOMATSU, S.; ICHIMURA, H.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; HIRANO, H. Screening of rice genes from a cDNA catalog based on the sequence data-file of proteins separated by two-dimensional electrophoresis, **Breeding Science**, v.47, p. 245–25, 1997.