

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização do proteoma nuclear e do perfil metabólico primário de
folhas da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condição de déficit hídrico e
recuperação**

Flávia de Moraes Franco

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Flávia de Moraes Franco
Biotecnologista

Caracterização do proteoma nuclear e do perfil metabólico primário de folhas da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condição de déficit hídrico e recuperação

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Franco, Flávia de Moraes

Caracterização do proteoma nuclear e do perfil metabólico primário de folhas da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) sob condição de déficit hídrico e recuperação / Flávia de Moraes Franco. - - Piracicaba, 2016.

126 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cana-de-açúcar 2. Déficit hídrico 3. Recuperação 4. Metabolômica 5. Proteômica
I. Título

CDD 633.61
F825c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

À minha família, por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo e carinho em todos os momentos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. Agradeço, primeiramente, ao Professor Carlos Labate pela orientação e aprendizado ao longo desses dois anos de convívio. Agradeço à Mônica pelo constante suporte e também pelas risadas na hora do café.

Gostaria de agradecer a todos do laboratório Max Feffer: Ivan, Felipinho, Fabrício, Juliana, Ana Paula, Mariana, Thais, Ilara, Mônica, Andressa, Maria Letícia, Hana, Marisângela, Simone, Livia e Adriana, as recém-chegadas Aline e Vanessa, por esses anos de convívio, por todo apoio e carinho do dia-a-dia, e principalmente, por terem feito essa jornada mais divertida e leve.

Ao Felipinho pela ajuda na interminável extração de núcleos, pela liderança no bonde do rucas e pelas risadas.

À Ilara e Thais, por toda paciência, em sempre estarem disponíveis e dispostas a me ajudar. Pelas infinitas conversas sobre metabólitos, proteínas, análises, estatística e também pela amizade, pelo apoio e pelas risadas de sempre.

Ao Fabrício, pelo suporte na informática, pela amizade, risadas e “chopp double” ao longo desses anos. À Andressa pela ajuda com o microscópio, pela dedicação e paciência, pelas infinitas caronas e pela amizade.

À Juliana, amiga já de tantos anos que também fez parte dessa jornada. Obrigada por todo apoio, caronas, risadas e pelo ombro nos momentos difíceis.

Ao Ivan, pelas aulinhas de inglês, pela amizade, lanches e risadas.

À Maria Letícia, por todos os post-it que dominaram a minha mesa, pelo apoio nas fases difíceis, pela amizade e pelas risadas diárias (Sorry).

À Ana Paula e Mari, pelas conversas, pela diversão e amizade.

À minha família, que me incentivou em todas as minhas decisões e sempre acreditou em mim. Pela torcida, pela compreensão, pelo amor e auxílio durante essa jornada. Vocês são a minha base de tudo.

Eu agradeço ao Departamento de Genética da ESALQ e CAPES pelo suporte financeiro neste projeto.

EPÍGRAFE

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.”
Rubem Alves

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Cana-de-açúcar.....	21
3.2 Déficit Hídrico.....	22
3.3 Proteômica vegetal.....	24
3.4 Proteômica subcelular.....	25
3.5 Núcleo.....	26
3.6 Metabolômica Vegetal.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material vegetal e condições de experimento.....	31
4.2 Extração de metabólitos e derivatização para GC-MS.....	32
4.3 Processamento dos dados, identificação dos metabólitos e análises estatísticas.....	33
4.4 Isolamento de núcleos.....	35
4.4.1 Tratamento e homogeneização do tecido.....	35
4.4.2 Extração com gradiente de Percoll.....	35
4.5 Verificação da integridade e pureza da fração nuclear isolada.....	36
4.5.1 Microscopia de luz.....	37
4.6 Extração, solubilização e dessalinização de proteínas.....	37
4.6.1 Quantificação das proteínas.....	37
4.7 Digestão e preparo de amostra complexa.....	38
4.8 Identificação e quantificação <i>shotgun label-free</i> de proteínas por espectrometria de massas.....	38
4.9 Análise e processamento dos dados proteômica.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Determinação da Capacidade de Campo.....	41
5.2 Processamento de dados metabolômica.....	42
5.3 Identificação dos metabólitos totais.....	43
5.4 Análises comparativas entre os tratamentos.....	49
5.4.1 Análise comparativa entre os tratamentos Controle, Déficit Hídrico e Recuperação ..	49

5.4.2	Análise comparativa entre os tratamentos Controle e Déficit Hídrico.....	55
5.4.3	Análise comparativa entre os tratamentos Controle e Recuperação	65
5.5	Integridade dos núcleos enriquecidos	71
5.6	Integridade das proteínas nucleares	74
5.7	Análise comparativa entre os tratamentos	74
5.7.1	Análise comparativa entre Controle, Déficit Hídrico e Recuperação	75
5.7.2	Análise comparativa entre Controle e Déficit Hídrico.....	83
5.7.3	Análise comparativa entre Controle e Recuperação	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
	REFERÊNCIAS.....	107

RESUMO

Caracterização do proteoma nuclear e do perfil metabólico primário de folhas da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condição de déficit hídrico e recuperação

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas em países tropicais. O Brasil, além de ser o maior produtor mundial, é também líder em produção de açúcar e álcool. Atualmente, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada no Brasil encontra-se em condições , como resultado, a cultura é sujeita ao déficit hídrico em alguns estágios. Portanto, é essencial entender as respostas fisiológicas e moleculares da planta à disponibilidade de água. Nesse contexto, as análises de metabolômica e proteômica objetivam identificar diferentes vias metabólicas e proteínas relacionadas ao mecanismo de defesa e de recuperação. Plantas de *Saccharum spp* com sete meses de idade foram submetidas a diferentes condições hídricas, déficit e reidratação, e amostras controle foram mantidas irrigadas. A identificação do perfil metabólico primário foi realizada através da cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massas (GC-MS). Para identificação das proteínas nucleares, as amostras complexas foram digeridas, e posteriormente, sequenciadas por (LC-MS). As análises estatísticas entre os tratamentos (PLS-DA) mostraram diferenças significativas tanto para metabólitos quanto para as proteínas. Um total de 86 metabólitos foram identificados, onde 8 compostos foram preferencialmente abundantes no estresse, e 10 na recuperação e, portanto, podem ser utilizados como marcadores. Alguns desses compostos participam de vias metabólicas comuns, como biossíntese de alcaloides derivados da *ornithine*, *lysine* e *nicotinate* e de biossíntese de fenilpropanoides. Metabólitos que não participam dessas vias mas foram, pelo menos, duas vezes mais abundantes nos tratamentos quando comparados ao controle também foram discutidos, para o déficit destacam-se *galacturonic acid-1-phosphate*, *pyroglutamic acid* e *creatinine* e para recuperação *methyl dihydrogen phosphate*, *phosphoric acid* e *2-hydroxypyridine*. Um total de 761 proteínas foram identificadas, sendo 21 nucleares e responsivas ao déficit hídrico, e 32 nucleares e relacionadas ao processo de recuperação. As classes funcionais das proteínas relacionadas ao déficit são de tradução e processo de oxidação-redução, e das proteínas da recuperação são de tradução e proteólise envolvida no processo catabólico proteico. A combinação de diferentes técnicas nesse estudo revela uma dinâmica regulatória complexa no mecanismo de tolerância da cana-de-açúcar ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Déficit hídrico; Recuperação; Metabolômica; Proteômica

ABSTRACT

Characterization of nuclear proteome and primary metabolites profile of sugarcane leaves (*Saccharum* spp) under water stress and recovery

Sugarcane is one of the main crops in tropical countries. Brazil, besides being the world's largest producer of this crop, is also a leader in sugar and ethanol production. Nowadays, most of the sugarcane growing in Brazil is under rain-fed conditions, as a result, the culture is subject to water deficit at certain stages. Thus, it is essential to understand the physiological and molecular plant responses to water availability. In this context, the metabolomic and proteomic analyses aims to identify different metabolic pathways and proteins related to the mechanisms of tolerance and recovery. Samples of seven month old plants of *Saccharum* spp were subjected to different water conditions, deficit and rehydration, whereas control samples were kept irrigated. The identification of primary metabolite profile was performed by Gas-Chromatography combined with Mass-Spectrometry (GC-MS). To identify nuclear proteins, the complex samples were digested and then sequenced by LC-MS^E. Statistical analyses among treatments PLS-DA showed significant differences in both metabolites and proteins of *Saccharum* spp in different conditions. A total of 86 metabolites were identified, where 8 are preferably abundant in water stress and 10 in recovery, thus, they can be used as markers. Some of these compounds are present in common pathways like biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid and biosynthesis of phenylpropanoids. Metabolites that do not participate in these pathways, but that were at least two times more abundant in treatments when compared to control, were also discussed. They were *galacturonic acid-1-phosphate*, *pyroglutamic acid* and *creatinine* that were related to deficit condition and *methyl dihydrogen phosphate*, *phosphoric acid* and *2-hydroxypyridine* to recovery. A total of 761 proteins were identified, of which 21 were nuclear and drought responsive and 32 were nuclear and recovery responsive. The functional classes of water stress proteins are translation and oxidation-reduction process and of recovery proteins are translation and proteolysis involved in cellular protein catabolic process. The combination of different techniques in this study revealed a complex regulatory dynamics in the mechanism of sugarcane water stress tolerance that have not been discussed in the literature.

Keywords: Sugarcane; Water stress; Recovery; Primary metabolites; Nuclear proteins

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma cultura economicamente importante, cultivada por sua produção da sacarose que é estocada no colmo. É responsável por aproximadamente 60% do açúcar branco produzido no mundo inteiro, além da produção de bioetanol e geração de energia através da utilização da sua biomassa (ALMARAJ et al., 2010). O Brasil é o seu maior produtor mundial e suas lavouras continuam em expansão principalmente nas regiões Centro- Sul e Centro-Oeste do país, englobando estados como o Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, conhecidos por apresentarem déficit hídrico por longos períodos durante o ano (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012). A cana é uma gramínea perene, composta por folhas, raízes e caule/ colmo, cuja base perfilha para produzir caules não ramificados e apresenta quatro estádios fenológicos: brotação e emergência, perfilhamento e estabelecimento da cultura, período de crescimento (considerado do perfilhamento final ao início do acúmulo de sacarose) e maturação quando ocorre o intenso acúmulo deste carboidrato nos colmos (CHEAVEGATTIGIANOTTO et al., 2011). Em função de possuir ciclo perene, a cana sofre influência das variações climáticas durante o ano todo. Para atingir alta produção de sacarose, a planta precisa encontrar épocas com condições de temperatura e umidade adequadas para permitir o máximo crescimento na fase vegetativa, seguida de um período com restrição hídrica ou térmica para favorecer o acúmulo de sacarose no colmo, na época do corte (INMANBAMBER; SMITH, 2005).

A habilidade para lidar com o déficit hídrico é determinante na distribuição natural das plantas e na produtividade das culturas agrícolas. O principal constituinte vegetal é a água, a qual totaliza cerca de 90% da massa de matéria verde. Além disso, de todos os recursos de que a planta necessita para crescer e funcionar, a água é o mais abundante e, ao mesmo tempo, o mais limitante para produtividade agrícola, uma vez que constitui a matriz e o meio onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais à vida (TAIZ; ZEIGER, 2004). A cana-de-açúcar possui metabolismo para fixação do CO₂ do tipo C4, o que a permite ser adaptada à produção de biomassa em regiões tropicais, uma vez que as plantas possuem um controle estomático que possibilita maior economia de água e nitrogênio, recursos limitantes da produtividade das culturas nessas regiões. Entretanto, para que a cultura expresse seu máximo potencial produtivo, depende de condições ambientais favoráveis, dentre as quais, destaca-se a disponibilidade de água durante o ciclo (ENDRES et al., 2010).

Os principais efeitos da deficiência hídrica no desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar citados por Zhao et al. (2010) foram reduções na condutância estomática, taxa de fotossíntese, número e tamanho dos perfilhos e acúmulo de biomassa. Decréscimos na condutância estomática, transpiração e assimilação de CO₂ também foram constatados por Machado et al. (2009) na fase de máximo crescimento. Além disso, a planta também possui mecanismos de recuperação do déficit hídrico, onde os tecidos também são capazes de reparar os danos causados através de mecanismos que incluem não somente o reparo nos danos das membranas, mas também das proteínas e RNA danificados devido à falta d'água ou como parte da estratégia de reorganização para redirecionar a rota metabólica.

A compreensão de um sistema metabólico como um todo é essencial para a elucidação dos mecanismos de coordenação dos diversos processos biológicos (FUKUSHIMA et al., 2009). Para esta abordagem completa, é fundamental que a análise, por exemplo, da resposta de um organismo a diferentes condições ambientais seja realizada em diferentes níveis, tais como proteômico e metabolômico, gerando diferentes níveis de informações (FIEHN; WECKWERTH, 2003). Dessa forma, partindo de um número maior de variáveis, é possível a investigação através de uma abordagem global, a Biologia de Sistemas. A proposta desta abordagem é o estudo do processo biológico como um sistema integrado de eventos genéticos, proteicos, metabólicos e celulares que estão em constante fluxo e são interdependentes (JONSSON et al., 2005).

A elucidação dos mecanismos moleculares de defesa das plantas exige o conhecimento global das proteínas expressas. Tais mecanismos são baseados nas funções celulares incluindo os produtos de *splicing* alternativo, suas modificações pós-traducionais, localizações subcelulares e sua organização em máquinas moleculares em decorrência das interações proteína-proteína, em um determinado momento durante o ciclo-de-vida de uma célula ou sob determinadas condições celulares. Apesar disso, a abordagem proteômica clássica pode falhar na descoberta de novos produtos gênicos, que podem ser proteínas de grande abundância em um determinado compartimento subcelular, mas que, no entanto, constituem proteínas de baixa abundância no homogenato celular total. O direcionamento de uma proteína para um local subcelular particular é um princípio importante da organização funcional da célula no nível molecular (DREGER, 2003). Essa localização proteica está, portanto, ligada à função celular e representa um desafio analítico para a pesquisa proteômica, exigindo uma análise proteômica com resolução subcelular (DREGER, 2003).

O núcleo é considerado um dos órgãos regulatórios mais importantes presentes na célula por conter um constante fluxo de moléculas com funções regulatórias distintas através

do seu envelope, o qual é constituído por uma dupla membrana. Além disso, constitui a maior diferença entre as células procarióticas e eucarióticas. Avanços nas técnicas de microscopia têm demonstrado que essa organela está longe de ser homogênea por apresentar diversos subcompartimentos, os quais já chegaram a aproximadamente 30 diferentes. A singularidade do núcleo é demonstrada pelo fato de que todos os seus subcompartimentos não apresentam membranas, são entidades auto-organizadas que passam por um estado de desmontagem/remontagem durante a divisão celular, são altamente dinâmicas e estão em constante movimento, sendo sua morfologia totalmente determinada pela interação funcional de seus componentes.

As interações entre esses componentes dentro do núcleo formam parte de um sistema regulatório complexo que é apenas parcialmente compreendido.

O termo “metabolômica” refere-se ao estudo global de todas as micromoléculas de um organismo em um determinado instante, sob influência de específicas condições ambientais (COLQUHOUN, 2007). Metabólitos são utilizados para fornecer energia, fornecer blocos de construção para criar células e tecidos, e podem ser utilizados para sinalização a nível celular ou fisiológico. A importância dos metabólitos na biologia tem dirigido o desenvolvimento de abordagens para habilitar a detecção e quantificação de metabólitos de amostras biológicas. Mudanças a níveis metabólicos podem revelar importantes informações sobre os metabólitos e vias metabólicas associadas com o fenótipo biológico (CRUTCHFIELD et al., 2010).

Geralmente, o metaboloma é dividido em dois grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são definidos como os compostos necessários para execução das funções básicas das células, como respiração e biossíntese de aminoácidos. Basicamente, todos os organismos compartilham os mesmos tipos de metabólitos primários, ainda que hajam grandes diferenças em função das diferentes rotas biossintéticas (VERPOORTE et al., 2007).

Para analisá-los, diferentes abordagens podem ser utilizadas. Uma delas é a obtenção do “perfil metabólico”, que representa a identificação e quantificação dos metabólitos detectados. Essa análise objetiva estabelecer a compreensão e a predição do comportamento de redes metabólicas complexas, a partir dos efeitos de variações sobre o sistema em estudo. Uma das maiores aplicações em metabolômica de plantas é a análise de mudanças metabólicas devido à influência de estresses (GUY et al., 2008).

2 OBJETIVOS

A importância econômica da cana-de-açúcar para o setor sucroalcooleiro nacional e a expansão da cultura para regiões onde o déficit hídrico é favorecido consolida a necessidade do melhor entendimento a respeito dos processos fisiológicos e moleculares envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca. Portanto, o projeto tem por principais objetivos: 1) Análise comparativa do perfil metabólito primário de tratamentos submetidos a diferentes condições hídricas; 2) Discussão da relação funcional dos metabólitos com as diferentes condições em que os tratamentos se encontram; 3) Análise comparativa do proteoma nuclear de tratamentos submetidos a diferentes condições hídricas; 4) Predição da localização nuclear das proteínas e classificação funcional das mesmas; 5) Identificar proteínas nucleares que são, diferencialmente ou preferencialmente, expressas em situação de déficit hídrico e de recuperação. Para tanto foram utilizadas folhas (+1) da variedade SP 80-3280 de cana com sete meses de idade. Assim foi possível uma melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares de tolerância.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. As principais características dessa família são o tipo de inflorescência, o crescimento do caule em colmos, folhas com lâmina em sílica em suas bordas e bainha aberta (JOAQUIM, 1997). Entretanto, as variedades, hoje em cultivo comercial, são híbridas de várias espécies onde, procura-se conciliar a rusticidade e resistência às doenças, boas qualidades fisiológicas e alto teor de açúcar das variedades nobres de *S. officinarum* (Casagrande; Vasconcelos, 2010), diferindo principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares (JOAQUIM, 1997).

O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, mas é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o país deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008.

A política nacional para a produção da cana-de-açúcar se orienta na expansão sustentável da cultura, com base em critérios econômicos, ambientais e sociais. O programa Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar (ZAEcana) regula o plantio da cana, levando em consideração o meio ambiente e a aptidão econômica da região. A partir de um estudo minucioso, são estipuladas as áreas propícias ao plantio com base nos tipos de clima, solo, biomassa e necessidades de irrigação (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - BRASIL, 2014).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, também é o maior produtor de açúcar e é o segundo maior produtor mundial de etanol, ficando atrás somente dos Estados Unidos (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2016). A produção da cana-de-açúcar na safra de 2015/2016 foi de 665,6 milhões de toneladas, com um crescimento de 4,9% em relação à safra anterior. Sozinho o estado de São Paulo produziu um total de 367,6 milhões de toneladas, gerando 55% da produção de cana-de-açúcar do Brasil. A produção de açúcar no Brasil, nesta mesma safra, foi de 33,5 milhões de toneladas e a produção de etanol total foi de 30,5 bilhões de litros (CONAB, 2016).

Nos dias atuais a área destinada à atividade sucroalcooleira brasileira está estimada em 8,6 milhões de hectares, distribuídas em todos estados produtores, onde o Sudeste concentra 63% do total dessa área. O estado de São Paulo possui a maior área destinada ao cultivo da cana com 4,5 milhões de hectares, representando aproximadamente 52% de toda a área utilizada na produção de cana-de-açúcar (CONAB, 2016).

Na última década, houve incremento considerável na área plantada e na produção, em virtude do lançamento de cultivares mais produtivas e da implantação de novas unidades industriais, estimulados pelo aumento das exportações e pela crescente participação dos veículos bicomustíveis na frota brasileira (Sousa & Macedo, 2010).

A importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil fez com que essa cultura se tornasse atrativa para as pesquisas, e em setembro de 1998 foi iniciado o projeto SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag*), que objetivou o sequenciamento aleatório de *ESTs* e identificou aproximadamente 50.000 genes (VETORE et al., 2001).

3.2 Déficit Hídrico

Um fator importante que deve ser destacado visto que influencia a produtividade das culturas é a disponibilidade de água e de nutrientes. O principal constituinte vegetal é a água, que constitui cerca de 90% da massa de matéria verde. Além disso, de todos os recursos que a planta necessita para crescer e funcionar, a água é o mais abundante e, ao mesmo tempo, o mais limitante para produtividade agrícola, uma vez que constitui a matriz e o meio onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais à vida (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A disponibilidade hídrica tem sido a maior força seletiva na evolução das espécies. Assim, a habilidade para lidar com o déficit hídrico é determinante na distribuição natural das plantas e na produtividade das culturas agrícolas. A água é continuamente perdida para atmosfera pelo processo de evapotranspiração e absorvida do solo pelas raízes, de forma que quando a perda decorrente da evapotranspiração excede a absorção pelas raízes, a planta entra em déficit hídrico (LAWLOR; CORNIC, 2002).

Em situações em que o déficit hídrico não é severo, a redução na fotossíntese é ocasionada pelo aumento da resistência à difusão do CO₂ pelos estômatos e mesófilo (GALMÉS et al., 2011). Esse aumento da resistência ocorre em função do fechamento estomático, em resposta ao declínio no potencial de água na folha, ou à redução no teor de água no solo (SMIT; SINGELS, 2006), ou até mesmo à elevada demanda atmosférica (ENDRES et al., 2010). Essa resposta é considerada uma das primeiras estratégias para

impedir a desidratação excessiva das folhas (YORDANOV et al., 2003). Entretanto, em condições mais severas, a redução da fotossíntese pode ser mais controlada pela eficiência dos cloroplastos em fixar CO₂ do que pelo aumento da resistência à difusão (YORDANOV et al., 2003). Nesses casos, a taxa fotossintética é reduzida predominantemente por limitações ditas não estomáticas ou metabólicas (GALMÉS et al., 2011), tais como a inibição da divisão celular e síntese de proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Parte das mudanças observadas na fotossíntese, em condições de estresse hídrico, pode ser atribuída aos efeitos secundários resultantes da superposição de outros estresses ambientais, dos quais a deficiência nutricional é frequente em regiões sujeitas à falta d'água, uma vez que o déficit hídrico afeta a absorção e assimilação de nutrientes, sendo que a última, por sua vez, afeta a fotossíntese (PIMENTEL, 2004).

A necessidade hídrica da cana-de-açúcar varia com o estado vegetativo em que a cultura se encontra e a cultivar utilizada. Essa característica tem controle multigênico (Rodrigues et al., 2009) e é expressa em diferentes níveis organizacionais, que incluem desde respostas celulares até modificações morfológicas (PASSIOURA, 1997).

Durante seu crescimento, a cana-de-açúcar passa por quatro estágios fenológicos distintos, denominados germinação, perfilhamento, intenso crescimento e maturação. A fase de perfilhamento, juntamente com a de intenso crescimento, conhecida como a fase de formação, tem sido identificada como a mais crítica no que diz respeito à demanda hídrica (MACHADO et al., 2009; RAMESH; MAHADEVASWAMY, 2000; INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Isso ocorre, principalmente, porque nessa fase são produzidos 70-80% de toda a biomassa acumulada durante o ciclo da cultura (OLIVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2008). Dentre os processos de desenvolvimento afetados pelo déficit hídrico, o crescimento foliar da cana-de-açúcar é um dos mais sensíveis. Este processo é altamente dependente das relações de água na planta, de forma que já são observadas reduções da expansão foliar sob valores de potencial de água na folha abaixo de -0,2 MPa e praticamente não ocorre o crescimento quando os valores alcançam -0,7 MPa (INMAN-BAMBER; JAGER, 1986).

Smit & Singels (2006) observaram reduções no crescimento foliar, em condições de estresse hídrico, o que segundo os mesmos também promoveu aceleração da senescência das folhas velhas, causando diminuição significativa no Índice de Área Foliar (IAF). Algumas variedades de cana-de-açúcar, sob condições de estresse hídrico, também enrolam as folhas para diminuir a superfície transpirante, que juntamente com a senescência foliar e redução na taxa de aparecimento foliar contribuem para redução do uso da água, e são considerados mecanismos de defesa da planta (MACHADO et al., 2009).

Zhao et al. (2010) constataram reduções no aparecimento de novos perfilhos. Associada à produção da cana-de-açúcar, tem-se a dinâmica de crescimento dos colmos que é outra variável que apresenta correlação positiva com o rendimento final da cultura, sendo significativamente afetada em condições de seca (SILVA et al., 2008; INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; RAMESH; MAHADEVASWAMY, 2000).

3.3 Proteômica vegetal

A proteômica é o estudo da composição protéica total de um organismo, célula ou organela e surge da necessidade em identificar e compreender as proteínas e suas funções (AGRAWAL et al., 2011). A essência dessa emergente abordagem da chamada “Biologia de Sistemas” é que, para qualquer dada espécie, as biomoléculas e sua organização dentro das rotas e processos é grande, porém finita. Em teoria, portanto, o sistema biológico que opera nas espécies pode ser descrito compreensivelmente se uma quantidade suficiente de observações sobre todos os elementos que constituem o sistema possa ser obtida. A proteômica, então, é uma rica fonte de informações biológicas uma vez que as proteínas estão envolvidas em quase todas as atividades biológicas e podem também ter diversas propriedades, que coletivamente contribuem muito para o entendimento desses sistemas biológicos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

Nesse aspecto, as complexas questões biológicas tornaram-se muito estudadas por meio da proteômica comparativa, especialmente em decorrência do rápido desenvolvimento das técnicas de identificação e quantificação proteica. Tais técnicas têm permitido o estudo simultâneo de quantidade enorme de proteínas expressas em uma célula, em um determinado momento (HAYNES; ROBERTS, 2007; ROSE et al., 2004). Em termos históricos, a proteômica vegetal originou-se há mais de 30 anos e teve sua origem em diversos campos, como na separação multidimensional e no progresso do conhecimento de seu braço complementar, a espectrometria de massas, os quais integrados resultaram em uma importante tecnologia para a pesquisa biológica na era pós-genômica (AGRAWAL et al., 2011).

O objetivo inicial do estudo da proteômica era a rápida identificação de todas as proteínas expressas pelas células e tecidos, o que ainda precisa ser alcançado para algumas espécies. Os objetivos mais recentes são mais variados e dirigidos para a determinação de diversas propriedades das proteínas. Isso inclui sequência, quantidade, estado de modificação, interações com outras proteínas, atividade, distribuição subcelular e estrutura (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

O rápido avanço da proteômica deve-se principalmente à aplicação combinada de avançadas técnicas de separação, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática na caracterização de proteínas nas complexas misturas biológicas (JUNG et al., 2000; DREGER, 2003). Dessa maneira, diferentemente do que acontece com o genoma e o transcriptoma, um único organismo pode ter diversos proteomas, os quais mudam, espacialmente e temporalmente, durante as diversas fases do seu desenvolvimento. Essa complexidade constitui um grande desafio para os estudos que objetivam revelar o complemento proteico do genoma, de forma que um único genoma pode fornecer múltiplos conjuntos protéicos resultantes de *splicing* alternativo e/ou modificações pós-traducionais (TAYLOR, FAHY, GHOSHY, 2003).

Juntamente com os métodos mais avançados em biologia molecular como a clonagem gênica, sequenciamento e análise de expressão, o estudo químico da proteína promoveu o link entre a atividade observada ou a função de uma proteína bioquimicamente isolada e o gene que a codifica. A chave fundamental foi, portanto, o desenvolvimento de métodos ainda mais sensíveis e confiáveis para sequenciamento de proteínas para fazer menores amostras acessíveis para identificação (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

Um dos pontos mais atrativos da proteômica é seu potencial de rapidamente caracterizar as diferenças moleculares entre diversas amostras e identificar a presença de produtos gênicos em um determinado lugar e momento (HEAZLEWOOD; MILLAR, 2003).

3.4 Proteômica subcelular

A primeira observação de células por microscopia eletrônica no início de 1950 indicou um nível de organização que era um pouco mais elaborado do que havia sido assumido. Um novo mundo foi então revelado, onde a compartimentalização foi alcançada através de membranas intracelulares (BRUNET et al., 2003).

Além disso, há atualmente várias limitações para a análise de amostras complexas. Primeiro, embora o número total de produtos gênicos presentes em qualquer dada célula seja estimado em torno de 10.000, o número efetivo é provável que seja várias vezes maior devido a variantes de *splicing* e à ampla variedade de possíveis modificações pós-traducionais. Segundo, quando é considerada a grande variação no nível de expressão de várias proteínas em uma célula ou tecido (que pode variar de 3-4 para mais de 10 ordens de magnitude), a complexidade torna-se tal que proteínas em baixa abundância são, inevitavelmente, mascaradas pelas em alta abundância (HUBER, 2003). Como exemplo temos as proteínas

regulatórias como as quinases, GTPases e alguns receptores de membranas estão presentes em baixo número de cópias, importantes camadas de informação são perdidas de estudos de células inteiras e de tecidos (HUBER, 2003).

Nos tecidos vegetais, os múltiplos conjuntos proteicos permitem o desenvolvimento de diversos tipos celulares dentro de um único órgão, de modo que um organismo é composto por diferentes órgãos e tipos de tecidos. Dessa forma uma abordagem proteômica simples passa a ser insuficiente para o estudo de muitos problemas biológicos, não refletindo a real complexidade da dinâmica protéica existente. Surge, assim, o desafio de desenvolver novas estratégias que possam avaliar a complexidade e diversidade da composição das proteínas, além de suas interações e dinâmicas. Nesse sentido, o estudo do subproteoma torna-se uma estratégia relevante (DREGER, 2003; AGRAWAL et al., 2011).

As organelas representam alvos atrativos para análise proteômica total por representarem unidades funcionais discretas. Sua complexidade na composição proteica é reduzida relativamente para todas as células e, quando proteínas abundantes não pertencentes à organela alvo são removidas, proteínas menos abundantes e específicas são reveladas, as quais variam de vias de sinalização celular através de interações proteína-proteína à expressão diferencial de proteínas em resposta a estímulos externos. Os proteomas das organelas compreendem um conjunto específico de proteínas que cumpre funções discretas, mas variadas (TAYLOR; FAHY; GHOSHY, 2003).

A organização da célula eucariótica em compartimentos de funções especializadas, as organelas, nos proporciona, então, a oportunidade de cruzar dados proteômicos com as unidades funcionais. Não é surpresa que, para os estudos atuais, identificar as proteínas presentes nas organelas vem sendo considerado um passo importante direcionado ao entendimento dos mecanismos moleculares governantes dessas funções (BRUNET et al., 2003).

3.5 Núcleo

O núcleo é uma organela envolvida por uma membrana dupla e constitui a maior diferença entre as células procarióticas e eucarióticas. Além disso, é considerado um dos órgãos regulatórios mais importantes presentes na célula por conter um constante fluxo de moléculas com funções regulatórias distintas através do seu envelope (ERHARDT; ADAMSKA; FRANCO, 2010).

Essa organela está longe de ser homogênea por apresentar diversos subcompartimentos. O compartimento nuclear mais óbvio é o nucléolo, o local da transcrição ribossomal do DNA e da biogênese dos ribossomos. O envelope nuclear é uma dupla membrana composta por duas bicamadas lipídicas. A membrana nuclear externa é contínua com o retículo endoplasmático, que, por sua vez, apresenta ribossomos aderidos. A membrana interna apresenta um complemento único de proteínas integrais, que interagem com a cromatina e a lâmina nuclear. Ambas as membranas são perfuradas por grandes complexos multiprotéicos, os poros nucleares, que alcançam o envelope nuclear inteiro e formam canais através do mesmo, abrindo espaço para a troca molecular (ERHARDT; ADAMSKA; FRANCO, 2010).

A lâmina nuclear é uma malha de filamentos proteicos intermediários que mediam a ligação da cromatina com o envelope nuclear durante a intérfase e o desligamento da cromatina durante a mitose (BORUC; ZHOU; MEIER, 2012).

Os poros nucleares que são complexos multiproteicos incorporados ao envelope nuclear que regulam o movimento do RNA, de proteínas e de complexos RNA-proteína para dentro e para fora do núcleo (BROHAWN et al., 2009). Mutações nos genes que codificam proteínas constituintes dos complexos poros nucleares e da maquinaria de tráfico nucleocitoplasmático parecem prejudicar as respostas vegetais de defesa, sugerindo a importância da dinâmica de translocação de proteínas para o interior do núcleo na regulação da expressão dos genes vegetais de defesa (CHEUNG; REDDY, 2012).

O espaço nuclear é compartimentalizado pelos corpos nucleares, que são estruturas dinâmicas, porém relativamente estáveis, compostas por proteínas e RNAs e não delimitados por membranas. Sua morfologia é dependente da diferenciação celular e do estado metabólico. Em plantas, os corpos nucleares mais investigados são os nucléolos, os fotocorpos, que contém fitocromos e proteínas envolvidas na fotomorfogênese, e as manchas (*speckles*) nucleares (REDDY; DAY; GÖHRING; BARTA, 2012). O nucléolo é a estrutura nuclear mais proeminente, e é montado ao redor de *clusters* de genes ribossomais (genes rDNA) repetidos *em tandem* e que são transcritos pela RNA polimerase I (DUNDR; MISTELI, 2001). As regiões contendo as sequências em tandem de genes rDNA constituem o loci cromossomal denominado de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e são a base da organização estrutural do nucléolo responsáveis pelo direcionamento de todos os componentes de montagem e processamento necessários para a biogênese de ribossomos (CARMO-FONSECA; MENDES-SOARES; CAMPOS, 2000). O interesse nesses corpos subnucleares tem sido reacendido pelas descobertas recentes de que alguns deles contêm

fatores envolvidos na transcrição e processamento do RNA (LAMOND; EARNSHAW, 1998). Além disso, embora aparentemente os *speckles* apresentem apenas alguns genes, a observação de sua freqüente presença próxima a locais de transcrição muito ativos sugere sua provável relação funcional com a expressão gênica (LAMOND; SPECTOR, 2012).

A singularidade do núcleo é demonstrada pelo fato de que todos os seus subcompartimentos não apresentam membranas, sendo entidades auto-organizadas que passam por um estado de desmontagem/remontagem durante a divisão celular. As moléculas nucleares são altamente dinâmicas e estão em constante movimento, sendo sua morfologia totalmente determinada pela interação funcional de seus componentes (MISTELI, 2001). A presença de um alto número de compartimentos intranucleares indica que a relação entre função e localização existe também no interior do núcleo (ERHARDT; ADAMSKA; FRANCO, 2010).

A análise das mudanças dinâmicas do proteoma nas organelas celulares é necessária para elucidar a base molecular da tolerância à desidratação nas plantas. O núcleo contém aproximadamente toda a informação genética necessária para a expressão regulada de proteínas celulares. Isso ajuda no fluxo de fatores regulatórios e produtos gênicos via poro do núcleo, auxilia na produção de mRNAs e ribossomos e organiza o desenrolar do DNA para replicar os genes-chave. Isso coordena inúmeras rotas para alcançar o crescimento, a divisão e a diferenciação da célula (FINK et al., 2008). Uma crescente evidência sugere que quase 25% do total das proteínas celulares estão localizadas no núcleo eucariótico, implicando essa variedade de funções.

Análise do proteoma nuclear de um pequeno número de plantas sob condição normal e sob estresse abiótico tem sido reportada e suas funções moleculares têm sido destacadas, as plantas incluem *Arabidopsis*, arroz e grão de bico. Esses estudos demonstraram que as proteínas nucleares foram implicadas em diversas vias de sinalização e de proteção com a função dessas proteínas ligadas à investigação das condições de estresse (FINK et al., 2008)

3.6 Metabolômica Vegetal

Avanços recentes em tecnologia trouxeram uma revolução na maneira em que os sistemas biológicos são visualizados e investigados. Avanços em espectrometria de massas têm permitido análises de metabólitos e proteínas celulares (proteoma e metaboloma, respectivamente) em uma escala previamente inimaginável.

Através do estudo dos organismos como sistemas biológicos, pode-se começar a visualizar como as vias individuais e as redes metabólicas são interconectadas. Essa

abordagem é baseada em quadros teóricos sólidos e modelos computacionais que permitem explicar as observações experimentais. Já é imaginado que biologia holística será de grande valor para direcionar estratégias de engenharia metabólica uma vez que modificações de expressão de genes nem sempre nos dizem sobre os efeitos preditos ou desejados da relação cruzada entre as vias (OLIVER, 2002).

A metabolômica é esperada em ser mais útil em conjunto com outras ciências ômicas como a transcriptômica ou proteômica (EDWARDS; BATLEY, 2004). Baseando-se em algumas limitações das outras técnicas, realizar o perfil metabólico pode fornecer a informação mais funcional das tecnologias “ômicas”. Proteômica e transcriptômica são ambos considerados em serem um fluxo de média relativa de informações genéticas. Em contraste, metabolômica deve ser pensado como sendo relacionado ao fenótipo.

Os componentes do metaboloma podem ser vistos como produtos finais da expressão gênica e definir o fenótipo bioquímico de uma célula ou tecido. Mensurações quantitativas ou qualitativas de grandes números de metabólitos celulares, então, fornecem uma ampla visão do estado bioquímico de um organismo que pode ser usado para monitorar e acessar funções gênicas (FIEHN et al., 2000) explicadas por perturbações impostas as plantas. Perturbações incluem mudanças ambientais, estresse fisiológico, estresse abiótico, mutação e eventos transgênicos.

Para os processos metabólicos há uma variedade de tecnologias de caracterização química. Essas tecnologias são utilizadas para comparar diferentes estados metabólicos resultantes de diferenças de expressão gênica. Muitas respostas envolvendo alteração de expressão gênica, particularmente para plantas na resposta a estímulos ambientais, resultam em mudanças qualitativas em pools de metabólitos, e assim a identificação qualitativa de metabólitos será crítica. Ao mesmo tempo, algumas modificações genéticas ou respostas ambientais podem resultar em mudanças temporais ou espaciais nas concentrações metabólicas. Assim, métodos quantitativos exatos e reprodutíveis são também necessários para diferenciar amostras ao nível que pode fornecer um entendimento de relações funcionais entre genomas e metabolomas.

Metabólitos únicos são os primeiros a serem identificados. Correlações são então procuradas entre dados de metabólitos diferencialmente mostrados. Os metabólitos individuais assim como os correlacionados são então usados para identificar vias metabólicas ou redes que tenham sido afetadas. Essas vias são então usadas para determinar a mais ampla significância biológica da resposta ou para assinar função gênica (KOSE et al., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e condições de experimento

Toletes de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), cultivar SP 80–3280, fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canaveira - Piracicaba – SP, foram cultivadas (Figura 1) em vasos de 10 litros contendo substrato (Basaplant®) e vermiculita, na proporção de 2:1. O experimento foi mantido em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído por 36 plantas e bordadura (Figura 2). Foi fornecida luz suplementar, para perfazer um total de 12 horas de luz, com controle da nutrição, fornecimento de água e temperatura ajustada para $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram utilizadas apenas as folhas F+1 de plantas com sete meses de idade, onde cada repetição biológica constitui-se de 6 plantas e, portanto, 6 folhas.

A indução ao déficit hídrico e da recuperação foi realizada aos sete meses, para tanto, foi determinado o potencial matricial de água no solo através da capacidade de campo – CC, 100% CC para plantas Controle, 40% CC para Déficit Hídrico e 75% CC para Recuperação.

As folhas foram armazenadas em gelo e transportadas para o laboratório. Para o protocolo de extração de núcleos foliares a utilização foi imediata, uma vez que o protocolo utilizado exige material fresco para que os núcleos extraídos possam estar intactos. Já para o protocolo de extração de metabólitos primários, as folhas imediatamente colocadas no nitrogênio líquido até serem transportadas para o freezer -80°C , onde foram mantidas até a utilização na extração.

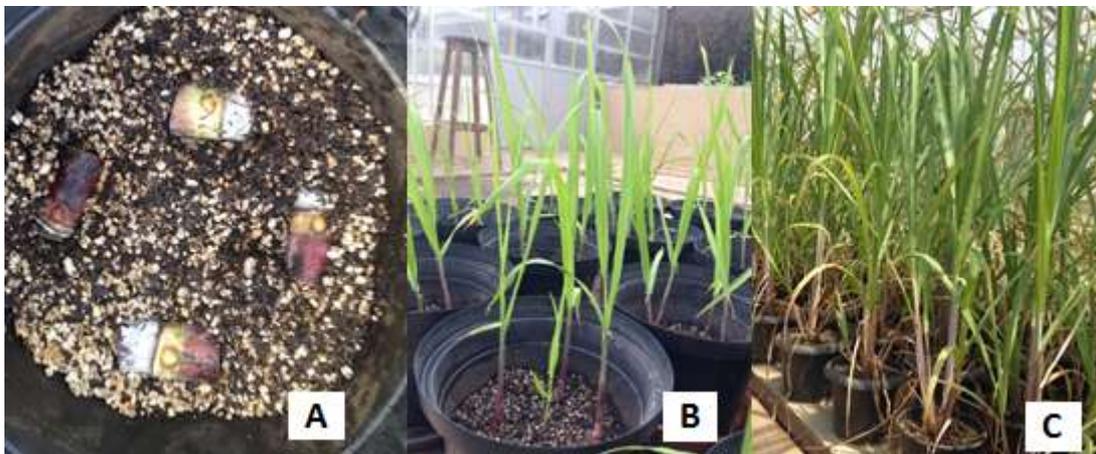


Figura 1 - Evolução do desenvolvimento das canas-de-açúcar na casa de vegetação. A – toletes; B – 1 mês de idade; C – 7 meses de idade

As amostras derivatizadas foram automaticamente injetadas (1 μL) no modo *splitless* em cromatógrafo gasoso (7890A *Agilent Technologie*), equipado com duas colunas de sílica fundida, sendo a coluna da primeira dimensão (DBE) de 20 m comprimento x 0,18 mm diâmetro interno x 0,18 μm de filme e a coluna da segunda dimensão de 0,69 metro x 0,10 mm diâmetro interno x 0,10 μm de filme (*Agilent J&W Scientific*). A temperatura de injeção foi de 280 °C, com fluxo de 1 mL min^{-1} de hélio, iniciado após 250 s do início da aquisição dos dados, sendo que a temperatura inicial, da primeira coluna, foi de 80 °C, mantida por 2 minutos e aumentada 15 °C /minutos até atingir 305 °C, então essa temperatura foi mantida por 10 minutos. Para a segunda coluna a temperatura inicial foi de 85 °C, mantida por 2 minutos e aumentada 15 °C /minutos até atingir 310 °C, então essa temperatura foi mantida por 10 minutos. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons (impacto de elétrons) do equipamento GC x GC-TOFMS (*Pegasus 4D, Leco*). A temperatura da fonte de íons será 250 °C, feixe de elétrons 70-eV, corrente de ionização de 2.0 mA e 20 espectros s^{-1} sendo registrados na faixa de m/z 45-800, a voltagem do detector foi 1500 V.

4.3 Processamento dos dados, identificação dos metabólitos e análises estatísticas

O processamento dos dados de GC-MS foi realizado em duas etapas. Inicialmente os cromatogramas gerados foram exportados para o programa *ChromaTOF*, versão 4.32, no qual foi realizada correção da linha de base e conversão dos dados para arquivos netCDF. Em seguida, as etapas de: deconvolução, obtenção do índice de retenção (IR), correção do tempo de retenção (RT), identificação e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos foram realizadas com o auxílio do pacote *TargetSearch* (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009), no ambiente R (<http://www.R-project.org>). Para identificação dos metabólitos foi utilizada a biblioteca de GMD (*The Golm Metabolome Database*, disponível em (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>)). Como parâmetro para identificação dos metabólitos foi utilizado o IR (Index de Retenção), um parâmetro calculado através de uma relação entre número de carbonos da molécula e o tempo de retenção. Essa relação é ajustada de acordo uma série de padrões de referência com o número de carbonos e index de retenção conhecidos, como os alcanos. Foi considerado desvio do $\text{IR} \pm 2$ segundos, quando confrontado com o IR da biblioteca. Outro parâmetro utilizado foi o “*mass count*”, o qual representa o número de massas características encontradas e foram considerados válidos apenas aqueles que contêm três ou mais massas características. O parâmetro *score* também foi considerado, o qual pontua os metabólitos contidos em uma biblioteca de espectros pré-definida de acordo com a sua probabilidade de

ser associada a um padrão de fragmentação específico. Quanto maior for o *score*, maior a semelhança entre o espectro esperado (presente na biblioteca) e o observado e os tempos de retenção. Então, para um dado metabólito, quanto mais próximo forem os picos detectados dos seus respectivos tempos de retenção, mais próximas as intensidades relativas dos fragmentos estão dos picos definidos, e, quanto maior a correlação entre as intensidades desses fragmentos, maior o *score*. Assim, foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com três ou mais massas características e com *score* igual ou maior a 6. A intensidade de cada metabólito foi normalizada pelo peso fresco (mg) da amostra correspondente e pela contagem iônica total (*TIC*) de cada amostra.

As análises estatísticas comparativas entre os tratamentos foram realizadas no programa *on-line MetaboAnalyst* (XIA et al., 2015). Para tanto, procedeu-se a normalização das amostras pela mediana, transformação dos dados por \log_2 e escalonamento por pareto. Para uma melhor diferenciação dos tratamentos na formação de grupos, foram realizadas análises multivariadas de Discriminação por Mínimos Quadrados Parciais (*partial least squares discrimination* - PLS-DA), a qual é supervisionada uma vez que se fornece dados identificando as amostras, otimizando a separação entre os grupos de forma a obter o máximo de separação entre as classes. Essa técnica consiste na análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma ou mais variáveis respostas com diversas variáveis independentes, baseada em um número de fatores. Nela foi considerado o Índice de Importância da Variável - VIP (*variable importance in projection*), uma soma ponderada dos quadrados dos *scores* da PLS levando em conta a quantidade de variância de Y em cada dimensão. Os *scores* são calculados para cada uma das componentes. Para validação do PLS-DA, foram considerados os principais parâmetros, como a Acurácia, R^2 e Q^2 . Também foram realizadas análises univariadas (*t-test* e ANOVA) onde foi considerado o *p value* ($<0,05$). As vias metabólicas nas quais os compostos identificados participam foram buscadas no KEGG (Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas), um recurso de banco de dados utilizado para o entendimento de funções especializadas dos sistemas biológicos com informação a nível molecular, especialmente dados moleculares de larga-escala gerados pelo sequenciamento do genoma e outras tecnologias *high-throughput*.

4.4 Isolamento de núcleos

Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo de Folta e Kaufman (2000), com modificações, conforme descrito a seguir.

4.4.1 Tratamento e homogeneização do tecido

Cada repetição biológica constituía-se de 6 folhas de material vegetal (folhas +1). O tecido foi mantido em água gelada e cortado com uma tesoura de floricultura (Supercort - Tramontina) em pedaços pequenos e foram colocados simultaneamente em um béquer contendo éter gelado, que constitui um solvente para clorofila, também mantido em gelo. O volume de éter foi o suficiente para cobrir totalmente o tecido, o qual foi mantido no éter por 10 min, sob agitação nos primeiros 5 min e picotado de forma irregular em pedaços menores, sem agitação, nos 5 min seguintes.

O éter foi retirado e o tecido lavado duas vezes em tampão de extração (1,0 M hexilenoglicol (2-metil-2,4-pentandiol), 0,5 M PIPES-KOH (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 5mM 2-mercaptoetanol), e em seguida ressuspendido no mesmo tampão de extração, em volume duas vezes superior ao volume do tecido. O material ressuspendido foi homogeneizado com ajuda de um *mixer*.

O homogeneizado foi filtrado utilizando-se uma camada dupla de *miracloth* com poros de 22-25 µm de diâmetro, com o objetivo de eliminar materiais particulados.

Em seguida, foi adicionado Triton X-100 (25%), gota a gota, com leve agitação, de forma que sua concentração final atingisse 1% (v/v). O homogeneizado foi então submetido à extração com gradiente de Percoll.

Todos os passos da extração foram realizados a 4°C para prevenir a degradação do tecido.

4.4.2 Extração com gradiente de Percoll

Foi pipetado 6mL de *Percoll* 80% (v/v) preparado em tampão de gradiente (0,5 M hexilenoglicol (2-metil-2,4-pentandiol), 0,5 M PIPES-KOH (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 5mM 2-mercaptoetanol, 1% Triton X-100) na parte mais inferior de um tubo de acrílico de

fundo redondo (50 mL). Imediatamente acima desta camada foi colocado, lentamente, uma camada de 6mL de *Percoll* 35% também preparado em tampão de gradiente.

O homogeneizado foi pipetado vagarosamente acima do gradiente montado (35% *percoll*), para evitar que as fases se misturassem. Os tubos foram então centrifugados a 2000xg a 4°C por 1 h, em rotor A-4-81 da centrífuga Eppendorf®5810 R.

Após a centrifugação, a solução de núcleos estava entre as camadas de *Percoll* 80% e 35%. A fração de homogeneizado encontrada acima da camada de *Percoll* 35% foi retirada cuidadosamente com uma pipeta *Pasteur* até a proximidade do *Percoll* 35%. A camada de núcleos foi removida também com a ajuda de uma pipeta *Pasteur*, evitando ao máximo a remoção conjunta de *Percoll*.

A fração nuclear foi diluída em 35 mL de tampão de gradiente e inserida novamente em um tubo de acrílico de 50 mL. No fundo do mesmo (abaixo da fração nuclear diluída em tampão de gradiente) foi colocada ainda uma camada de 6mL *Percoll* 35% em tampão de gradiente. Os tubos foram novamente centrifugados a 2000xg a 4°C por 20 min. O pellet enriquecido de núcleos foi ressuspensionado em aproximadamente 35 mL de tampão de gradiente e submetido novamente à extração com gradiente de *percoll*. Dessa forma, encerra-se a primeira etapa de purificação da fração nuclear. Essa fração foi submetida a três novas repetições de purificação seguindo a mesma metodologia de formação de gradientes, buscando eliminar ao máximo quaisquer organelas que possam contaminar a suspensão de núcleos.

Para ressuspensão do *pellet* purificado de núcleos foi utilizado tampão de armazenagem (50mM Tris-HCl (pH 7,8), 10mM 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 5mM MgCl₂, 0,44M sacarose). O volume utilizado foi de três vezes maior que o volume do *pellet*, e foi armazenado a -80°C até a utilização.

4.5 Verificação da integridade e pureza da fração nuclear isolada

A integridade dos núcleos isolados foi verificada por meio da coloração da fração nuclear com orceína aceto láctica.

4.5.1 Microscopia de luz

Para a microscopia de luz, as lâminas foram preparadas utilizando-se 30 μL da suspensão nuclear e 5 μL deorceína aceto láctica a 1% em tampão fosfato salino - PBS.

A fração nuclear permaneceu cerca de 20 min no corante. Em seguida, foram utilizados 10 μL da suspensão já corada para a preparação da lâmina.

As observações, captura de imagens e medidas de diâmetro nuclear foram feitas em microscópio Olympus BX40F4, com câmera digital acoplada a um computador.

4.6 Extração, solubilização e dessalinização de proteínas

As proteínas nucleares foram extraídas da suspensão enriquecida de núcleos utilizando-se o reagente TRI® (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações.

Desta forma, 100 μL de cada amostra foi utilizado para cada 150 μL de reagente TRI®. Quatro lavagens com 0,3M de guanidinhidroclorídrica em 95% de etanol e duas lavagens com etanol 100% foram procedidas.

As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização (7M Uréia, 2M Tiuréia, 10mM DTT, 0,4% Triton) sendo mantidas por 3 dias dentro da câmara fria sob agitação e alternadas agitações no vortex.

A dessalinização das amostras de proteínas torna-se necessária para as próximas etapas e foi realizada com auxílio de colunas Amicon®Ultra da Millipore, GE Helthcare , seletivas para 3000-10000 NMWL.

4.6.1 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se do Kit BioRadProteinAssay (BioRad)®, de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A fim de confirmar a quantificação e a integridade das proteínas foram feitos géis de uma dimensão SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As imagens das proteínas separadas pela eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e coradas com Coomassie Brilliant Blue G 250 foram obtidas por meio de um scanner (*ImageScanner III – EPSON*).

4.7 Digestão e preparo de amostra complexa

Inicialmente, 50 μL de uma solução de $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de cada amostra foram desnaturados com 0,2% de RapiGest SF em água (RapiGest SF, Waters, Illinois, EUA) e incubadas por 15 minutos a 80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (pulso), e 2,5 μL de ditioneitol (DTT) 100 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK) foram adicionados. As amostras foram aquecidas a 60 °C por 30 minutos, resfriadas à temperatura ambiente e novamente centrifugadas (pulso). Em seguida, adicionou-se 2,5 μL de iodoacetamida 300 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK). As amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A digestão foi realizada por meio da adição de 10 μL de uma solução de tripsina (Promega, Wisconsin, EUA) em 50 mM de bicarbonato de amônio, a uma razão de 1:100 enzima/proteína e a amostra foi incubada a 37 °C, por 16 horas. Após a digestão, realizou-se a hidrólise do RapiGest SF, por meio da adição de 10 μL de ácido trifluoroacético 5% (Merck, Hohenbrunn, Alemanha). As amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos e na sequência, foram centrifugadas a 14.000 x g, por 30 min a 6 °C. O sobrenadante foi transferido para frascos de vidro (total recovery vial, Waters, Millford, MA, EUA) ao qual foi seco em SpeedVac (*Concentrator 5301 –Eppendorf*).

Às amostras secas a vácuo foram adicionados 10 μL de solução 0,1% TFA em H_2O . Após esse passo cada uma foi purificada utilizando micro colunas de fase reversa (Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore). Para isso, as colunas foram equilibradas em solução A [100% acetonitrila (ACN), 0,1% (v/v) TFA], solução B [50% (v/v) ACN: H_2O , 0,1% (v/v) TFA] e solução C [100 % H_2O , 0,1% (v/v) TFA], respectivamente. Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, seguindo-se lavagem com solução D [95% H_2O , 5% (v/v) metanol, 0,1% (v/v) TFA]. Para a eluição dos peptídeos, 10 μL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos de vidro borossilicato (Waters Total Recovery vials). Seguiu-se nova concentração a vácuo.

4.8 Identificação e quantificação *shotgun label-free* de proteínas por espectrometria de massas

As amostras foram ressuspensas em 16 μL de Formiato de amônio 20 mM pH10 e 4 μL de Phosphorylase b (SwissProt P00489, padrão interno- 100 fmo. μL^{-1}). Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (*Waters*), acoplado ao sistema Acquity UPLC MClass, com tecnologia 2D (*Waters*). Os peptídeos foram capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry C18 (5 μm , 180 μm x 20 mm) (*Waters*). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18 (5 μm , 300

μm x 50 mm) (*Waters*) e uma coluna analítica Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18 (1.7 μm , 75 μm x 150 mm) (*Waters*). As fases móveis da primeira dimensão são: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico). Essa técnica combina a separação das proteínas usando-se um pH de 10, na separação da primeira dimensão e um pH de 2 na segunda dimensão, com auxílio de colunas de fase reversa (GILAR et al., 2005). A eluição foi realizada utilizando-se 5 gradientes binários diferentes de 20 mM de formiato de amônio pH 10 e acetonitrila, a um fluxo de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A proporção de acetonitrila da primeira fração até a quinta variou de 11,4 a 50%. Os peptídeos eluídos da coluna da primeira dimensão foram diluídos em linha com 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila a um fluxo de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry. A separação, na segunda dimensão, foi realizada com um gradiente binário de 7 a 85% de acetonitrila, em 0,1% (v:v) de ácido fórmico durante 75 minutos, a um fluxo de 500 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) Synapt G2 MS, equipado com uma fonte nanolockspray operando no modo positivo (*Waters*), com ion mobility. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com a cela de ion mobility ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo trap do ‘T-wave’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de m/z entre 50 e 2000.

4.9 Análise e processamento dos dados proteômica

Os dados foram processados utilizando-se o programa ProteinLynx Global Server versão 3.1 (PLGS – Waters) . A identificação dos clusters foi realizada por meio do projeto de EST de cana- de- açúcar, o SUCEST – *SugarcaneExpressedSequenceTag Project* - (<http://sucest-fun.org/wsapp>) contando com 237.954 ESTs que originaram 43.141 *clusters*. Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-

fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

Em casos em que o SUCEST não apresentou resultados, foi utilizado o Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), uma vez que este foi o banco escolhido para a identificação de homólogos no SUCEST, pelo fato daquele consistir em um banco de proteínas curado. O banco SUCEST foi escolhido por constituir o maior projeto de EST de cana-de-açúcar, que gerou cerca de 240.000 ESTs de 26 bibliotecas de cDNA de cana de diferentes tecidos, como folhas, raízes e entrenós, e estádios (VETTORE et al., 2001) e, representa, portanto, o banco de dados mais completo para análises moleculares em plantas de cana-de-açúcar.

Para a predição subcelular das proteínas nucleares foram utilizados cinco programas de acesso livre, que apresentam o núcleo como uma de suas principais organelas, além de permitirem a especificação para células vegetais. Os programas foram WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>), Plant-mPloc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>), BaCelLo (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm>), NucPred (<https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>) e Yloc (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>). A classificação funcional das proteínas consideradas como nucleares foi realizada com base no *GeneOntology*, pela utilização do *Interpro* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (BURGE et al., 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Capacidade de Campo

Para indução do déficit hídrico e recuperação nas plantas referentes aos tratamentos foi realizado o ensaio de capacidade de campo - CC. Define-se capacidade de campo como a quantidade de água retida pelo solo após a drenagem ter ocorrido ou cessado em um solo previamente saturado por chuva ou irrigação (EMBRAPA, 2010). O Déficit Hídrico foi considerado quando os vasos apresentavam 40% CC e a Recuperação quando o valor se aproximava de 75% CC e as plantas já apresentavam sinais de melhora. Na Figura 3, tem-se um gráfico onde são mostrados os dias de coleta, os respectivos conteúdos de água (kg) nos vasos e os valores de referência para determinação da CC. No Dia 1, todos os tratamentos estavam bem irrigados e apresentaram valores próximos a 100% CC, a partir desse dia os vasos pararam de ser agudados para dar início ao processo de indução do estresse. No Dia 6, as amostras dos tratamentos Déficit Hídrico e Recuperação já apresentavam sinais de estresse, em torno de 50%. No Dia 9 foi realizada a coleta das amostras do tratamento Déficit Hídrico, as quais apresentavam 40% CC e as plantas da Recuperação começaram a ser reidratadas. Por fim, no Dia 15 as amostras do tratamento de Recuperação foram coletadas, com 75% CC.

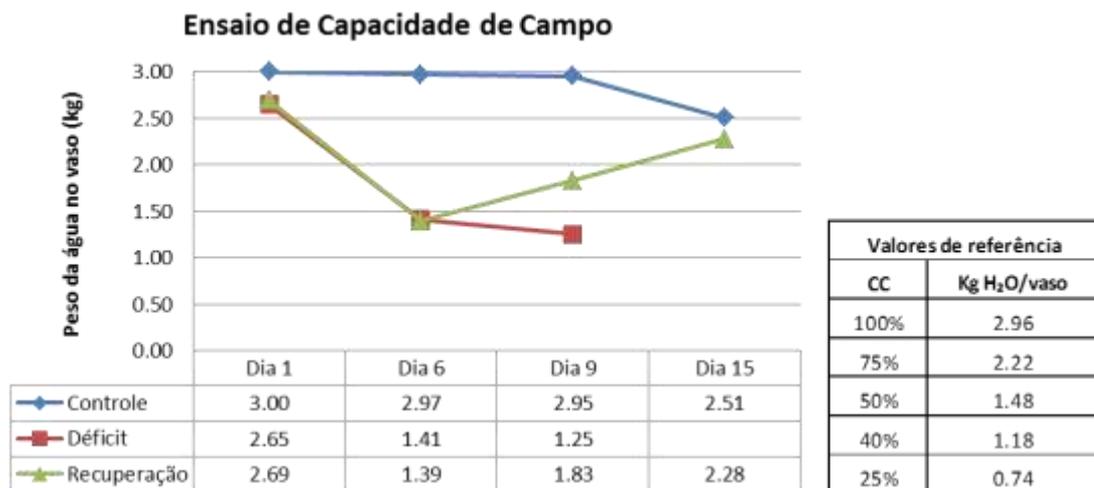


Figura 3 – Ensaio de Capacidade de Campo. São mostrados os dias de coleta após a indução do processo de Déficit Hídrico e Recuperação nas plantas e valores de referência para determinação da capacidade de campo. Dia 1 – amostras irrigadas e em 100% CC; Dia 6 – tratamentos Déficit Hídrico e Recuperação sem irrigação e 50% CC; Dia 9 – coleta das amostras de Déficit Hídrico com 40% CC e início da reidratação das amostras de Recuperação; Dia 15 – coleta das amostras de Recuperação com 75% CC

5.2 Processamento de dados metabólica

Os dados obtidos foram processados em duas etapas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3. Inicialmente, os cromatogramas gerados foram exportados para o programa *ChromaTOF*, versão 4.32, no qual foi realizada a correção da linha de base e conversão dos dados para arquivos netCDF. O cromatograma da Figura 4 ilustra a separação de amostras complexas, onde o tempo de retenção é característico de cada classe (aminoácidos, açúcares, entre outras).

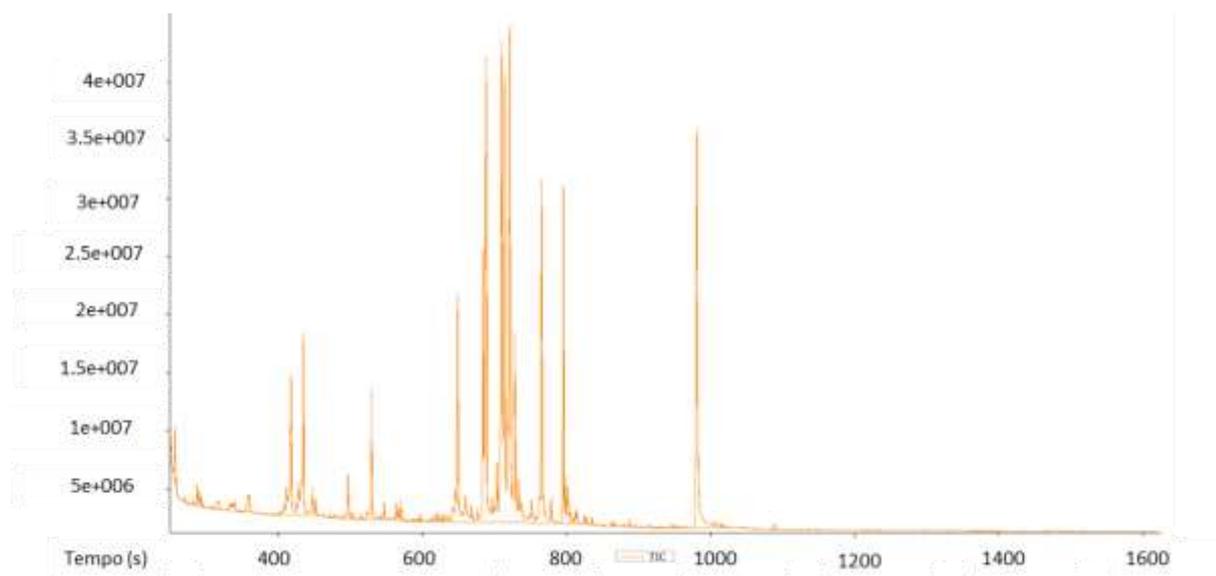


Figura 4 – Cromatograma ilustrando a separação de amostras complexas. O eixo da abscissa indica o tempo de retenção - RT de cada provável metabólito. O eixo da ordenada indica a intensidade TIC - contagem iônica total (*total ion chromatogram*)

No final da análise realizada pelo pacote *TargetSearch*, com a finalidade de validá-la, foi possível visualizar o padrão de fragmentação dos metabólitos selecionados e compará-los com o espectro de fragmentação da referência, disponíveis na biblioteca utilizada. Essa validação foi representada na Figura 5, onde o espectro da sacarose foi comparado com seu respectivo espectro da referência. Na Figura 6, foi representado o alinhamento das massas características da sacarose, encontrada nas amostras, sendo possível visualizar o coreto alinhamento das massas no Index de Retenção (RI) característicos do composto, 2622.87 e 2623.702

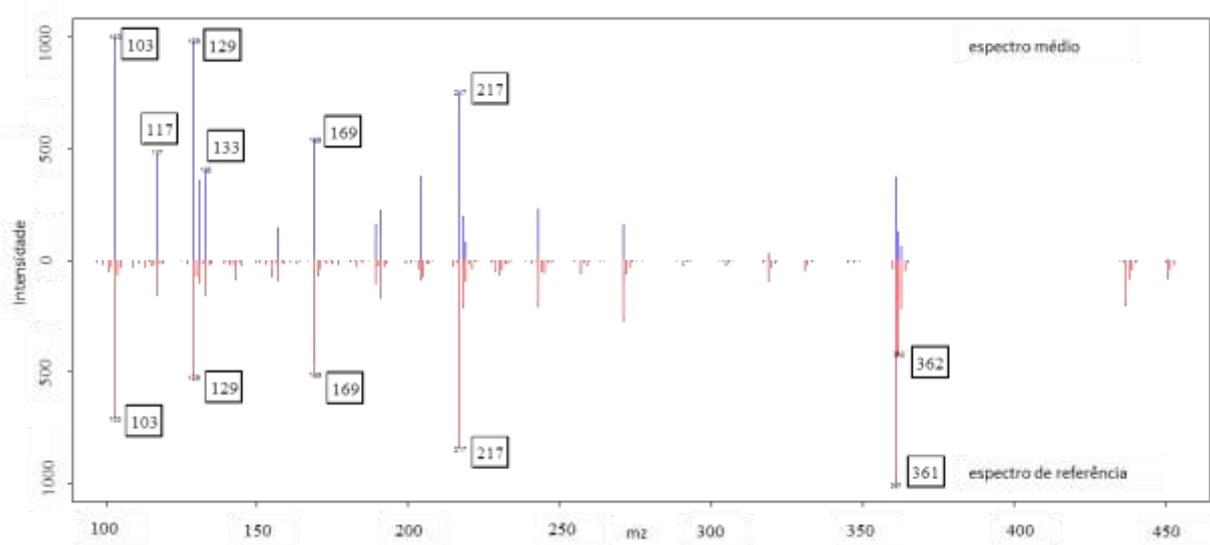


Figura 5 – Comparação do espectro de massa da sacarose. Em azul estão representados os picos experimentais encontrados em todas as amostras, e em vermelho o espectro de referência da biblioteca utilizada (*The Golm Metabolome Database - GMD*)

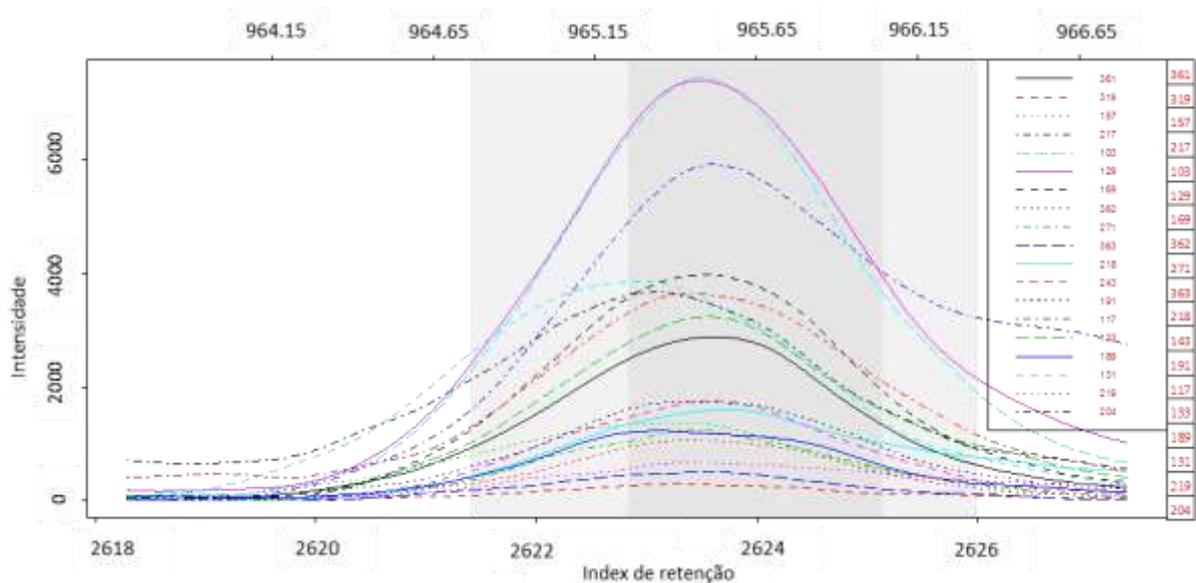


Figura 6 – Representação da área do pico cromatográfico dos íons fragmentados característicos da sacarose

5.3 Identificação dos metabólitos totais

Os metabólitos foram identificados utilizando-se a biblioteca GMD, de acordo com os parâmetros citados no item 4.3. Um total de 86 compostos, representados na Tabela 1, apresentou reprodutibilidade entre as seis repetições, três repetições biológicas e três técnicas, analisadas de cada tratamento.

Cada metabólito possui o seu “ID”, número de identificação que o representa na biblioteca. O IR da amostra foi confrontado com o IR da biblioteca. As três principais massas características de cada composto também estão representadas na Tabela 1. Como, para um dado metabólito, quanto mais próximo forem os picos detectados dos seus respectivos tempos de retenção, mais próximas as intensidades relativas dos fragmentos estão dos picos definidos, e, quanto maior a correlação entre as intensidades desses fragmentos, maior o *score*, foram considerados metabólitos que apresentaram *score* igual ou maior de 600 (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009).

Ainda na Tabela 1 estão descritos os números de referência dos metabólitos no KEGG, banco que foi utilizado para encontrar as vias metabólicas nas quais os compostos participam, sendo assim, possível relacioná-los com as suas prováveis funções nos mecanismos de resposta ao déficit hídrico e à recuperação da planta, que serão discutidos posteriormente.

Tabela 1 – Metabólitos totais presentes nas amostras e identificados pela biblioteca GMD

(continua)

Nome	ID	IR Biblioteca	IR Amostras	Mass count	Massas	Score	KEGG
Propane-1,2-diol	3	988	990.94	3	133; 119; 115	813	C00583
3-Cyanopyridine	17	1022.2	1021.18	3	104; 105; 88	608	
2-Hydroxypyridine	27	1031.31	1033.17	4	167; 136; 122	938	C02502
Lactic acid	25	1044.47	1043.49	5	191; 133; 118	900	C00186, C00256, C01432
Pyruvic acid	35	1072.79	1070.21	11	189; 133; 131	623	C00022
Alanine	40	1088.46	1089.86	4	190; 218; 133	622	C00041
Oxalic acid	54	1118.32	1120.23	3	147; 133; 103	974	C00209
2-Aminoisobutyric acid	101	1129.96	1133.03	4	130; 102; 114	851	C01234, C03665
3-Hydroxypyridine	62	1136.97	1139.97	5	152; 167; 136	918	
Benzyl alcohol	73	1152.05	1148.76	3	135; 105; 136	767	C00556
Methyl dihydrogen phosphate	108	1167.37	1167.28	4	241; 256; 163	941	
Succinic-acid methylester	99	1168.56	1171.61	3	89; 90; 76	853	
Succinic semialdehyde	97	1177.1	1179.63	7	89; 85; 90	853	C00232
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	114	1189.12	1188.37	3	89; 172; 129	790	
Norvaline	153	1229.91	1227.31	9	144; 218; 100	885	C01799, C01826
Benzoic acid	176	1251.31	1249.39	5	179; 105; 135	771	C00180
Oxamic acid	149	1254.93	1253.45	9	190; 72; 103	738	C01444
2-Oxocaproic acid	221	1252.87	1255.34	4	189; 99; 70	736	
Phosphoric acid	185	1262.42	1262.82	13	314; 211; 283	774	C00009
Threonine	217	1290.45	1287.52	5	117; 219; 118	827	C00188, C00820
Nicotinic acid	230	1300.8	1304.64	4	180; 136; 106	942	C00253
Succinic acid	240	1310.36	1311.13	6	247; 172; 129	725	C00042

Tabela 1 – Metabólitos totais presentes nas amostras e identificados pela biblioteca GMD

(continuação)

Nome	ID	IR Biblioteca	IR Amostras	Mass count	Massas	Score	KEGG
Itaconic acid*	251	1339.09	1341.05	9	259; 215; 230	773	C00490
methylester Malic-acid	277	1365.91	1369.36	11	175; 133; 131	640	
Se-methyl-L-selenocysteine	275	1378.03	1373.05	6	134; 135; 130	623	C05689, C08293
Threonic acid-1,4-lactone	311	1372.65	1372.60	15	147; 101; 116	772	
3-Methylglutaric acid	347	1421.75	1420.88	5	117; 72; 133	643	
Aspartic acid	377	1429.78	1431.42	3	160; 130; 117	823	
Threose	429	1445.33	1448.66	16	205; 117; 89	797	C06463
Malic acid	462	1478.99	1482.26	12	233; 245; 335	609	C00149, C00711
4-Hydroxybenzaldehyde	473	1483.88	1486.11	10	176; 177; 135	630	
Dihydrouracil	563	1488.18	1488.75	4	100; 70; 114	603	C00429
4-Hydroxyproline	514	1517.3	1517.69	3	230; 140; 158	643	C01015, C01157, C03651
Pyroglutamic acid	515	1521.72	1521.84	9	156; 258; 230	960	C01879, C02237, C02238
Erythronic acid	532	1528.56	1527.01	14	117; 205; 103	789	C01620
Creatinine	546	1553.67	1549.57	4	314; 171; 100	845	C00791
Phenylalanine	568	1556.05	1559.86	8	120; 146; 91	683	C00079
2-Oxoglutaric acid	585	1572.85	1571.97	6	198; 288; 156	837	C00026
2-Hydroxyglutaric acid	590	1569.38	1572.02	3	247; 203; 204	866	C02630, C03196
Digitoxose	616	1602.43	1598.18	11	117; 131; 133	888	
Triethanolamine	645	1620.5	1622.23	5	117; 130; 144	688	C06771
6-deoxy-Mannopyranose	653	1626.43	1628.10	13	204; 205; 191	738	
5-Acetamidopentanoic acid	676	1634.91	1631.26	6	174; 156; 100	646	
3-Ureidopropionate	651	1636.47	1636.12	9	146; 100; 129	794	C02642
4-Hydroxybenzoic acid	661	1633.29	1637.02	14	267; 223; 282	905	C00156

Tabela 1 – Metabólitos totais presentes nas amostras e identificados pela biblioteca GMD

(continuação)

Nome	ID	IR Biblioteca	IR Amostras	Mass count	Massas	Score	KEGG
Taurine	727	1668.74	1666.48	7	174; 100; 130	753	
Ribose	731	1665.99	1669.19	10	217; 103; 189	714	C00652, C08353
similar to Asparagine -H2O	756	1687.68	1688.15	8	142; 172; 91	666	C00152, C01905, C16438
Ribitol	809	1712.74	1714.45	5	217; 205; 117	615	C00121, C00474
cis-Aconitic acid	862	1741.1	1741.08	12	229; 285; 375	905	C00417, C02341
Lyxonic acid-1,4-lactone	846	1739.07	1741.65	3	259; 117; 129	890	C00652
n-Octadecane	945	1799.99	1797.80	3	71; 86; 140	904	C19641
Calystegine B2	999	1798.43	1799.77	5	217; 118; 218	878	C10851
Galactose	992	1815.46	1811.28	4	217; 117; 189	797	C00124
D-Fructose	1052	1830.06	1833.66	8	257; 230; 117	600	C00095, C00247, C01496, C02336, C05003, C05006, C10719, C10906
Jasmonic acid	1026	1837.26	1835.71	3	180; 311; 94	873	C08491
Dehydroascorbic acid	1112	1867.12	1867.39	9	157; 173; 245	720	C05422
Galactitol	1228	1924.07	1927.46	20	319; 307; 157	709	C01697
Swainsonine	1244	1944.61	1940.86	4	117; 299; 118	907	C10173
Glucaric acid-1,4-lactone	1236	1944.05	1947.55	9	244; 347; 143	789	
Gulonic acid	1266	1952.77	1953.87	22	333; 292; 423	638	C00191
Coniferyl aldehyde	1272	1960.41	1959.21	6	279; 218; 264	692	C02666
Galactonic acid	1307	1980.32	1978.67	13	292; 319; 305	732	C00191, C00880
Gluconic acid	1323	1984.83	1988.10	5	319; 157; 129	624	C00191, C00257
N-Acetylmannosamine	1437	2081.56	2085.35	18	205; 157; 129	630	
Glucoheptose	1516	2139.92	2139.89	20	191; 217; 259	633	

Tabela 1 – Metabólitos totais presentes nas amostras e identificados pela biblioteca GMD

(conclusão)

Nome	ID	IR Biblioteca	IR Amostras	Mass count	Massas	Score	KEGG
Octadecanoic acid	1626	2243.45	2242.72	21	341; 356; 117	915	C01530
Galacturonic acid-1-phosphate	1689	2376.58	2375.13	13	217; 133; 204	790	
Salicylic acid glucoside	1881	2568.38	2567.67	4	217; 169; 204	617	
Sucrose	1916	2622.87	2623.70	19	361; 319; 157	732	C00089
Lactose	1920	2640.31	2637.89	4	204; 191; 129	843	
Alpha-alpha-threulose	2019	2749.97	2746.89	5	204; 217; 129	717	C01083
Leucrose	2035	2753.01	2756.11	6	361; 204; 217	766	
Sophorose	2075	2781.6	2781.27	17	103; 129; 205	823	C19632
N-Glycolylneuraminic acid	2089	2795.74	2792.83	4	103; 217; 133	846	C03410
Palatinose	2129	2817.18	2818.87	9	204; 361; 271	841	C01742
Uridine 5'-monophosphate	2161	2838.36	2835.99	3	169; 243; 72	860	C00105
Secologanin	2132	2858.53	2854.13	9	103; 204; 129	803	C01852
2-Methoxyestrone	2140	2861.19	2863.50	3	79; 218; 77	802	C05299
alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-mannitol	2151	2894.4	2891.00	16	204; 169; 103	791	
Chlorogenic acid	2245	2977.33	2978.20	3	345; 255; 307	741	C00852
Cryptochlorogenic acid	2355	3154.54	3158.16	7	307; 324; 255	922	
Tetratriacontane	2474	3405.25	3407.10	4	71; 85; 99	896	

5.4 Análises comparativas entre os tratamentos

5.4.1 Análise comparativa entre os tratamentos Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

Os metabólitos totais obtidos foram submetidos a análises multivariadas para a visualização da separação entre os tratamentos no que diz respeito ao conteúdo metabólico. Na Figura 7, tem-se a representação gráfica da separação dos tratamentos em grupos, cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais (SZYMAŃSKA et al., 2012). Cada componente explica uma porcentagem da variação existente entre os grupos. É possível observar que as três primeiras componentes principais explicam 50% da variância total (Figura 8). Nessa figura é demonstrado o pareamento dos *scores plots* entre as componentes e a variância explicada de cada componente é mostrada na sua célula diagonal correspondente. Na Tabela 2, estão os principais parâmetros de validação do PLS-DA realizado, como a Acurácia, R^2 e Q^2 . Nessa tabela é importante observar que as três componentes apresentam acurácia igual a 0,94, R^2 igual a 0,97 e Q^2 igual a 0,77. Portanto, esses critérios observados determinam que a separação dos tratamentos é confiável, ou seja, os tratamentos são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo metabólico.

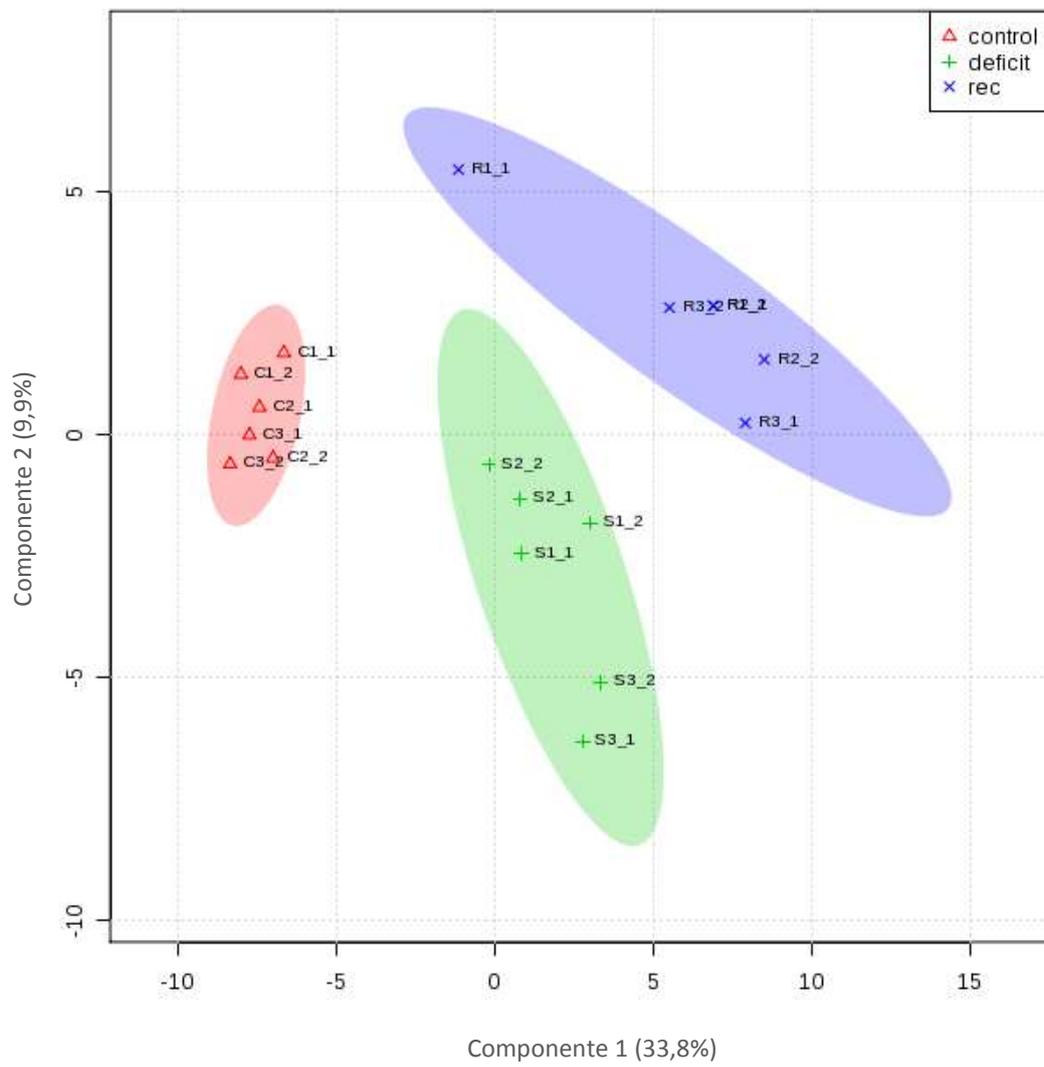


Figura 7 – PLS-DA do perfil metabólico de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle (C), Déficit Hídrico (S) e Recuperação (R)

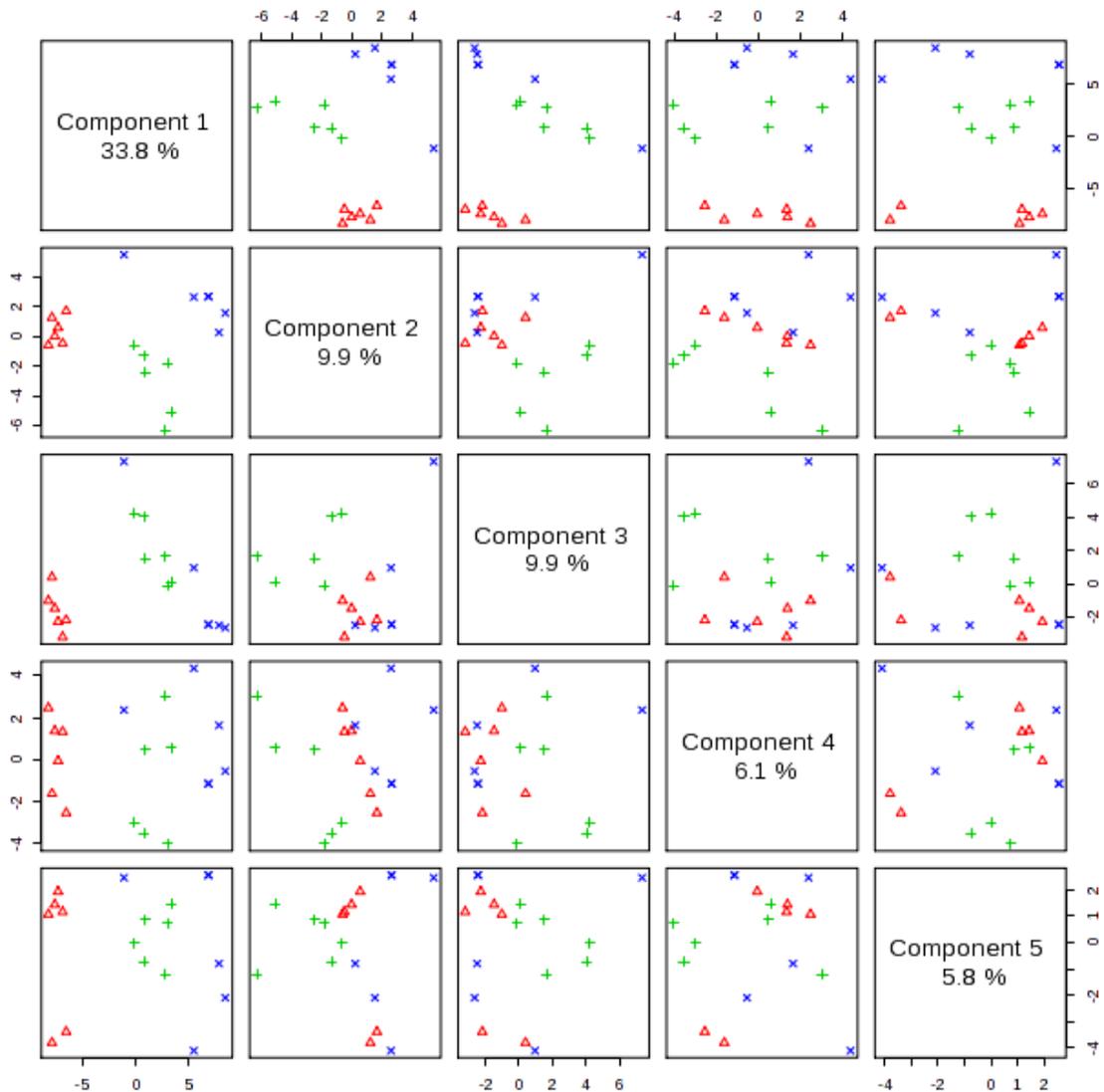


Figura 8 – *Scores plots* do PLS-DA. A variância explicada de cada componente é mostrada na sua célula diagonal correspondente

Tabela 2 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos três tratamentos: Controle, Déficit Hídrico e Recuperação. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
Acurácia	0,3333	0,9444	0,9444
R²	0,8370	0,9373	0,9749
Q²	0,7541	0,7696	0,7737

Em seguida, para identificação dos metabólitos responsáveis pelo agrupamento visualizado no PLS-DA (Figura 7), ou seja, os diferenciais entre os tratamentos, foram feitas duas considerações. A primeira foi o VIP e a segunda foi em relação ao *p value* fornecido pela ANOVA entre os tratamentos. Portanto, foram considerados diferencialmente abundantes

entre os tratamentos os metabólitos que obtiveram soma dos VIPs maior que 1 e *p value* significativo ($p < 0,05$). Esses metabólitos foram representados na Figura 9.

Ainda na Figura 9, é possível observar um gradiente de concentração representado por cores. A escala de cor indica a abundância relativa do metabólito correspondente em cada tratamento que foi estudado. A cor verde indica baixa concentração, a amarela média e a vermelha alta concentração. Deste modo, é possível observar o comportamento dos metabólitos diferencialmente abundantes nos tratamentos e assim buscar melhor entendimento a respeito da dinâmica metabólica que ocorre nas vias afetadas pelo déficit hídrico e com a recuperação das plantas.

Nome	ID	VIPs	valor <i>p</i>	C	S	R
Salicylic acid glucoside	1881	2.49002	6.48E-18	Red	Green	Yellow
similar to Aspartic acid	377	2.12642	1.16E-12	Green	Red	Yellow
Uridine 5'-monophosphate	2161	2.0394	2.01E-11	Green	Red	Yellow
Cryptochlorogenic acid	2355	1.98084	5.25E-08	Green	Yellow	Red
Malic acid	462	1.82496	0.0026965	Green	Yellow	Red
Itaconic acid	251	1.81824	0.0011284	Green	Yellow	Red
Methyl dihydrogen phosphate	108	1.81818	2.06E-05	Yellow	Green	Red
Chlorogenic acid	2245	1.77938	0.00093653	Green	Yellow	Red
2-Hydroxypyridine	27	1.72548	0.006033	Green	Yellow	Red
2-Hydroxyglutaric acid	590	1.68886	0.0056864	Green	Yellow	Red
Phosphoric acid	185	1.5413	0.030012	Green	Yellow	Red
3-Cyanopyridine	17	1.5392	0.03378	Red	Yellow	Green
Swainsonine	1244	1.47822	9.39E-05	Yellow	Green	Red
Gulonic acid	1266	1.15734	2.16E-07	Green	Red	Yellow
N-Glycolylneuraminic acid	2089	1.14986	0.0001531	Green	Yellow	Red
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	114	1.09802	2.41E-05	Red	Yellow	Green
Alpha-alpha-threulose	2019	1.07154	6.50E-05	Green	Yellow	Red
5-Acetamidopentanoic acid	676	1.04596	0.00048236	Yellow	Red	Green
alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-mannitol	2151	1.023916	6.87E-05	Green	Yellow	Red
Threonine	217	1.018842	2.69E-06	Red	Yellow	Green
Succinic semialdehyde	97	1.000616	1.34E-05	Red	Yellow	Green

Figura 9 – Metabólitos diferencialmente abundantes entre as amostras Controle, Déficit Hídrico e Recuperação. vermelho – alta concentração; verde – baixa concentração; amarelo – concentração intermediária

Os dois metabólitos que serão discutidos a seguir foram escolhidos por serem os que possuem os maiores valores de VIP, ou seja, os metabólitos com maior influência sobre a variância existente entre os grupos. São metabólitos comuns aos dois processos estudados,

defesa ao déficit hídrico e mecanismo de recuperação, e dessa forma participam do processo de resposta da planta contra o déficit hídrico de maneira geral.

O metabólito *Salicylic acid glucoside* (ID 1881) é o metabólito com o maior VIP (2,49), isso faz dele o principal responsável pela separação dos tratamentos em grupos, no que diz respeito ao conteúdo metabólico. No Déficit Hídrico há uma diminuição na concentração desse composto, comparado à amostra controle, a qual é parcialmente recuperada no tratamento de Recuperação.

Muitos metabólitos conjugados são encontrados em uma grande variedade de espécies de plantas. Dessa forma, não é surpresa que o ácido salicílico – AS também seja encontrado conjugado com outros compostos, principalmente por glicosilação ou, menos frequentemente, pela esterificação (RYAN et al., 1995). A conjugação da glicose no grupo hidroxil do ácido salicílico resulta na formação do *salicylic acid glucoside* - SAG como principal conjugado, enquanto a conjugação de uma glicose no grupo carboxil produz éster ácido salicílico glicose em pequenas quantidades. Essas reações de conjugação podem ser vistas na Figura 10.

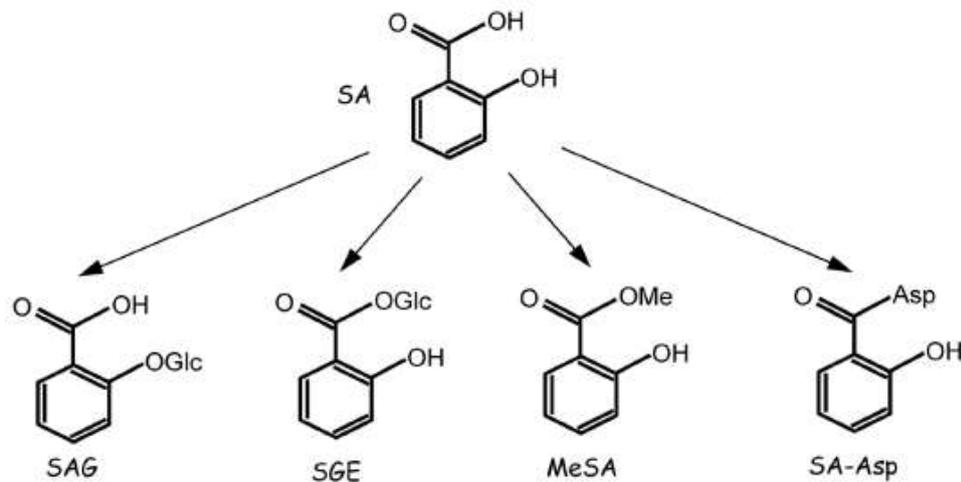


Figura 10 – Conversão do AS para diferentes formas. SAG (salicylic acid glucoside). SGE (salicyloyl glucose ester). MeSA (methyl salicylate) SA-Asp (salicyloyl-L-aspartic acid)

Fonte: Adaptada Dempsey et al. (2011)

O *salicylic acid glucoside* corresponde à forma como a maior parte do ácido salicílico é acumulado nas plantas (TOUNEKTI; HERNÁNDEZ, 2013). A falta de SAG nos exsudatos do floema faz dele um candidato plausível para a forma transportada de AS (DEAN; MILLS, 2004). O ácido salicílico também é conhecido por atuar na regulação das células-guarda dos estômatos. Os efeitos atribuídos ao AS, como agente mitigador do estresse hídrico, compreendem desde os aumentos na capacidade antioxidante da planta e na estabilidade das membranas pelo decréscimo no nível de peroxidação de lipídios, até aumentos na capacidade fotossintética e no acúmulo de biomassa. A menor abundância no Déficit Hídrico indica a

sensibilidade das plantas ao estresse induzido, assim como o início da recuperação dos níveis de SAG após a reidratação, reafirma a função desse metabólito no mecanismo de recuperação da planta.

A regulação da abertura dos estômatos é um mecanismo adaptativo que auxilia a resistência das plantas contra condições ambientais extremas, incluindo a seca. Os estômatos exercem uma função importante na captação de CO₂ e transpiração. Durante o déficit hídrico, os estômatos são fechados para menor transpiração e conservação da água na planta, diminuindo assim o suprimento de CO₂ e levando a redução da fotossíntese. A abertura ou fechamento dos estômatos são ativados pelas células-guarda (LIU, 1998). Um aumento nos níveis de AS endógeno promove o fechamento dos estômatos. Esse fechamento é provavelmente provocado pela geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), que foram induzidas pelo AS (MELOTTO et al., 2006). Estudos recentes têm dado considerável importância à habilidade do AS de induzir efeitos de proteção (adaptação e resistência), em plantas sob estresse hídrico (MAZZUCHELLI; SOUZA; PACHECO, 2014). Alguns demonstraram que a aplicação exógena do AS diminuiu o efeito do estresse hídrico sobre as plantas. Hayat et al. (2008) mostraram que o tratamento de plantas de tomate com déficit hídrico com concentrações pequenas de AS melhoraram sua tolerância ao estresse por seca. Plântulas de trigo sujeitas à seca e tratadas com AS exibiram alto conteúdo de água e também maior conteúdo de matéria seca, atividade carboxilase da Rubisco, total de conteúdo de clorofila comparado ao tratamento controle (SINGH; USHA, 2003).

O metabólito *similar to Aspartic acid* (ID 377) apresentou alta concentração no Déficit Hídrico, diminuiu nas amostras de Recuperação, mostrando uma tendência a voltar para a concentração das amostras Controle. Analisando suas principais massas identificadas, foi constatado que as mesmas não são iguais às referentes ao *Aspartic acid*, da biblioteca GMD. Dessa forma, para não proceder a uma discussão errônea e não descartar a importância deste metabólito nas análises realizadas, ele foi aqui discutido como um aminoácido.

Aminoácidos na forma solúvel são chaves importantes do metabolismo geral das plantas, mas a principal função é como constituinte das proteínas (MEDICI et al., 2004). Aminoácidos são precursores de hormônios e moléculas responsáveis pela sua resistência a diversos tipos de estresses, sejam eles bióticos ou abióticos. A ação fisiológica dos aminoácidos na planta promove desde um maior desenvolvimento da parte aérea, como aumento do sistema radicular e, por fim, resistência a estresses, como déficit hídrico, ataque por pragas, entre outros. Os aminoácidos são requeridos, quando em situação de estresse, na otimização do uso da energia assimilada pela planta. Lisina, treonina, metionina e isoleucina

são aminoácidos essenciais que compartilham um precursor comum, *aspartic acid*, em uma via ramificada e complexamente regulada (AZEVEDO; LEA, 2001).

Mudanças nas concentrações de aminoácidos livres e ácidos orgânicos específicos foram analisadas durante a indução do estresse por seca em *Brassica napus*. Muitos dos aminoácidos mostraram um crescimento linear com a indução da seca em folhas de *Brassica*, aumento cerca de 5,9 vezes com relação aos níveis controle, seguido por uma redução da concentração após a reidratação das plantas (GOOD; ZAPLACHINSKI, 2006).

5.4.2 Análise comparativa entre os tratamentos Controle e Déficit Hídrico

Para análise comparativa entre os tratamentos Controle e Déficit Hídrico os metabólitos totais também foram submetidos ao PLS-DA com o objetivo de identificar os que se destacam em relação à resposta ao estresse. Dessa forma, assim como descrito no item 5.3.1, na Figura 11 observa-se que as duas primeiras componentes principais representam 50% da variância total da análise. Na Tabela 3 também estão os principais parâmetros de validação da análise, Acurácia igual a 1,0, R^2 igual à 0,99976 e Q^2 igual à 0,95987. Portanto, esse conjunto de critérios observados determinam que os tratamentos Controle e Déficit Hídrico são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo metabólico.

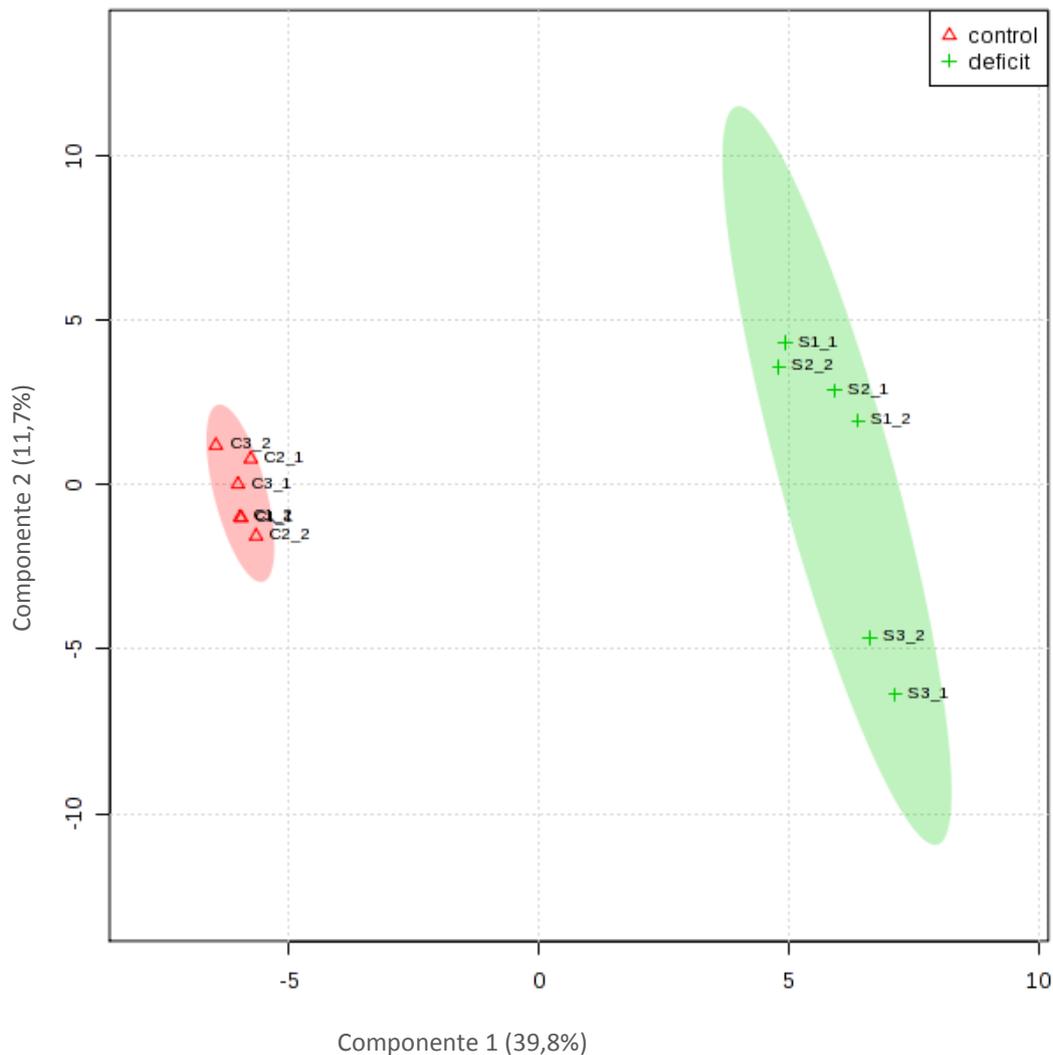


Figura 11 – PLS-DA de perfil metabólico de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle (C) e Déficit Hídrico (S)

Tabela 3 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos dois tratamentos: Controle e Déficit Hídrico. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5
Acurácia	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
R²	0,98896	0,99676	0,99856	0,99942	0,99976
Q²	0,95015	0,96045	0,96229	0,96111	0,95987

Em seguida, para identificação dos metabólitos responsáveis pelo agrupamento visualizado no PLS-DA, ou seja, os diferenciais entre os tratamentos foram feitas as mesmas considerações já descritas no item 5.3.1. Assim, foram considerados diferencialmente abundantes entre os tratamentos os metabólitos que obtiveram VIP maior que 1 e *p value* significativo ($p < 0,05$). Esses metabólitos estão representados na Figura 12.

O gradiente de concentração também é observado na Figura 12, seguindo os mesmos padrões de cores 5.3.1. Além disso, os metabólitos marcados com asterisco (*) são preferencialmente abundantes no tratamento de Déficit Hídrico, uma vez que não estão presentes na análise comparativa entre Controle e Recuperação que será descrita no próximo item.

Nome	ID	VIPs	valor <i>p</i>	Fold Change	log2(FC)	C	S
Salicylic acid glucoside	1881	2.71332	4.78E-12	118.94	6.8941	Red	Red
similar to Aspartic acid	377	2.4334	4.80E-09	0.019075	-5.7122	Green	Red
Uridine 5'-monophosphate	2161	2.30322	1.82E-08	0.028353	-5.1404	Green	Red
Cryptochlorogenic acid	2355	2.11424	5.11E-07	0.04461	-4.4865	Green	Red
Chlorogenic acid	2245	1.81494	0.000865	0.051207	-4.2875	Green	Red
Itaconic acid	251	1.78002	0.0012953	0.046645	-4.4221	Green	Red
Coniferyl aldehyde	1272	1.73272	1.76E-06	0.13111	-2.9311	Green	Red
Phenylalanine	568	1.6879	1.66E-05	0.13765	-2.8609	Green	Red
Gulonic acid	1266	1.66846	1.31E-05	0.14801	-2.7563	Green	Red
2-Hydroxyglutaric acid	590	1.4998	0.013497	0.054823	-4.1891	Green	Red
Galacturonic acid-1-phosphate*	1689	1.42798	6.75E-05	0.24555	-2.0259	Green	Red
4-Hydroxybenzaldehyde*	473	1.41516	0.01416	0.077156	-3.6961	Green	Red
Pyroglutamic acid*	515	1.32842	0.042776	0.18336	-2.4472	Green	Red
Creatinine*	546	1.291	3.47E-05	0.32124	-1.6383	Green	Red
Taurine*	727	1.21006	1.70E-05	2.8834	1.5278	Red	Green
Threonic acid-1,4-lactone*	311	1.17872	0.0010772	0.32035	-1.6423	Green	Red
Oxamic acid	149	1.16198	0.00037638	2.7248	1.4462	Red	Green
Nicotinic acid*	230	1.1385	1.13E-05	2.4588	1.298	Red	Green
Succinic semialdehyde*	97	1.08718	2.23E-05	2.2933	1.1974	Red	Green
N-Glycolylneuraminic acid	2089	1.07812	0.00047289	0.42042	-1.2501	Green	Red
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	114	1.06366	0.00016093	2.3623	1.2402	Red	Green

Figura 12 - Metabólitos diferencialmente abundantes entre as amostras Controle e Déficit Hídrico . vermelho – alta concentração; verde – baixa concentração

A discussão sobre os metabólitos preferencialmente abundantes no Déficit Hídrico foi conduzida de duas maneiras, primeiro considerando os metabólitos que participam de vias em comum representadas pela Figura (13) e segundo considerando os metabólitos que participam de outras vias e foram discutidos somente pela sua função no mecanismo de defesa da planta.

De acordo com o KEGG, as vias metabólicas comuns entre os metabólitos preferencialmente abundantes da Tabela 5 são as de biossíntese de alcaloides derivados da *ornithine*, *lysine* e *nicotinate* e de biossíntese de fenilpropanoides, representadas na Figura 13.

Nelas, destacam-se os metabólitos preferencialmente abundantes no tratamento de déficit hídrico que serão discutidos a seguir.

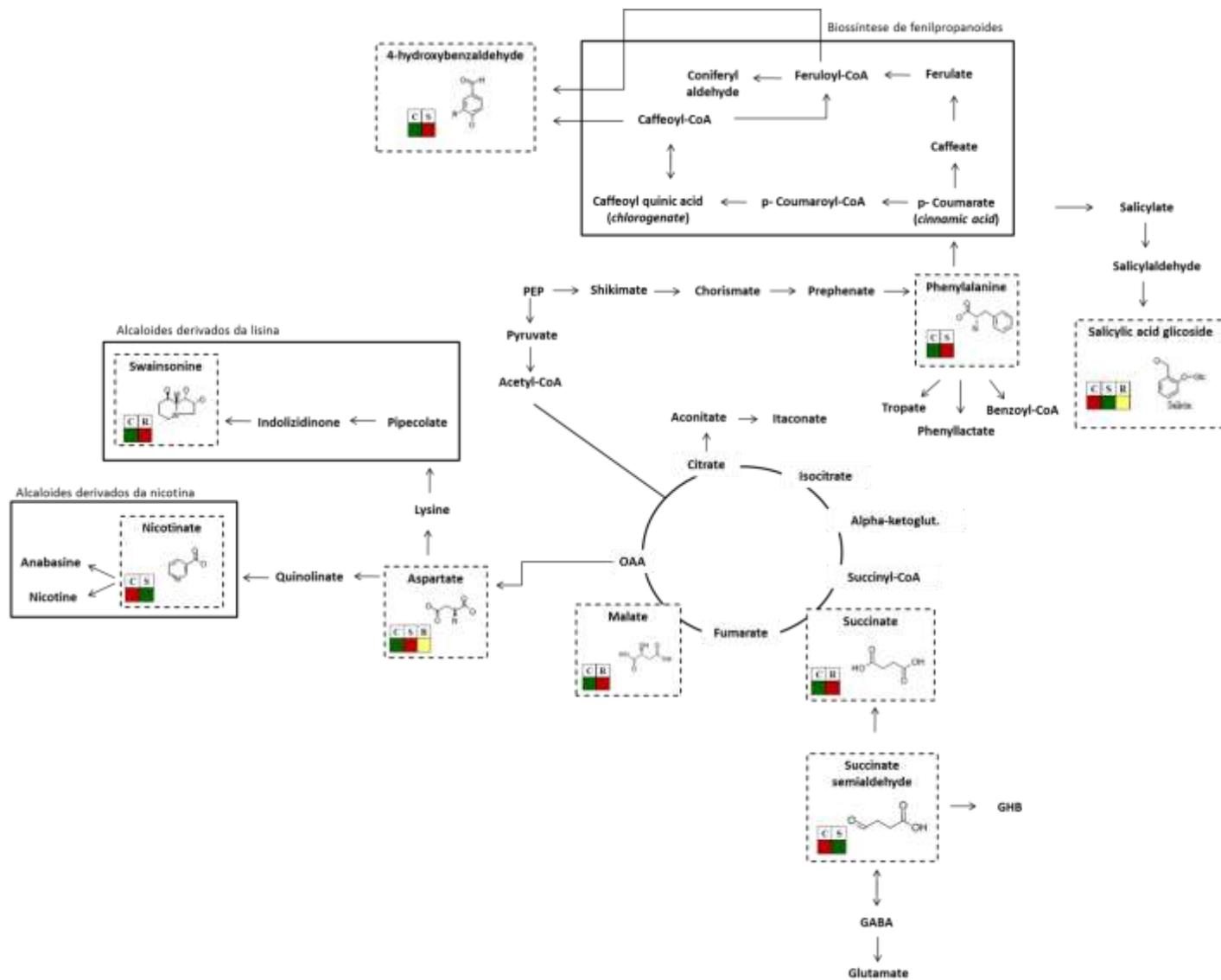


Figura 13. Vias metabólicas em comum entre os metabólitos diferencialmente e preferencialmente (marcados com * nas tabelas) abundantes nos tratamentos.

Os alcaloides e outros metabólitos secundários são conhecidos por melhorar os níveis de produtividade das plantas, seja por auxiliar a defesa contra estresses bióticos e abióticos ou por afetar polinizadores e os dispersores de sementes/fruto. Muitas das situações de estresses para a planta modulam a indução de alcaloides assim como de outros metabólitos secundários. Mudanças na intensidade de radiação solar, temperatura, seca e composição de nutrientes no solo são exemplos de estresse abiótico que podem afetar a concentração de alcaloides em plantas (MANNERS, 2015)

O metabólito *Nicotinic acid* (ID 230) exibiu valor de *Fold Change* - FC de 1.29 vezes maior no Controle do que no Déficit Hídrico. Essa menor concentração nas plantas estressadas se deve ao fato de ser um precursor da via de síntese dos alcaloides *anatabine* e *nicotine*, ambos citados em estudos que envolvem estresse abiótico em plantas.

Em folhas e raízes de *Nicotiana tabacum L.*, o *nicotine* é o alcaloide predominante, sendo *anatabine* o menos abundante. O anel de *nicotine* é derivado da diamina *putrescine*, o qual pode ser sintetizado tanto diretamente da *ornithine* via ação da ornitina descarboxilase (ornithine decarboxylase - ODC), ou da *arginine* via processo enzimático de três etapas, iniciado pela arginina descarboxilase (arginine decarboxylase - ADC) (DEBOER et al., 2011). Um importante precursor para a formação do anel do *nicotine* é a diamina *putrescine*, que é utilizada na síntese das poliaminas *spermidine* e *spermine*. Esses cátions orgânicos são encontrados nas células de todos os organismos. Em plantas, *spermidine* é geralmente considerado essencial para viabilidade, enquanto *spermine* não é essencial para a sobrevivência da planta, mas exerce função importante de melhorar tolerância a estresses abióticos (TAKAHASHI; KAKEHI, 2010). Segundo Iriti e Faoro (2009), a função dessas poliaminas, importantes precursores dos alcaloides, tem sido correlacionada com tolerância à exposição ao ozônio. Além disso, níveis menores de *nicotine* em plantas de tabaco expostas a ozônio têm sido relacionados à maior susceptibilidade ao ataque de larvas da mariposa *Manduca sexta*. Muitos estudos relataram aumento da sobrevivência de diferentes espécies de insetos em plantas, sob condições de estresse abiótico, no caso a exposição ao ozônio, confirmando o efeito prejudicial do poluente as defesas químicas da planta.

O metabólito *Phenylalanine* (ID 568) exibiu valor de FC de 2.86 vezes maior no Déficit Hídrico do que no Controle.

Essa maior concentração observada nas plantas estressadas está relacionada ao fato de ser um precursor de vias que formam compostos de defesa da planta, como os fenilpropanóides, antocianinas, entre outros. A composição metabólica dos fenilpropanóides possui várias funções, entre elas, a de proteção contra diversos estresses bióticos e abióticos.

Aproximadamente 1% dos metabólitos secundários derivados da *phenylalanine* são compostos voláteis envolvidos em reprodução das plantas e respostas de defesa. (DUDAREVA et al., 2006). A classe dos compostos fenólicos constitui o mais diverso conjunto de metabólitos secundários encontrados nas plantas e incluem os fenilpropanoides (*cinnamic, coumaric, caffeic* e *ferulic acids*) e seus derivados como polifenóis, flavonoides, antocianinas e taninas. Esses compostos são sintetizados pela via do *shikimate* (CHO et al., 2007; MAEDA et al., 2010).

Os fenilpropanoides são derivados do *cinnamic acid*, o qual é formado a partir da *phenylalanine* pela ação da enzima PAL (*phenylalanine ammonia-lyase*), a enzima chave da via de biossíntese de fenóis que catalisa a desaminação da *phenylalanine*. Um aumento da atividade de PAL já foi reportado sob diferentes condições ambientais adversas (WAHID et al., 2007). Para plantas cultivadas, existe uma importante relação de “perda-e-ganho” entre adaptação ao estresse e produção da cultura dependendo do quão bem os cultivares lidam com a mudança do ambiente. Na tolerância à seca, entre as peculiaridades mais típicas estão mudanças nos fenilpropanoides levando a níveis diferenciais de flavonoides (RASMUSSEN; PARSONS; JONES, 2012). Segundo Lugan et al. (2009), estudos prévios indicam que altas concentrações de fenilpropanoides como *caffeoylquinic (chlorogenate)* e de *phenylalanine* foram encontrados em genótipos de plantas modelo tolerantes ao déficit hídrico (LUGAN et al., 2009). Alguns compostos são originados dos fenilpropanoides *cinnamate* ou *p-coumarate* e se encontram conjugados dentro das plantas, a açúcares (*salicylate-glucose*), a carboidratos de parede celular (*ferulate esters*) ou a ácidos orgânicos (*sinapate esters, chlorogenic acid*). (SCHNITZLER et al., 1992).

O metabólito *Succinate semialdehyde* – SSA (ID 97) exibiu valor de FC de 1,19 vezes maior no Controle do que no Déficit Hídrico. Há na literatura diversos trabalhos que indicam acúmulo desse metabólito como resposta a situações de estresses abióticos. Essa menor concentração observada nas plantas estressadas, ao contrário do que é comumente visto na literatura, pode estar relacionada a uma falha no sistema de defesa da planta, indicando a susceptibilidade da planta ao estresse hídrico.

Succinate semialdehyde, gerado na mitocôndria, é tipicamente oxidado a *succinate*, que alimenta o ciclo de Krebs. Também é um intermediário no metabolismo de *g-aminobutyrate (GABA)*, que é acumulado em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos. O metabolismo de GABA está associado ao balanço de carbono-nitrogênio e na limpeza de espécies reativas de oxigênio. Além de outras respostas fisiológicas, incluindo a regulação do pH citosólico, fluxo de carbono no ciclo de Krebs, metabolismo de nitrogênio,

proteção contra estresse oxidativo, osmorregulação e sinalização. *Succinate semialdehyde* pode ser também reduzido a *g-hydroxybutyrate* (GHB), o qual também está relacionado à resposta ao estresse abiótico.

GABA é principalmente sintetizado a partir do *glutamate* no citosol pela *glutamate decarboxylase - GAD* e então transportado para a mitocôndria. *GABA transaminase - GABA-T* e *succinic semialdehyde dehydrogenase - SSADH* convertem GABA para *succinate* que alimenta o ciclo de Krebs (KRASENSKY; JONAK, 2012). A redução de SSA à GHB foi encontrada em plantas expostas a várias condições de estresses abióticos (ALLAN et al., 2012), como deficiência de oxigênio e condições de alta luminosidade (ALLAN et al., 2008).

Para o metabólito diferencial *4-Hydroxybenzaldehyde* (ID 473), o valor de FC nos indica que a abundância desse metabólito é 3,69 vezes maior no Déficit Hídrico do que no Controle. As vias nas quais ele participa são Biossíntese de Fenilpropanóides, Degradação de Tolueno e Degradação de Aminobenzoato.

Existem poucos relatos relacionando esse metabólito com a resposta ao estresse abiótico. Em um estudo realizado com plantas de girassol que foram privadas de nutrientes Gouw et al. (1999) constataram que elas lançaram mais compostos orgânicos voláteis (*volatile organic compounds - VOCs*) e a ejeção de tolueno duplicou. Indicando uma possível relação das vias metabólicas de tolueno com a resposta da planta ao estresse abiótico. Em ensaios realizados em casa de vegetação com diferentes acessos de *Polygonum punctatum*, Lopes et al. (2001) avaliaram a influência de regimes hídricos (ambiente úmido, moderadamente úmido e seco) na produção de óleo essencial. Sabe-se que os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, dentre elas os fenilpropanóides. Os autores observaram maior rendimento do mesmo no ambiente seco do que nos demais ambientes. Este resultado demonstra que o aumento na biossíntese do óleo essencial pode funcionar como resposta adaptativa ao estresse abiótico, no caso déficit hídrico, relacionando-se alguma resposta fisiológica às variações ambientais.

Metabólitos preferencialmente abundantes no Déficit Hídrico, que são pelo menos duas vezes mais abundantes no tratamento do que no controle (segundo valores de FC), mas que participam de outras vias que não foram as consideradas comuns entre todos os compostos preferencialmente abundantes identificados, também serão discutidos a seguir.

O metabólico *Galacturonic acid-1-phosphate - GalA-1-P* (ID 1689) exibiu valor de FC igual a 2,02 vezes maior no Déficit Hídrico do que no Controle. Há na literatura algumas vias em que o metabólito atua.

O *Galacturonic acid* é conhecido por ser gerado pela hidrólise, catalisada por enzimas, de polissacarídeos pécicos em tecidos de plantas. O GalA-1-P é utilizado para formação de UDP-GalA, requerido para via de síntese de polissacarídeos e na via de biossíntese de pectina. A pectina é um dos principais componentes da parede celular da planta que funciona como mecanismo de defesa.

Segundo Yang et al. (2009) experimentos preliminares demonstraram que o gene GalAK (*D-galacturonic acid-1-phosphate kinase*) converte GalA e ATP em GalA-1-P e ADP. Eles sugerem que GalAK gera GalA-1-P do GalA recuperado, o qual é liberado durante o crescimento da parede celular, ou dos tecidos de armazenamento. Chen, Guo e Zhang (2011) também constataram que o UDP-GalA é requerido na via de biossíntese de pectina como pode ser observado no esquema representado na Figura 14. Em um estudo com folhas de pimenta, An et al. (2008) constataram que o gene CaPMEI1 que codifica a proteína PME1 (*pectin methylesterase inhibitor protein*) pode ser superexpresso na defesa da planta e nas respostas de estresse abiótico. A superexpressão de CaPMEI1 exibiu tolerância ao estresse oxidativo na germinação das sementes e do crescimento das mudas (APEL; HIRT, 2004).

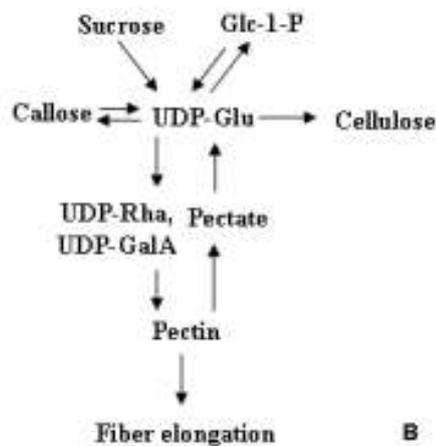


Figura 14 – Biosíntese da pectina

Fonte: Adaptada de Chen, Guo e Zhang (2011)

O metabólito *Pyroglutamic acid* (ID 515) exibiu valor de *FC* de 2,44 vezes maior no Déficit Hídrico do que no Controle. As vias nas quais ele participa são Metabolismo de *glutathione*, Metabolismo de *D-Glutamine* e *D-glutamate*.

Pyroglutamic acid, também conhecido como *5-oxoproline*, é um aminoácido raro e não muito bem documentado em resposta à seca (MEREWITZ et al., 2012). É um precursor para a síntese de glutamato e prolina, onde o glutamato é o caminho preferencial sob condições de estresse hídrico (CHEM; KAO, 1993). Evidências têm mostrado que esse aminoácido pode agir como molécula sinalizadora para regular a transcrição de um grande número de fatores de transcrição e possuem função crucial nas respostas ao estresse (HARDING et al., 2003; SHARMA, 2006)

Para a conversão de *5-oxoproline* para *glutamate* (Figura 15) é requerida na regeneração de *glutathione*, que é conhecido como um antioxidante efetivo (YU et al., 2012). Aumento na produção de *5-oxoproline* pode estar envolvido em um sistema antioxidante reforçado (MARRS, 1996). Korn e Ga (2010) apresentaram que ele pode ser associado com a tolerância ao congelamento em *Arabidopsis*.

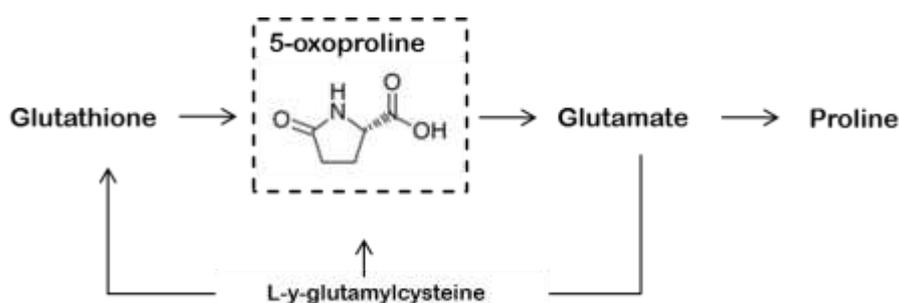


Figura 15 – Metabolismo de *glutathione*, mostrando o composto *5-oxoproline* (*pyroglutamic acid*) como precursor na síntese de *glutamate* e *proline*

Merewitz et al. (2012) constataram que plantas transformadas com o gene *ipt* (*adenine isopentyl transferase*), o qual tem sido associado com a melhor tolerância à seca em *Agrostis stolonifera* L., apresentaram acúmulo de aminoácidos como *pyroglutamic acid*, valina e glicina e, que podem contribuir como fonte de precursores para vias metabólicas chaves regulando a tolerância à seca. Segundo Hu et al. (2015), quando plantas de *Festuca arundinacea* são pré-expostas ao estresse, elas podem produzir alguns sinais estáveis e reações fisiológicas que podem ser transportados como “memória de estresse”, e assim reconhecidos em uma situação subsequente de estresse. Essa memória foi associada a grandes mudanças no perfil metabólico da folha, como aumento do aminoácido *pyroglutamic acid*, além de outros aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares (HARDING et al., 2003; SHARMA, 2006).

O metabólito *Creatinine* (ID 546) apresentou FC de 1,63 vezes maior no Déficit Hídrico do que no Controle. A via metabólica na qual ele participa é no metabolismo de *arginine*.

Creatinine funciona se ligando sozinha a fosfatos liberando energia e ajudando na recuperação em condição de seca. O nível de glicose, açúcares redutores, *creatinine* e atividade enzimática de CK (*creatine kinase*) explica a sobrevivência das plantas em condições de estresse desde que estudos têm sido reportados com esses dois membros da família das leguminosas (AZMAT et al., 2009).

5.4.3 Análise comparativa entre os tratamentos Controle e Recuperação

Com o objetivo de identificar os metabólitos que mais estão relacionados com o mecanismo de recuperação das plantas em situação de Déficit Hídrico e reidratação, também foi realizada a análise multivariada PLS-DA com os tratamentos Controle e Recuperação. Na Figura 16 está a representação gráfica do agrupamento dos tratamentos, nela é possível visualizar, como citado nos itens anteriores, que as duas componentes principais representam 50% da variância total da análise. Na Tabela 4, estão os parâmetros de validação da análise Acurácia igual a 0,91667, R^2 igual a 0,99902 e Q^2 igual a 0,8489. Portanto, assim como nas outras análises multivariadas esse conjunto de critérios observados determinam que os tratamentos Controle e Recuperação são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo metabólico

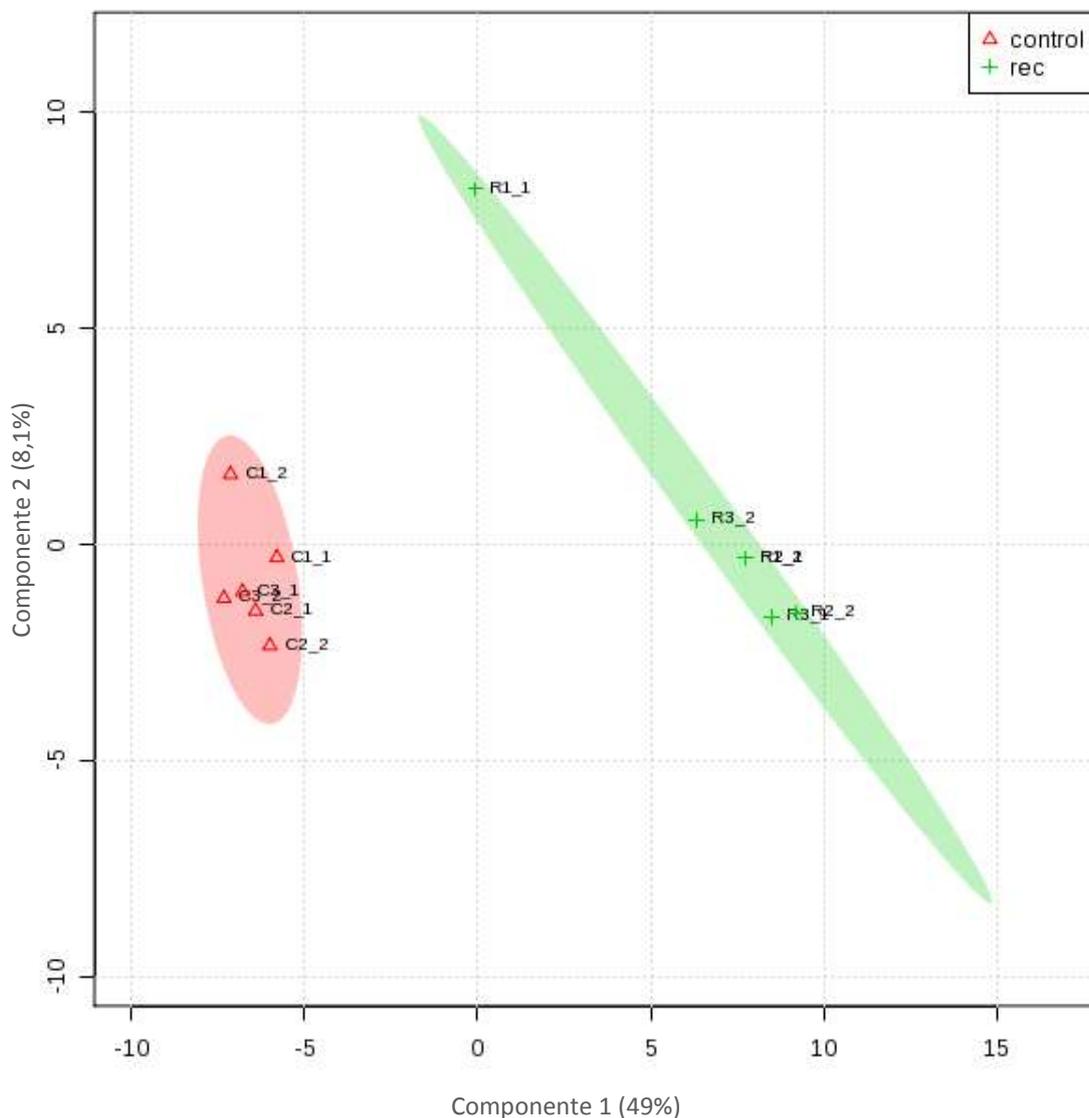


Figura 16 – PLS-DA de perfil metabólico de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle (C) e Recuperação (R)

Tabela 4 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos dois tratamentos: Controle e Recuperação. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5
Acurácia	0,91667	0,91667	0,91667	0,91667	0,91667
R2	0,89764	0,98958	0,99902	0,99973	0,99902
Q2	0,82358	0,81538	0,83627	0,84212	0,8489

Em seguida, para identificação dos metabólitos responsáveis pelo agrupamento visualizado na representação gráfica do PLS-DA, ou seja, os diferenciais entre os tratamentos Controle e Recuperação foram feitas as mesmas considerações citadas no item 5.3.1. Dessa forma, foram considerados diferencialmente abundantes entre os tratamentos os que

obtiveram valor VIP maior que 1 e *p value* significativo ($p < 0,05$). Esses metabólitos estão representados na Figura 17.

Na Figura 17 também é observado o gradiente de concentração representado por cores seguindo os mesmos padrões citados no item 5.3.1, onde o quadrado de cor verde indica baixa concentração e o vermelho alta concentração. Nela também estão presentes os metabólitos preferencialmente abundantes nos tratamentos de Recuperação, os quais estão marcados por asterisco. Esses metabólitos não estão presentes na análise comparativa entre Controle e Déficit Hídrico.

Nome	ID	VIPs	p.value	Fold Change	log2(FC)	C	R
Salicylic acid glucoside	1881	2.50648	2.30E-12	146.59	7.1956	Red	Green
similar to Aspartic acid	377	2.17884	3.20E-11	0.023153	-5.4327	Green	Red
Uridine 5'-monophosphate	2161	2.05886	4.22E-10	0.030462	-5.0368	Green	Red
Cryptochlorogenic acid	2355	1.94292	8.63E-07	0.033035	-4.9199	Green	Red
Itaconic acid	251	1.80918	0.000648	0.026114	-5.259	Green	Red
Malic acid*	462	1.78946	0.00077	0.026656	-5.2294	Green	Red
Methyl dihydrogen phosphate*	108	1.76038	0.000616	0.034403	-4.8613	Green	Red
2-Hydroxypyridine*	27	1.75072	0.000584	0.036082	-4.7926	Green	Red
Chlorogenic acid	2245	1.74198	0.000596	0.037041	-4.7547	Green	Red
2-Hydroxyglutaric acid	590	1.71168	0.000793	0.033232	-4.9113	Green	Red
Phosphoric acid*	185	1.66432	0.000601	0.050331	-4.3124	Green	Red
3-Cyanopyridine*	17	1.59094	0.02329	4.1471	2.0521	Red	Green
Se-methyl-L-selenocysteine*	275	1.37452	0.043264	2.6737	1.4188	Red	Green
Swainsonine*	1244	1.28346	0.022994	0.36533	-1.4527	Green	Red
Gulonic acid	1266	1.2663	7.36E-06	0.27415	-1.867	Green	Red
Succinic acid*	240	1.1145	0.02143	0.35343	-1.5005	Green	Red
N-Glycolylneuraminic acid	2089	1.09044	0.000326	0.31538	-1.6648	Green	Red
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	114	1.05442	0.000293	2.8267	1.4991	Red	Green
5-Acetamidopentanoic acid*	676	1.02268	0.001366	2.9474	1.5594	Red	Green
Oxamic acid	149	1.02062	0.004156	0.31595	-1.6622	Green	Red
Alpha-alpha-threulose*	2019	1.000676	0.000274	0.38833	-1.3646	Green	Red

Figura 17 - Metabólitos diferencialmente abundantes entre as amostras Controle e Recuperação. * vermelho – alta concentração; verde – baixa concentração

A via metabólica comum entre os metabólitos diferenciais da Figura 17 é a de biossíntese de alcaloides derivados da *ornithine*, *lysine* e *nicotinate*. Nela, destacam-se os metabólitos preferencialmente abundantes no tratamento de recuperação que serão discutidos a seguir (Figura 13).

O metabólito *Swainsonine* (ID 1244) exibiu valor de FC de 1,45 vezes maior na Recuperação do que no Controle. Muito conhecido e estudado como uma toxina para animais que se alimentam das plantas que o contém, o metabólito é um alcaloide indolizidínico resultado da biossíntese de alcaloides derivados da lisina.

Embora tenha sido provado que *swainsonine* é produzido por fungos endofíticos, as plantas por si também possuem um grande impacto da produção do mesmo (PRYOR et al., 2009). Cook et al. (2013) observaram que as plantas oferecem aos endofíticos nutrientes, hormônios e alguns outros sinais que influenciam sua capacidade de produzir a toxina. Além disso, *Oxytropis ochrocephala*, conhecida por conter *swainsonine*, cresce em áreas de alta altitude com deficiência de água, alto conteúdo de sal no solo e temperaturas extremamente baixas, indicando que as plantas que possuem esse metabólito, possuem a habilidade de lidar com estresses ambientais desfavoráveis (ZHUANG et al., 2015)

O metabólito *Succinic acid* (ID 240) exibiu valor de FC de 1,50 vezes maior na Recuperação do que no Controle. É um ácido orgânico que desempenha papel no ciclo do ácido cítrico, obtendo-se um processo de energia em todos os organismos vivos. É resultado de uma reação onde o *succinil-CoA*, um composto de quatro carbonos combinado com a coenzima A, gera energia ao perder essa coenzima A e forma succinato, tudo isso catalisado pela *Succinil Coa sintetase*.

Em alguns trabalhos o *succinic acid* foi analisado como metabólito de resposta a indução de estresses abióticos em plantas. Em cultivares de soja, a indução à seca não desencadeou o acúmulo de ácidos orgânicos exceto o *succinate*, sendo que sua concentração foi o dobro em folhas de ambos os genótipos depois da imposição da seca (SILVENTE; SOBOLEV; LARA, 2012). Há trabalhos que citam uma diminuição da concentração do *succinic acid* em plantas tolerantes a estresses abióticos, indicando que essa menor concentração e inclusive, o não aumento, pode ser um possível mecanismo de tolerância. Em folhas de trigo sob condição de seca, as únicas mudanças marcantes nos ácidos orgânicos foram quedas em um número de compostos no ponto de déficit hídrico quando comparado ao ponto controle, incluindo *caffeate*, *glycerate*, *succinate*, *threonate*, e *threonate-1,4-lactone* (BOWNE et al., 2012). Diminuição de intermediários do ciclo de Krebs, incluindo fumarato, *succinic acid* e malato, foi maior no genótipo de milho tolerante a estresse hídrico quando comparado ao susceptível (BARNABY et al., 2013). Também existem trabalhos que citam o *succinic acid* como metabólito presente nos tratamentos de reidratação ou recuperação das plantas. Em alfafa, a exposição das plantas à seca moderada aumentou o *succinic acid* e também o malato. Reidratar as plantas causou o retorno do *succinic acid* e da sacarose a

valores controle, considerando que houve uma diminuição acentuada do conteúdo de malato (NAYA et al., 2007).

O metabólito *Malic acid* (ID 462) exibiu valor de FC de 5,22 vezes maior na Recuperação do que no Controle. *Malate* é um metabólito central da célula vegetal com papéis importantes na fisiologia e metabolismo da planta. Possui diversas funções que vão desde o ciclo de Krebs e metabolismo CAM e C4, até o controle osmótico, como um regulador da homeostase do pH, como um equivalente redutor que é empurrado entre os compartimentos subcelulares, como um importante exsudato de raiz (FINKEMEIER; SWEETLOVE, 2009). O *malic acid* participa do ciclo do ácido cítrico, em reações posteriores ao succinato. O succinato perde dois hidrogênios gerando o fumarato. O fumarato, por sua vez, recebe água por um processo chamado de hidratação gerando o *malate*, através da enzima catalisadora fumarase.

Assim como o succinato, o *malic acid* é citado em trabalhos de plantas submetidas ao déficit hídrico. Alguns citam a diminuição das concentrações desse metabólito quando as plantas são submetidas a estresses abióticos, o que indica que o aumento observado nas plantas do tratamento de recuperação possivelmente faz parte de um mecanismo de recuperação após reidratação das plantas. Para investigar a recuperação metabólica de raízes de *Arabidopsis thaliana* após estresse oxidativo. Foi constatado que após a recuperação o metabolismo do estresse pode ser reconfigurado para voltar a operação basal. A redistribuição através de muitas vias como a glicólise, o ciclo de Krebs e o metabolismo de aminoácidos foram reduzidos sob estresse oxidativo. Os decréscimos em amostras de *malic acid*, 2-oxoglutarato, glutamato e aspartato foram totalmente recuperados ou até aumentaram acima do nível controle (LEHMANN et al., 2012). Pinheiro, Passarinho e Pinto (2004), estudando o efeito da seca e da reidratação no metabolismo dos órgãos de *Lupinus albus*, observaram que reaguar as plantas leva a um aumento no *malate* em todos os órgãos. Em clones de *Populus deltoides*, concentrações de *malic acid*, ácido quínico e solutos totais foram maiores em plantas submetidas a déficit hídrico reidratadas do que em plantas controle. E essas concentrações se mantiveram altas durante todo o período de recuperação (GEBRE; BRANDLE; KUHNS, 1997).

Assim como na análise comparativa entre Controle e Déficit Hídrico, os metabólitos preferencialmente abundantes na Recuperação, que são pelo menos duas vezes mais abundantes no tratamento do que no controle (segundo valores de *Fold Change*), e que participam de outras vias que não foram as consideradas mais comuns entre todos os compostos diferenciais identificados, estão discutidos a seguir.

O metabólito *Methyl dihydrogen phosphate* (ID 108) apresenta valor de FC de 4,86 vezes maior no tratamento de Recuperação do que no Controle. Como demonstrado na Tabela 1, o KEGG não retorna vias em que ele participa e também não foi encontrado na literatura trabalhos que defendam sua ação nos mecanismos de recuperação da planta contra estresses abióticos, como o déficit hídrico. Uma possível ação do *Methyl dihydrogen phosphate* nesses mecanismos pode estar relacionada com o próximo metabólito a ser discutido, o *Phosphoric acid*.

O *Phosphoric acid* (ID 185) exibiu valor de *Fold Change* de 4,31 vezes maior na Recuperação do que no Controle. Dentre as vias metabólicas em que ele participa destacam-se as vias de Fosforilação oxidativa, Fotossíntese e Biossíntese de Peptídoglicanos.

O *phosphoric acid*, assimilado pelos organismos vivos, é extremamente reativo e só está disponível para absorção pelas plantas em uma estreita faixa de pH do solo neutro (TIMPA et al., 1986). Além disso, é o ácido de fósforo mais importante. Dentre os ácidos minerais, pode ser considerado um ácido mais fraco. O fósforo (P) é um nutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, que forma parte das moléculas chave como ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP e outros compostos ativos biologicamente. Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos que citam acúmulo desse metabólito em plantas sob condição de estresse abiótico.

Hochberg et al. (2013), em estudo com dois cultivares de uva, *Shiraz* e *Cabernet Sauvignon*, indicam o acúmulo de *phosphoric acid* nas plantas sob condição de déficit hídrico. Subramanian et al. (1997), estudaram o efeito da colonização com fungos micorrizas arbusculares em milho no potencial hídrico da folha, níveis de açúcar e fósforo. Com plantas sob condição de seca e de recuperação, constataram que até mesmo depois de três semanas de recuperação, plantas previamente estressadas, tiveram conteúdo de P significativamente maior em brotos.

O metabólito *2-Hydroxypyridine* (ID 27) exibiu valor de FC de 4,79 vezes maior na Recuperação do que no Controle. Na literatura existem alguns trabalhos em que o *2-Hydroxypyridine* foi identificado como metabólito diferencial em plantas submetidas a alguns tipos de estresses abióticos, como estresse salino e de baixa temperatura.

A piridina, e derivados, ocorrem no ambiente como resultado das atividades industriais e ambientais. O destino das piridinas no ambiente é uma função de ambos os processos bióticos e abióticos, incluindo transformações fotoquímicas, complexação, transporte e degradação biológica (SIMS; O'LOUGHLIN; CRAWFORD, 1989). Na análise da variação interespecífica em *Arabidopsis lyrata* spp. *Petraea* submetidas à baixa

temperatura, foram identificados alguns metabólitos altamente significativos, como o *2-hydroxypyridine*. (DAVEY; IAN WOODWARD; PAUL QUICK, 2009). Na identificação dos metabólitos mais importantes de folhas de *A. halimus* que são diferenciais entre as mudas controle e as tratadas com NaCl, *2-Hydroxypyridine* foi identificado como *up-regulated*, indicando sua importância nos mecanismos de recuperação da planta contra estresse salino (ALLA et al., 2012).

5.5 Integridade dos núcleos enriquecidos

O fracionamento subcelular, ou a proteômica das organelas, reduz a complexidade do proteoma eucarioto, permitindo a visualização de proteínas em menor abundância como parte de um grupo específico de proteínas centrais para o problema biológico sob investigação (ABDOLZADE-BAVIL et al., 2004). Os proteomas das organelas compreendem um conjunto específico de proteínas que cumprem funções celulares discretas, porém variadas (PANDEY et al., 2006). O núcleo é a organela que contém quase toda a informação genética requerida para a expressão regulada das proteínas celulares. Dessa forma, um dos critérios mais importantes a ser levado em consideração quando se está estudando proteômica de organelas, é a pureza do compartimento analisado. Em função disso, a integridade do proteoma subcelular é altamente dependente da qualidade do protocolo usado para o isolamento (PANDEY et al., 2006). Em plantas, a separação de núcleos altamente purificados é uma tarefa difícil, uma vez que este procedimento pode comprometer a quantidade de proteínas obtidas (CHOUDHARY et al., 2009).

Com base nessas informações, a integridade dos núcleos isolados foi observada através da coloração com orceína acetolática 1%, que constitui um corante usado em preparações nucleares por possuir afinidade pelo DNA (TONZETICH, 2004). Na Figura 18 é possível observar que as estruturas nucleares possuem tamanhos uniformes de diâmetros, em torno de 5 μm . Esse resultado condiz com a literatura pesquisada onde Choudhary et al. (2009) encontraram o diâmetro nuclear médio de ~3-5 μm em plântulas de arroz e (IZILDA, 2012) encontrou núcleos de células foliares de cana-de-açúcar apresentando diâmetro médio de 5 μm .

Quando as frações nucleares das folhas da cana-de-açúcar foram obtidas, mesmo com *rounds* de purificação durante o processo de isolamento, elas continuam a carregar uma quantidade considerável de membranas contaminantes, uma vez que objetiva-se o enriquecimento de determinada organela e não seu isolamento total. Além disso, não é somente importante identificar a presença de uma proteína em determinada organela, mas

também medir sua abundância relativa nos diversos locais, além de avaliar a forma como esta localização subcelular pode variar entre diferentes compartimentos, sob diferentes condições tanto fisiológicas quanto de crescimento (BOISVERT et al., 2010). Dessa forma, foram utilizados os programas de predição de localização subcelular para selecionar somente proteínas que são nucleares ou em algum momento passam pelo núcleo. Esse resultado será mostrado em itens abaixo.

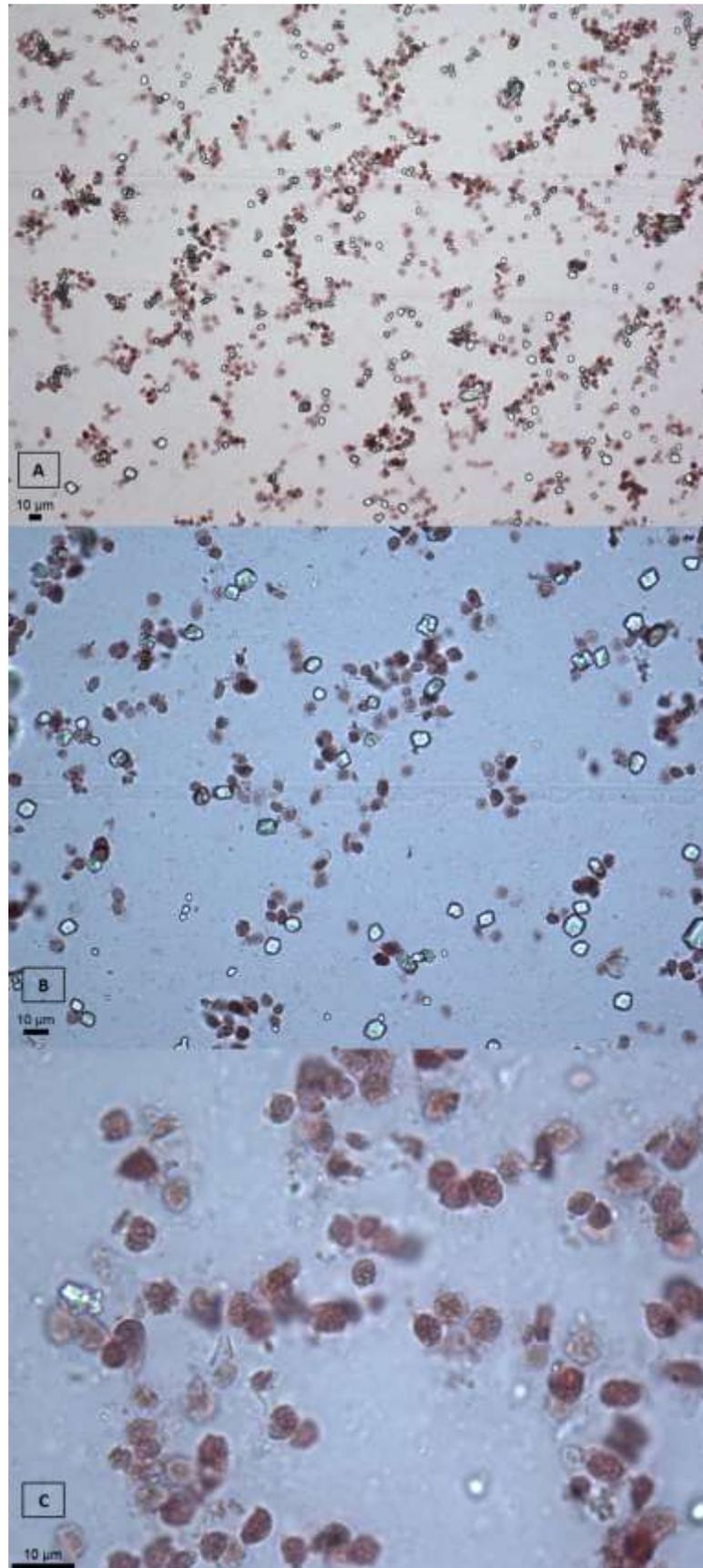


Figura 18 – Núcleos de folhas de cana-de-açúcar corados com Orceína Acetoláctica 1%. A – Microscopia de luz 20X; B- Microscopia de luz 40X; C – Microscopia de luz 100X

5.6 Integridade das proteínas nucleares

Algumas dificuldades explicam porque o proteoma nuclear de plantas é pouco estudado. Uma delas é com relação à dificuldade de se isolar o núcleo da célula, outra se refere aos numerosos compostos, particularmente compostos de reserva de carbono e nitrogênio e ácidos nucleicos, que podem interferir durante a extração de proteínas e a análise proteômica. Portanto, otimizações são necessárias para obter uma suspensão de núcleos altamente pura e proteínas nucleares (BANCEL et al., 2015)

O protocolo de extração de proteínas utilizando o reagente TRI® (Sigma) exigiu algumas modificações na fase de ressuspensão do pellet, que se apresentou muito rígido. Dessa forma, as proteínas ficaram três dias dentro da câmara fria sob agitação e alternadas agitações no vortex. O gel da Figura 19, apesar de mostrar bandas de coloração muito fracas devido à dificuldade de se obter grandes quantidades de proteínas em função de ser uma organela em questão, apresentou bandas bem definidas e sem sinal de degradação.

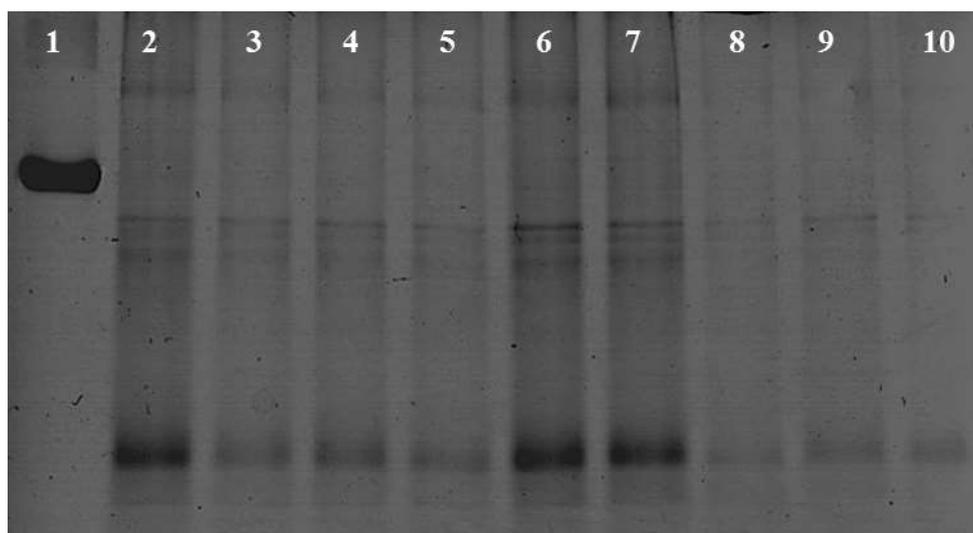


Figura 19 - Gel SDS-PAGE 1D para verificação da integridade das proteínas nucleares extraídas pelo reagente TRI® (Sigma). Proteínas separadas pela eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e coradas com Coomassie Brilliant Blue G 250 e imagem obtida por meio de um *scanner*. 1 – Padrão BSA de 5µg; 2 – controle 1; 3 – controle 2; 4 – controle 3; 5 – déficit hídrico 1; 6 – déficit hídrico 2; 7 – déficit hídrico 3; 8 – recuperação 1; 9 – recuperação 2; 10 – recuperação 3

5.7 Análise comparativa entre os tratamentos

As proteínas foram identificadas através do projeto de EST de cana-de-açúcar, o SUCEST, como citado no item 4.10. Um total de 761 proteínas foi identificado com reprodutibilidade entre as três repetições analisadas de cada tratamento, e foi submetido a análises comparativas entre os tratamentos, segundo os mesmos parâmetros utilizados para os

metabólitos, descritos no 5.4.1. De maneira geral, foram submetidas a análises multivariadas PLS-DA para visualização da separação entre os tratamentos de acordo com o conteúdo proteico, onde foram consideradas as proteínas com VIP maior que 1, e também foram submetidas a análises univariadas, *t-test* e ANOVA, onde foi considerado o valor *p*.

5.7.1 Análise comparativa entre Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

Para análise comparativa entre os tratamentos Controle, Déficit Hídrico e Recuperação, as proteínas foram submetidas ao PLS-DA. Na Figura 20, observa-se que as duas primeiras componentes principais já somam 50% de proporção da variância total da análise. Na Tabela 5 também estão os principais parâmetros de validação da análise, Acurácia igual a 0,88, R^2 igual à 0,99 e Q^2 igual à 0,71. Portanto, esse conjunto de critérios observados determina que os três tratamentos Controle, Déficit Hídrico e Recuperação são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo proteico.

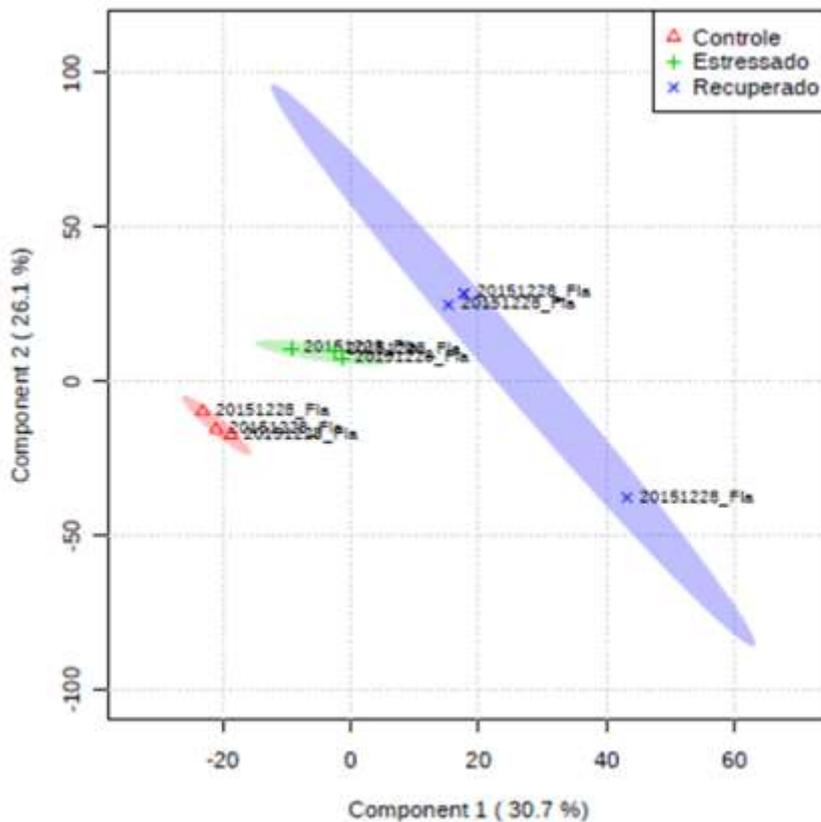


Figura 20 – PLS-DA das proteínas nucleares de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle, Déficit Hídrico (estressado) e Recuperação (recuperado)

Tabela 5 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos três tratamentos: Controle, Déficit Hídrico e Recuperação. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
Acurácia	0,22222	0,77778	0,88889
R²	0,84041	0,99132	0,99829
Q²	0,3583	0,65701	0,71541

Em seguida, para identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos, foram feitas as mesmas considerações do item 5.4.1. As proteínas que obtiveram soma dos VIPs maior que 1, ou seja, as responsáveis pelo agrupamento visualizado no PLS-DA e diferenciais entre os tratamentos. E, além do valor do VIP, o *p value* significativo (<0,05) da ANOVA também foi considerado. A partir dessas proteínas totais diferencialmente expressas, foi conduzida a predição da localização subcelular com os programas citados no item 4.10 para selecionar apenas as proteínas de núcleo. Como os programas se baseiam em diferentes critérios, foram consideradas nucleares as proteínas identificadas em pelo menos um programa. Foram identificadas 32 proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos e de localização nuclear, e para tais, foi realizada a classificação funcional como descrito no item 4.10. Esses resultados se apresentam na Tabela 6.

Tabela 6 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

(continua)

Proteínas nucleares		Pfam	InterPro	
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	
			Função Molecular	
SCAGLR1043C02	apx2 - cytosolic ascorbate peroxidase	peroxidase / NA	response to oxidative stress oxidation-reduction process	peroxidase activity; heme binding
SCCCRZ2C03E03	wound stress protein precursor	NA / PLAT/LH2 domain	None predicted	protein binding
SCAGLR2026F05	histone h4 replacement cg3379-pc	NA / Centromere kinetochore component CENP-T	DNA-templated transcription, initiation	DNA binding; protein heterodimerization activity
SCJLRZ1019E11	uncharacterized protein LOC100273241 [Zea mays]	NA	None predicted	None predicted
SCCCLR1C03E08	grx_s17 - glutaredoxin subgroup ii	NA / Thioredoxin; Glutaredoxin	cell redox homeostasis	electron carrier activity; protein disulfide oxidoreductase activity
SCSGLR1084C03	r40c1 protein - rice	NA	None predicted	None predicted
SCCCLR1024A05	transaldolase 2	NA / Transaldolase	carbohydrate metabolic process pentose-phosphate shunt	catalytic activity; sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerontransferase activity
SCCCLB1024A02	chaperone protein DnaJ-like	NA / DnaJ domain; DnaJ C terminal domain	protein folding response to heat	ATP binding; heat shock protein binding; unfolded protein binding
SCJLLB2080E05	thiol disulfide interchange protein txla	NA / Thioredoxin	glycerol ether metabolic process cell redox homeostasis	protein disulfide oxidoreductase activity
SCACLR1057G08	activator of 90 kda heat shock protein atpase	AHSA1 / Aha1_N	response to stress	ATPase activator activity; chaperone binding
SCUTRZ3071B08	unknown [Zea mays]	DUF1350 / NA	None predicted	None predicted
SCACLR1130B08	40s ribosomal protein s25-1	Ribosomal_S25 / NA	None predicted	None predicted
SCCCLR2C02F03	cytochrome b5	NA / Cyt-b5	None predicted	heme binding
SCCCLB1004H02	ubiquitin-activating enzyme e1 expressed	NA / ThiF; E1_FCCH; E1_4HB; ThiF; UBA_e1_thiolCys; E1_UFD	cellular protein modification process	small protein activating enzyme activity
SCCCLR2002F10	histidine triad nucleotide binding protein	NA / HIT	None predicted	catalytic activity
SCEQRT1025H04	heat-shock protein 101	Clp_N / AAA; AAA_2; ClpB_D2-small	protein metabolic process	ATP binding

Tabela 6 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

(continuação)

Proteínas nucleares		Pfam		InterPro
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular
SCVPLR1049H03	60s acidic ribosomal protein p2b	Ribosomal_60s / NA	translational elongatio	structural constituent of ribosome
SCCCRZ1002F11	beta-tubulin r2242	NA / Tubulin; Tubulin_C	microtubule-based process	GTPase activity; structural constituent of cytoskeleton; GTP binding
SCSGRT2066C02	apx1 - cytosolic ascorbate peroxidase	peroxidase / NA	response to oxidative stress oxidation-reduction process	peroxidase activity; heme binding
SCCCCL3002B06. b	isochorismate synthase 1	Porin_3 / NA	anion transport regulation of anion transport transmembrane transport	voltage-gated anion channel activity
SCCCLR1022B09	elongation factor 1-alpha	NA / GTP_EFTU; GTP_EFTU_D2; GTP_EFTU_D3	translational elongation	translation elongation factor activity; GTPase activity; GTP binding
SCRUFL1114B10. b	nadph-dependent reductase	NmrA / NA	None predicted	None predicted
SCAGFL1085C10	chloroplast lipocalin	NA / Lipocalin_2	None predicted	None predicted
SCJLRT1016A04	plastid-lipid-associated protein 2	PAP_fibrillin / NA	None predicted.	None predicted.
SCJFRZ2033G02	plastid-lipid associated protein 3	PAP_fibrillin / NA	None predicted.	None predicted.
SCUTLR1058B02	s-adenosylmethionine synthetase 1	NA / S-AdoMet_synt_N; S- AdoMet_synt_M; S-AdoMet_synt_C	S-adenosylmethionine biosynthetic process	methionine adenosyltransferase activity; ATP binding
SCQGLR1085E02	putative protein SORBIDRAFT_04g001720 [Sorghum bicolor]	NA / CSD	regulation of transcription - DNA-templated	nucleic acid binding; DNA binding
SCCCLR1072E04	usp family protein	NA / Usp	response to stress	None predicted
SCRUFL4022D09	putative protein SORBIDRAFT_06g022380 [Sorghum bicolor]	NA	NA	NA
SCQSLR1089A11	carotenoid cleavage dioxygenase	RPE65 / NA	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity - acting on single donors with incorporation of molecular oxygen - two oxygen

Tabela 6 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

(conclusão)

Proteínas nucleares		Pfam		InterPro
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular
SCRLSD1009H10	putative protein SORBIDRAFT_04g001270 [Sorghum bicolor]	NA / DUF1995	None predicted.	None predicted.
SCUTRZ2023F12	ATP/GTP-binding protein [Zea mays]	Kinase-PPPase / NA	None predicted.	protein serine/threonine kinase activity ATP binding; transferase activity-transferring phosphorus-containing groups; phosphotransferase activity, phosphate group as acceptor

Com o objetivo de se ter uma visão geral e mais completa dos processos que se destacam tanto para a defesa da planta quando submetidas ao Déficit Hídrico como para a sua Recuperação quando reidratada, foram considerados os processos biológicos mais comuns entre elas. A representação gráfica da Figura 21 possui em destaque (negrito) as funções que mais apareceram.

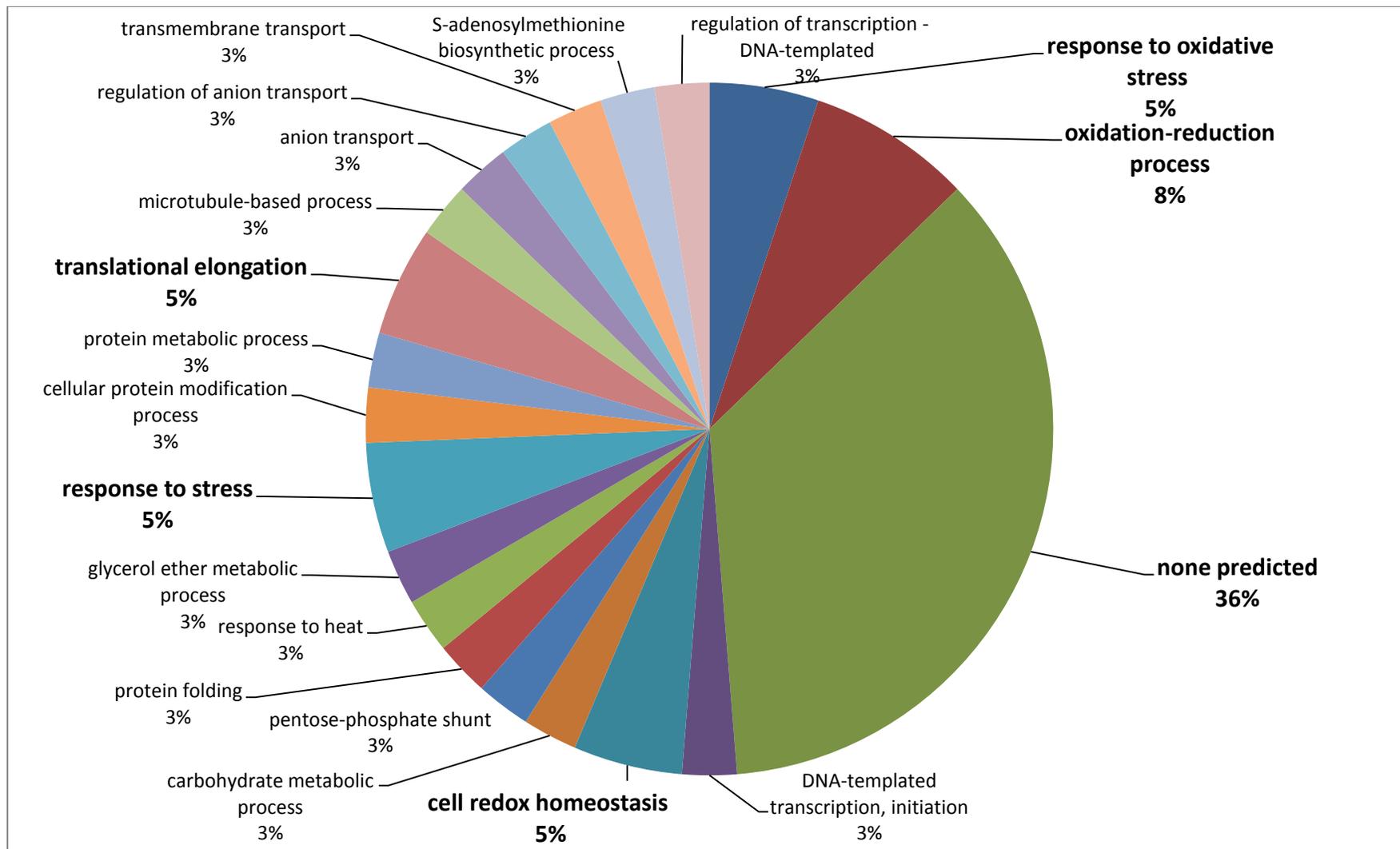


Figura 21 - Classificação funcional das proteínas preferencialmente expressas nos núcleos das amostras da análise comparativa Controle, Déficit Hídrico e Recuperação

Entre os processos biológicos que mais se destacaram estão os relacionados com o estresse oxidativo das plantas, como homeostase redox celular (*cell redox homeostasis*), processo de oxidação e redução (*oxidation-reduction process*), resposta ao estresse oxidativo (*response do oxidative stress*). Além deles, proteínas relacionadas à tradução proteica também se destacaram, como as da fase de alongação (*translational elongation*). No entanto, esses processos serão discutidos posteriormente, nas próximas análises comparativas.

Outro processo biológico em destaque é o de resposta ao estresse (*response to stress*) representado pelas proteínas *usp family protein* e *activator of 90 kda heat shock protein atpase*.

Universal stress protein – USP exerce uma função indispensável na tolerância ao estresse abiótico. A superexpressão do gene USP melhora o crescimento da planta, alivia o acúmulo de ROS, mantém homeostase iônica e melhora o estado fisiológico da planta sob estresse salino e osmótico. Isso porque alguns genes pouco expressos podem ser ativados pela expressão de USP, o que leva a proteção da célula contra danos oxidativos. A proteína USP exerce função de chaperona quando está em condições de estresse. A atividade de chaperona é regulada pelo estado redox das células e acompanhada pelas modificações estruturais para a proteína.

A função gene *SbUSP (Salicornia brachiata)* foi funcionalmente validada no desenvolvimento de um tabaco transgênico e comparando-o com o controle, ambos sob condições de estresses abióticos. As linhas transgênicas exibiram altos níveis de clorofila, conteúdo relativo de água, prolina, açúcar total, açúcar redutor, aminoácidos livres, potencial osmótico, entre outros. (UDAWAT et al., 2016). A função bioquímica do gene *AtUSP (At3g53990)* da *Arabidopsis thaliana* foi investigado. Plantas que superexpressaram esse gene mostraram maior resistência ao estresse por choque térmico e estresse oxidativo, principalmente pela sua função de chaperona (LUO et al., 2014). Dois genes USP de *Arabidopsis*, *At3g62550* e *At3g53990*, são *up-regulated* em conjuntos de dados de *microarray* em plantas submetidas à seca (ISOKPEHI et al., 2011). Outros dois genes, *GUSP1* e *GUSP2* foram detectados em folhas de *Gossypium arboretum* sob déficit hídrico (LOUKEHAICH et al., 2012).

As *heat shock proteins – HSPs* e outras chaperonas são induzidas por vários tipos de estresses. Elas exercem uma função importante nas interações proteína-proteína, tais como dobramento, auxiliando na conformação apropriada da proteína, estabilizando parcialmente proteínas não dobradas e prevenindo agregações proteicas não desejadas. A indução de HSP é um mecanismo comum de resposta ao calor em todos os organismos (LI et al., 2013). Guo

et al. (2014) estudaram o efeito das proteínas *heat shock* em *Ammopiptanthus mongolicus*, a qual sobrevive no deserto da Ásia central em condições de estresse hídrico, salino e alcalino. Os autores constataram que elas exercem papel ativo na mediação da tolerância à seca, frio e calor.

5.7.2 Análise comparativa entre Controle e Déficit Hídrico

Para análise comparativa entre os tratamentos Controle e Déficit Hídrico as proteínas totais também foram submetidos ao PLS-DA com mesmo objetivo dos metabólitos, o de identificar as que se destacam em relação à resposta ao estresse. Dessa forma, assim como descrito do item 5.4.1, na Figura 22 observa-se que as duas primeiras componentes principais já somam 50% de proporção da variância total da análise. Na Tabela 7 também estão os principais parâmetros de validação da análise, Acurácia igual a 0,66, R^2 igual à 0,99 e Q^2 igual à 0,45. Portanto, esse conjunto de critérios observados determinam que os tratamentos Controle e Déficit Hídrico são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo proteico total.

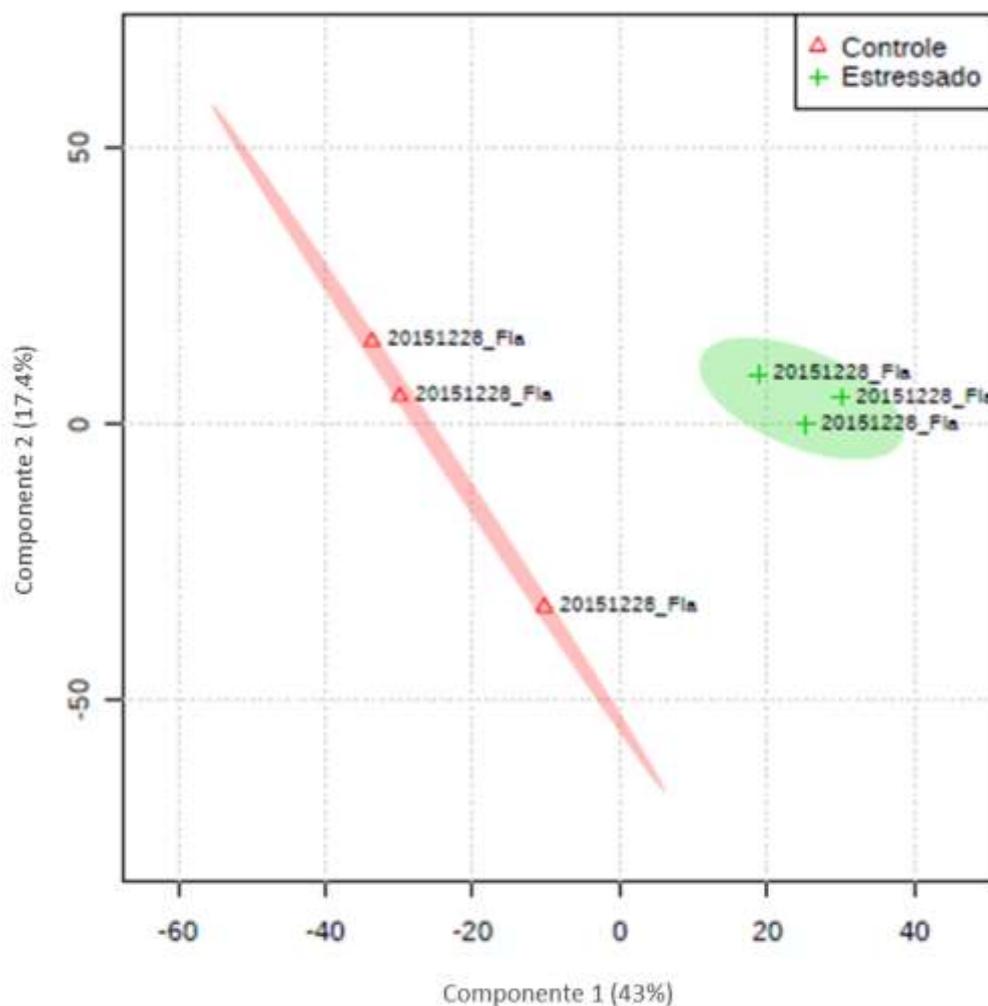


Figura 22 – PLS-DA das proteínas nucleares de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle e Déficit Hídrico (estressado)

Tabela 7 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos dois tratamentos: Controle e Déficit Hídrico. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
Acurácia	0,66667	0,66667	0,66667
R²	0,90563	0,98908	0,99794
Q²	0,51895	0,45911	0,45575

Em seguida, para identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos, foram feitas as mesmas considerações 5.4.1. Dessa forma, foram considerados as que obtiveram soma dos VIPs maior que 1 e *p value* significativo no *t-test*. Como descrito no item anterior, a predição da localização subcelular dessas proteínas diferencialmente expressas foi conduzida com os programas citados no item 4.10, e foram selecionadas as proteínas nucleares. Foram identificadas 21 proteínas diferencialmente expressas entre os

tratamentos e de localização nuclear, e então, foi realizada a classificação funcional das mesmas como descrito no item 4.10 (Anexo). Esses resultados são apresentados na Tabela 8, na qual também estão representados os valores de FC. Com eles, é possível avaliar quantas vezes a proteína está sendo mais ou menos expressa no Déficit Hídrico quando comparada ao Controle. Valores negativos indicam maior expressão no Déficit Hídrico e valores positivos maior expressão no Controle.

Tabela 8 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Déficit Hídrico

(continua)

Proteínas nucleares		Pfam	InterPro		
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log ₂ (FC)
SCQSLR1089C08	chloroplast Ptr ToxA-binding protein [Saccharum hybrid cultivar GT28]	ThylakoidFormat / NA	photosystem II assembly photosynthesis	None predicted.	-9.4984
SCUTRZ2023F12	ATP/GTP-binding protein [Zea mays]	Kinase-PPPase / NA	None predicted.	protein serine/threonine kinase activity ATP binding; transferase activity-transferring phosphorus-containing groups; phosphotransferase activity, phosphate group as acceptor	-8.5094
SCCCRZ2C04B02	proteasome subunit beta type 6 precursor	NA / Proteasome	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	endopeptidase activit; threonine-type endopeptidase activity	-8.4851
SCCCCL3003F11.b	citrate glyoxysomal precursor	Citrate_synt /NA	tricarboxylic acid cycle	transferase activity-transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	-8.4013
SCCCSD1095A07	30S ribosomal protein S9 [Zea mays]	Ribosomal_S9 / NA	translation	structural constituent of ribosome	-8.2256
SCJLLR1011C10	PUTATIVE: aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Setaria italica]	NA / Aminotran_1_2	cellular amino acid metabolic process biosynthetic process	catalytic activity; transaminase activity; pyridoxal phosphate binding	-8.0522
SCCCLR2003G02	60s ribosomal protein l3	Ribosomal_L3 / NA	translation	structural constituent of ribosome	-7.5615
SCCCRZ2003A07	aminopeptidase m	Peptidase_M1 / ERAP1_C	proteolysis lipid transport	lipid transporter activity; metallopeptidase activity; zinc ion binding	-7.5098
SCCCCL3120D10.b	catalase- expressed	Catalase / Catalase-related immune-responsive domain	response to oxidative stress oxidation-reduction process	catalase activity; heme binding	-6.9744

Tabela 8 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Déficit Hídrico

(continuação)

Proteínas nucleares		Pfam	InterPro		
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log ₂ (FC)
SCVPLB1016F07	polyphenol oxidase [Saccharum hybrid cultivar]	NA / Tyrosinase ; PPO1_DWL ; PPO1_KFDV	metabolic process pigment biosynthetic process oxidation-reduction process	catechol oxidase activity; oxidoreductase activity	6.0717
SCRFLB1053B01	ankyrin repeat domain-containing protein 2 [Zea mays]	None predicted.	None predicted.	protein binding	7.173
SCCCCL4011B08	2-isopropylmalate synthase B	NA /HMGL-like;LeuA_dimer	leucine biosynthetic process carboxylic acid metabolic process	catalytic activity; 2-isopropylmalate synthase activity; transferase activity-transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	7.2128
SCEZLB1014G09	PUTATIVE: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A [Setaria italica]	JAB ; MitMem_reg / NA	None predicted.	protein binding	7.7597
SCEZRZ1016D05	polyphenol oxidase [Saccharum hybrid cultivar]	NA / Tyrosinase ; PPO1_DWL ; PPO1_KFDV	metabolic process pigment biosynthetic process oxidation-reduction process	catechol oxidase activity; oxidoreductase activity	8.2584
SCJFRZ2015G01	60S ribosomal protein L18-like protein [Miscanthus sinensis]	Ribosomal_L18e / NA	translation	intracellular; ribosome	8.2763
SCEQAM1036A06	sucrose phosphate synthase B [Saccharum hybrid cultivar ROC22]	Sucrose_synth ; Glycos_transf_1 ; S6PP / NA	sucrose metabolic process	sucrose synthase activity; sucrose-phosphate synthase activity	8.334
SCCCLR2001G11	TPA: plastid-specific 30S ribosomal protein 1 [Zea mays]	Ribosomal_S30AE / Ribosom_S30AE_C	primary metabolic process	None predicted	8.5754
SCCCLB1C04H06	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvatedehydrogenase complex	E3_binding / Biotin_lipoyl	metabolic process	transferase activity-transferring acyl groups	8.7349

Tabela 8 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Déficit Hídrico

(conclusão)

Proteínas nucleares		Pfam		InterPro	
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log₂(FC)
SCCCLR1C07D10	TPA: 40S ribosomal protein S28 [Zea mays]	Ribosomal protein S28e/ NA	translation	structural constituent of ribosome	9.0614
SCQSRT2031G03	Rubisco LS methyltransferase, substrate-binding domain [Saccharum hybrid cultivar R570]	NA / Rubis-subs-bind	None predicted.	None predicted.	9.2067
SCVPLB1015D09	vip1 protein	None predicted.	None predicted.	None predicted.	10.635

Para direcionar a discussão sobre as proteínas nucleares mais importantes no tratamento Déficit Hídrico, foram considerados os processos biológicos mais comuns entre elas. Dessa forma, a partir da representação gráfica da Figura 23, onde estão em destaque (negrito) as funções que mais aparecem, foi conduzida a discussão.

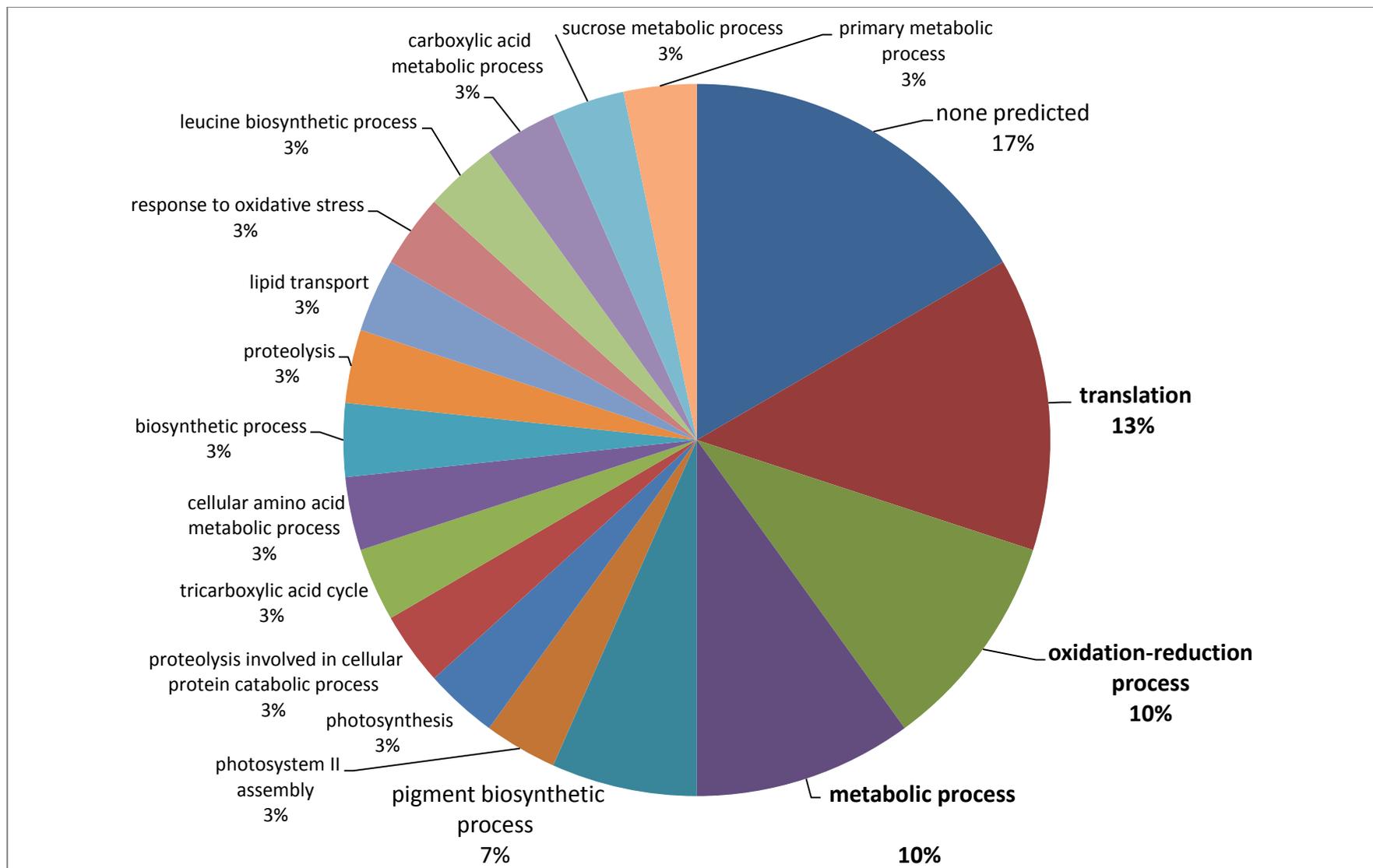


Figura 23 - Classificação funcional das proteínas preferencialmente expressas nos núcleos das amostras da análise comparativa Controle e Déficit Hídrico

A tradução (*translation*) é o processo biológico que representa grande parte das proteínas nucleares identificadas nessa análise comparativa (Figura 23). Entre as proteínas que representam a tradução, estão às proteínas ribossomais constituintes das subunidades dos ribossomos, *30S ribosomal protein S9*, *40S ribosomal protein S28*, constituintes da subunidade pequena e *60S ribosomal protein L3*, *L18-like*, constituintes da subunidade grande. A biogênese dos ribossomos ocorre no núcleo, pois os RNA ribossômicos começam sua rota de montagem juntamente com as proteínas ribossomais na região organizadora de nucléolo e apenas no final essas partículas pré-ribossomais são translocadas para o citoplasma através dos poros nucleares (LAM, 2005). Essa classe de proteínas também foi encontrada como abundante na análise do proteoma nuclear de arroz por Khan e Komatsu (2004).

As proteínas ribossomais apresentaram comportamentos diferentes com relação à abundância das mesmas nos tratamentos, algumas mais abundantes no Controle e outras no Déficit Hídrico, sendo claro então que uma dinâmica na expressão dessas proteínas é necessária para o processo de defesa da planta contra o estresse. Uma das principais respostas das células a condições de estresse envolve parcial ou total interrupção dos processos de consumo energético normalmente vital para homeostase, incluindo transcrição e síntese proteica. O processo de tradução consome uma quantidade substancial de energia celular e, portanto, é um dos principais alvos a serem inibidos em resposta a maioria, se não todos, os tipos de estresses celulares. Entretanto, sob condições onde a síntese global de proteínas é severamente comprometida, algumas proteínas são ainda sintetizadas como parte do mecanismo de sobrevivência celular, uma vez que essas proteínas são capazes de suavizar os danos causados pelo estresse e ativar as células para tolerar as condições de estresse mais eficientemente (HOLCIK; SONENBERG, 2005). Além disso, o aparecimento do estresse abiótico é, em muitos casos, súbito. Portanto, uma resposta rápida deve ser estabelecida para assegurar a sobrevivência da célula. Nesse contexto, a regulação da tradução de RNAs mensageiros - RNAm pré-existentes fornece uma maneira rápida e alternativa de controlar a expressão gênica, quando comparado com outro processo celular mais demorado como transcrição de RNAm, processamento e transporte ao citoplasma (GRABER; HOLCIK, 2007).

Floris et al. (2009) e Muñoz e Castellano (2012) demonstraram que a inibição da tradução geral de RNAm e a tradução seletiva de alguns RNAm envolvidos no desencadeamento de respostas ao estresse são pontos chave no processo de adaptação das plantas a diferentes estresses abióticos, incluindo hipóxia, choque térmico, déficit hídrico e estresse salino. Esses transcritos possuem características especiais que lhes permitem

contornar especificamente os pontos de regulação diferentes da inibição da tradução. Em estudos com uvas *Cabernet Sauvignon* expostas a um estresse hídrico progressivo, Cramer et al. (2013) verificaram que a abundância de várias proteínas mudou antes dos aspectos fisiológicos, como a condutância estomática e fotossíntese. Isso indica que as uvas sentiram o estresse precocemente, aparentando aclimatar-se a ele. As categorias funcionais predominantes das proteínas de resposta precoce incluem a tradução, além de fotossíntese, glicólise, defesa antioxidante e categorias relacionadas ao crescimento.

A fase da iniciação é o principal alvo da regulação da tradução em resposta ao estresse abiótico. Sob condições de estresse abiótico essa iniciação da tradução canônica é impedida por diferentes mecanismos que afetam principalmente a atividade dos fatores de iniciação eIF2 α , eIF4E e eIF4A (HOLCIK; SONENBERG, 2005). Muitas proteínas ribossomais têm sido reportadas por serem *up-* ou *down-regulated* sob várias condições de estresse. Existem proteínas que progressivamente diminuem em abundância durante o estresse e são principalmente envolvidas no metabolismo de proteínas (tradução e dobramento). A proteína *60S ribosomal protein L3* é envolvida na tradução e representa um grande número de proteínas ribossomais que apresentou uma clara diminuição de abundância em uvas submetidas a estresse hídrico (CRAMER et al., 2013). Entretanto, a aclimatação ao estresse também revela um aumento da demanda no metabolismo de proteína incluindo degradação e biossíntese de proteínas. Mudanças nos níveis de muitas proteínas ribossomais, por exemplo, *60S ribosomal protein L3*, *P0*, *P2A*, *L38*, foram reportados indicando um dobramento proteico melhorado durante a aclimatação ao estresse (FERCHA et al., 2014; KOSOVÁ; VÍTÁMVÁS; PRÁŠIL, 2014)

O processo de oxidação e redução (*oxidation-reduction process*), também conhecido como redox, é o processo biológico que também representa grande parte das proteínas nucleares identificadas nessa análise comparativa (Figura 23). Entre as proteínas que o representam, estão às proteínas *catalase-expressed* e duas *polyphenol oxidase*

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio - ROS e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. A transdução de sinal redox é uma característica universal da vida aeróbica que foi refinada através da evolução para balancear informação do metabolismo e do ambiente. Ainda mais importante, os antioxidantes fornecem informação essencial do estado redox da célula, e influenciam a expressão gênica associada a respostas ao estresse abiótico para maximizar a defesa quando ocorre o desequilíbrio. Evidências crescentes sugerem um modelo para homeostase redox em

que a interação entre ROS e os enzimas antioxidantes age como uma interface metabólica para sinais derivados do metabolismo e do ambiente. Essa interface modula a indução apropriada do processo de aclimação. Para o fluxo eficiente através de cascatas de transporte de elétrons da planta é requerida a presença simultânea de ambas as formas oxidadas e reduzidas de transportadores de elétrons (PASTORI, 2002).

Vias de sinalização de ROS são possivelmente feitas pela regulação através do tamponamento antioxidante redox. Devido aos antioxidantes continuarem o processamento de ROS, eles determinam o tempo de vida e a especificidade do sinal ROS. Células vegetais geralmente lidam muito bem com altos níveis de geração de superóxidos, H_2O_2 , até mesmo com oxigênio. Embora oxidação celular seja importante em todas as respostas aos estresses abióticos, a extensão e o significado fisiológico do dano oxidativo é discutível. Por exemplo, plantas com baixa atividade da *catalase* e *peroxidase ascorbate* mostram menos sintomas de estresse severo do que em plantas que faltam uma dessas enzimas (RIZHSKY et al., 2002). O rápido dobramento das proteínas ou o reparo do DNA é aumentado para compensar o aumento da oxidação ou perda dos antioxidantes nessas circunstâncias. Enquanto os ajustes no processo de oxidação e redução são centrais à maioria das respostas ao estresse, a extensão que as concentrações celulares de ROS aumentam como resultado do estresse é altamente variável (YANG; KLOEPPER; RYU, 2009). Isso explica o comportamento diferente das duas proteínas, a *catalase-expressed* mais abundante no estresse e as *polyphenol oxidase* no controle.

Plantas possuem sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos como a catalase - CAT, *superoxide dismutase* – SOD, *ascorbate peroxidase* – APX, entre outras, e defesas não-enzimáticas como *ascorbic acid* – ASH, *glutathione* – GSH, compostos fenólicos que funcionam para controlar as cascatas de oxidação e protegem as plantas de danos oxidativos pela limpeza dos ROS. CAT tem as maiores taxas de *turnover* para todas as enzimas: uma molécula de CAT pode converter, aproximadamente, seis milhões de moléculas de H_2O_2 para H_2O e O_2 por minuto.

Simova-Stoilova et al. (2010) reportaram crescimento da atividade da CAT em trigo sob condição de seca, mas esse aumento foi maior especialmente nas variedades sensíveis. Em outro estudo, Sharma; Shanker (2005) reportaram uma diminuição da atividade de CAT em mudas após o estresse hídrico.

Polyphenol oxidase - PPO possui funções pro- e anti- oxidantes. Mesmo assim, muitas linhas independentes de evidências sugerem que PPO responde a condições ambientais e pode ser envolvida na resposta das plantas ao estresse abiótico (BOECKX et al., 2015). Essa

enzima é encontrada na maioria das plantas e nos produtos gênicos expressos e pode ter função na aclimação ao estresse. A ocorrência da *polyphenol oxidase* é fortemente correlacionada com a emergência de plantas terrestres sugerindo uma função na adaptação ao estresse abiótico associado com um ambiente seco (MAYER, 2006). Além da atividade de PPO ser relacionada ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, sua presença pode ser benéfica como um tampão de oxigênio ou pela regulação slowrelease da fotossíntese (WEBB et al., 2014). Tem sido sugerido um mecanismo de aclimação pelo qual a oxidação de compostos fenólicos acumulados é inibida quando as plantas estão sujeitas à seca. Concomitantemente, a oxidação desses fenólicos acumulados foi proposta em ser inibida por reduções significativas na atividade de *polyphenol oxidase* quando comparados com controles (RIVERO et al., 2001; LEE et al., 2007). O decréscimo da atividade de PPO seguido do estresse abiótico foi associado com uma capacidade antioxidante melhorada. Isso foi sustentado pelo trabalho de Thipyapong, Hunt e Steffens (2004) que mostraram que a supressão de PPO aumentou a tolerância à seca em tomate. Dadas as respostas contrastantes da resposta da atividade de PPO às condições ambientais, não é surpresa que o impacto potencial da atividade da PPO alterada no desenvolvimento da planta, fenótipo e produção é atualmente incerto. (BOECKX et al., 2015).

5.7.3 Análise comparativa entre Controle e Recuperação

Para análise comparativa entre os tratamentos Controle e Recuperação, as proteínas foram submetidas ao PLS-DA. Na Figura 24, observa-se que as duas primeiras componentes principais já somam 50% de proporção da variância total da análise. Na Tabela 9 também estão os principais parâmetros de validação da análise, Acurácia igual a 0,66, R^2 igual à 0,99 e Q^2 igual à 0,60. Portanto, esse conjunto de critérios observados determina que os três tratamentos Controle, Déficit Hídrico e Recuperação são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo proteico.

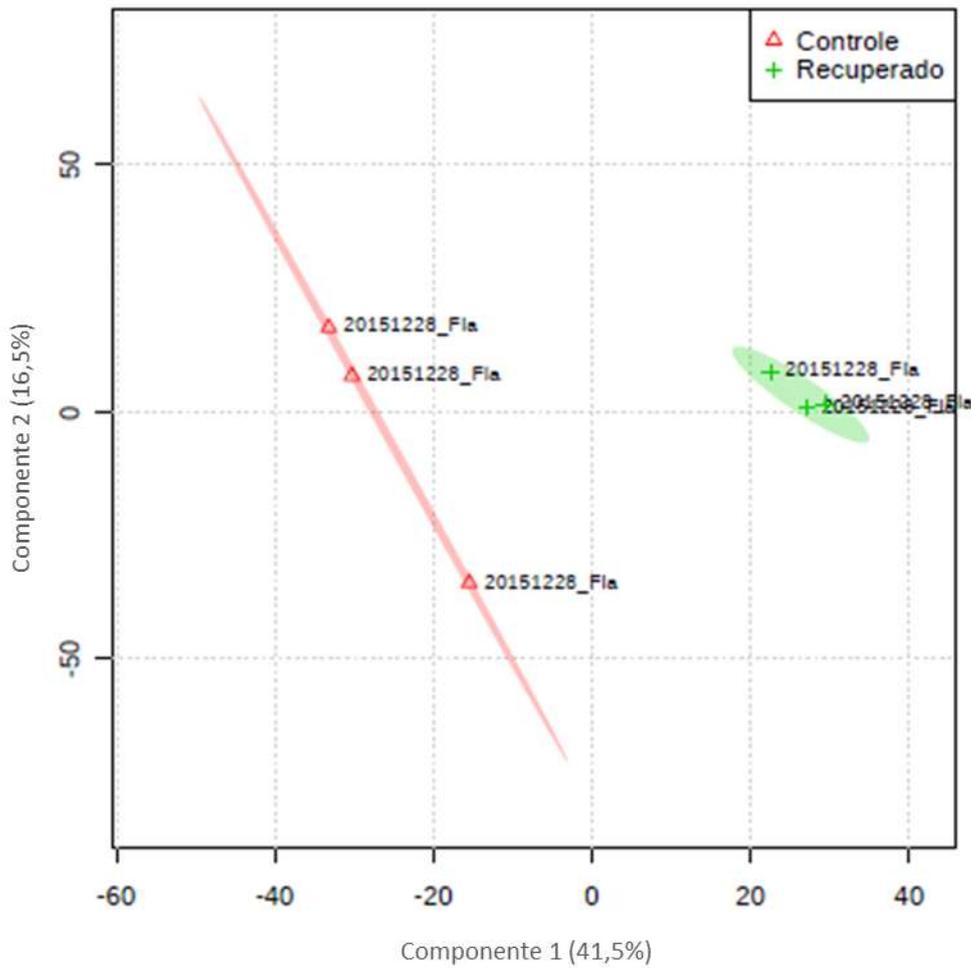


Figura 24 – PLS-DA das proteínas nucleares de folhas de sete meses de idade submetidas a diferentes condições hídricas: Controle e Recuperação (recuperado)

Tabela 9 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa dos dois tratamentos: Controle e Recuperação. Comp. = componente

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
Acurácia	0,66667	0,66667	0,66667
R²	0,95295	0,99761	0,99968
Q²	0,5791	0,59591	0,60788

Em seguida, para identificação das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos, foram feitas as mesmas considerações 5.4.1. Foram consideradas as que obtiveram soma dos VIPs maior que 1 e *p value* significativo no *t-test*. Como descrito no item anterior, a predição da localização subcelular dessas proteínas diferencialmente expressas foi conduzida com os programas citados no item 4.10, e foram selecionadas as proteínas nucleares. A partir da seleção das diferencialmente expressas entres os tratamentos e de

localização nuclear, um total de 32 proteínas, foi realizada a classificação funcional como descrito no item 4.10. (Anexo). Esses resultados se apresentam na Tabela 10, na qual também estão representados os valores de FC. Com eles, é possível avaliar quantas vezes a proteína está sendo mais ou menos expressa na Recuperação quando comparada ao Controle. Valores negativos indicam maior expressão na Recuperação e valores positivos maior expressão no Controle.

Tabela 10 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Recuperação

(continua)

ID	Proteínas nucleares Descrição	Pfam	InterPro		
		Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log2(FC)
SCJLRT1016A04	plastid-lipid-associated protein 2	PAP_fibrillin / NA	None predicted	None predicted	-9.7269
SCAGFL1085C10	chloroplast lipocalin	NA / Lipocalin_2	None predicted	None predicted	-9.4814
SCJFRZ2033G02	plastid-lipid associated protein 3	PAP_fibrillin / NA	None predicted	None predicted	-9.315
SCQGLR1085E02	putative protein SORBIDRAFT_04g001720 [Sorghum bicolor]	NA / CSD	regulation of transcription - DNA- templated	nucleic acid binding; DNA binding	-8.8436
SCRUFL4022D09	putative protein SORBIDRAFT_06g022380 [Sorghum bicolor]	NA	NA	NA	-8.5265
SCUTLR1058B02	s-adenosylmethionine synthetase 1	NA / S-AdoMet_synt_N; S- AdoMet_synt_M; S-AdoMet_synt_C	S-adenosylmethionine biosynthetic process	methionine adenosyltransferase activity; ATP binding	-8.4456
SCCCLR1072E04	usp family protein	NA / Usp	response to stress	None predicted	-8.4296
SCQSLR1089A11	carotenoid cleavage dioxygenase	RPE65 / NA	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen	-8.2908
SCRLSD1009H10	putative protein SORBIDRAFT_04g001270 [Sorghum bicolor]	NA / DUF1995	None predicted	None predicted	-7.9046
SCUTST3128B03	harpin binding protein 1	PAP_fibrillin / NA	None predicted	None predicted	-4.0504
SCBFRZ2045A05	putative protein SORBIDRAFT_06g033090 [Sorghum bicolor]	None predicted	None predicted	None predicted	5.6476
SCVPLB1016F07	polyphenol oxidase	NA / Tyrosinase; PPO1_DWL; PPO1_DWL	metabolic process pigment biosynthetic process oxidation-reduction process	catechol oxidase activity; oxidoreductase activity	6.0717

Tabela 10 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Recuperação

(continuação)

Proteínas nucleares		Pfam	InterPro		
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log ₂ (FC)
SCACLR2007D12	proteasome subunit beta type 1	NA / Proteasome	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	endopeptidase activity; threonine-type endopeptidase activity	6.421
SCAGLR2026H05	proteasome subunit alpha type 5	NA / Proteasome_A_N;Proteasome	ubiquitin-dependent protein catabolic process proteolysis involved in cellular protein catabolic process	endopeptidase activity; threonine-type endopeptidase activity	7.0041
SCCCCL4011B08	2-isopropylmalate synthase b	NA / HMGL-like;LeuA_dimer	leucine biosynthetic process carboxylic acid metabolic process	catalytic activity; 2-isopropylmalate synthase activity; transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	7.2128
SCCCLR1001H04	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kda protein	UCR_14kD / NA	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c translation	None predicted.	7.2531
SCRFLR1012C07	60s ribosomal protein	Ribosomal_L13 / NA		structural constituent of ribosome	7.5976
SCCCLR1048G12	proteasome subunit beta type 2	NA / Proteasome	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	endopeptidase activity; threonine-type endopeptidase activity	8.1272
SCRULR1020D11	fructose-bisphosphate aldolase	NA / Glycolytic	glycolytic process	catalytic activity; fructose-bisphosphate aldolase activity	8.2219
SCCCST2002G06	protein binding protein	NA / Vwaint	None predicted	None predicted	8.2632
SCJFRZ2015G01	60s ribosomal protein 118	Ribosomal_L18e / NA	translation	structural constituent of ribosome	8.2763
SCCCCL4008F04	40s ribosomal protein s27	Ribosomal_S27e / NA	translation	structural constituent of ribosome	8.3687

Tabela 10 – Proteínas nucleares diferencialmente expressas entre amostras Controle e Recuperação

(conclusão)

Proteínas nucleares		Pfam	InterPro		
ID	Descrição	Família/Domínio	Processo Biológico	Função Molecular	log ₂ (FC)
SCCCLR1001B04	alpha 1 subunit of 20s proteasome	NA / Proteasome_A_N;Proteasome	ubiquitin-dependent protein catabolic process proteolysis involved in cellular protein catabolic process	endopeptidase activity; threonine-type endopeptidase activity	8.4009
SCCCRT1C06B08	putative protein SORBIDRAFT_07g028880 [Sorghum bicolor]	DUF3252 / NA	None predicted.	None predicted.	8.5399
SCCCLR2001G11	plastid-specific 30s ribosomal protein 1	Ribosomal_S30AE / Ribosom_S30AE_C	primary metabolic process	None predicted.	8.5754
SCCCLR2C01F11	40s ribosomal protein s10	NA / S10_plectin	None predicted.	None predicted.	8.7138
SCCCLB1C04H06	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	E3_binding / Biotin_lipoyl	metabolic process	transferase activity, transferring acyl groups	8.7349
SCSGHR1066A02	50s ribosomal protein chloroplast expressed	Ribosomal_L18e / NA	translation	structural constituent of ribosome	8.871
SCCCLR1C07D10	40s ribosomal protein s28	Ribosomal_S28e / NA	translation	structural constituent of ribosome	9.0614
SCCCCL3140B12	60s ribosomal protein l4	Ribosomal_L4 / Ribos_L4_asso_C	translation	structural constituent of ribosome	9.6099
SCCCLR2001F07	40s ribosomal protein s20	Ribosomal_S10 / NA	translation	structural constituent of ribosome	10.012
SCVPLB1015D09	vip1 protein	NA	None predicted.	None predicted.	10.635

Para direcionar a discussão com relação às proteínas do processo de Recuperação, assim como descrito na análise comparativa anterior, foram considerados os processos biológicos mais comuns entre as proteínas. Dessa forma, a partir da representação gráfica da Figura 25 , onde estão em destaque (**negrito**) as funções que mais aparecem, foi conduzida a discussão.

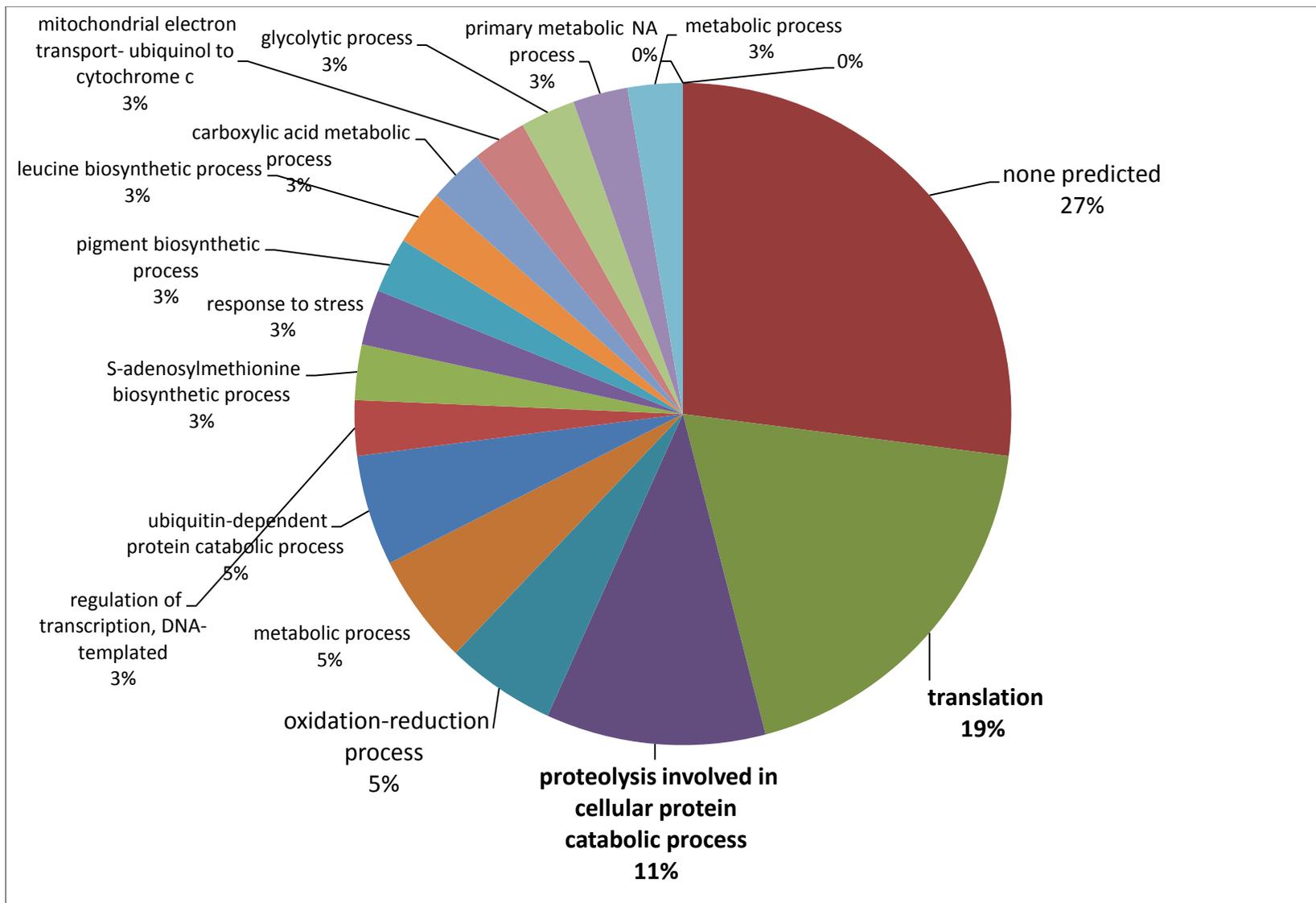


Figura 25 - Classificação funcional das proteínas preferencialmente expressas nos núcleos das amostras da análise comparativa Controle e Recuperação

Nessa análise comparativa, a tradução também é o processo biológico que representa grande parte das proteínas nucleares identificadas (Figura 25). Entre as proteínas que representam a tradução, estão às proteínas ribossomais constituintes das subunidades dos ribossomos, *40S ribosomal protein S27, S28, S20*, constituintes da subunidade pequena e *60S ribosomal protein L18, L17*, constituintes da subunidade maior. Além de *60S ribosomal protein* e *50S ribosomal protein chloroplast expressed*.

As proteínas ribossomais estão relacionadas ao processo de recuperação das plantas por fazerem parte do processo de tradução proteica. Em recuperação, ocorre alteração no controle da tradução, ao nível de recrutamento do transcrito dentro dos polissomos e ao nível de acúmulo desses transcritos. Dessa forma, existe então a preferência na seleção de RNAs de um novo conjunto sintetizado em relação aos RNAs conservados. Durante a fase de recuperação, RNAs relacionados à seca desaparecem e novos RNAs são encontrados. Isso enfatiza a importância da síntese proteica *de novo* para iniciar os processos bioquímicos em folhas necessários para orquestrar uma recuperação apropriada do estresse diferente da resposta ao estresse. Além disso, é possível que as proteínas de reidratação possam proteger organelas ou os processos de transcrição ou de tradução.

Em estudo sobre a rede regulatória complexa, composta pelo *turnover* das proteínas e classes regulatórias de proteínas e metabólitos, durante um cenário de recuperação do estresse no legume modelo *Medicago truncatula*, os autores constataram que a categoria “regulação protéica” foi encontrada como a maior durante a resposta de reidratação em raízes e brotos, assim como durante o déficit hídrico. Além disso, apenas duas proteínas foram comuns entre estresse e recuperação, indicando que mecanismos de estresse de recuperação são independentes. Os dados do estudo demonstram um recomeço do aparato de síntese proteica regulado a nível ribossomal diretamente sob reidratação de 96 horas. Por fim, também constataram que proteínas ribossomais estão entre as primeiras a responderem sob seca e recuperação (LYON et al., 2016). Em plantas de *Craferosfigma plantagineum*, as etapas de reidratação são correlacionadas com mudanças moleculares e enzimáticas ao nível celular, levando à mudança de um estado adaptado a desidratação para uma planta totalmente ativa fisiologicamente. Durante as fases tardias ou posteriores da recuperação, começando das 15h de reidratação, mudanças no perfil proteico que refletem em mudanças nas populações de RNAm traduzíveis foram observadas. Produtos relacionados com a dessecação desapareceram e novos peptídeos relacionados à recuperação acumularam (BERNACCHIA, GIOVANNI, 1996). Oliver e Bewley (1984) estudaram o mecanismo de recuperação das plantas *Tortula ruralis*, as quais são totalmente adaptadas a sobreviver em ambiente de seca, sendo assim,

para as quais esse estresse é uma característica comum do seu *habitat* natural. Nesse estudo constataram que a resposta de recuperação ocorre por uma alteração na expressão do gene apenas no nível de tradução, pela preferência na seleção de RNAs de um novo conjunto sintetizado em relação aos RNAs conservados. Ainda segundo os autores, a primeira mudança no controle da tradução não é um resultado da alteração da viabilidade de mRNA conservado devido a dessecação. Os conjuntos de RNA conservados diminuem sob hidratação, ao nível que se tornam iguais às amostras controle, que foram mantidas irrigadas. Em um esforço contínuo para entender a tolerância a dessecação, Scott e Oliver (1994), isolaram cDNA que representavam os transcritos envolvidos na resposta dos musgos *Tortula ruralis* tolerantes à dessecação e reidratação. As características de expressão desses clones confirmaram a hipótese de que a resposta do musgo a dessecação e reidratação envolve alteração no controle da tradução ao nível de recrutamento do transcrito dentro dos polissomos e, também, ao nível de acúmulo desses transcritos (SCOTT; OLIVER, 1994). Com o objetivo de explorar nos detalhes a base molecular da resposta das fibras do algodão ao estresse hídrico e à reidratação, Hao et al. (2015) investigaram as mudanças temporárias no proteoma da fibra do algodão sob estresse hídrico e recuperação, utilizando o cultivar NuCOTN 33B. As proteínas identificadas são associadas com uma variedade de funções celulares, por exemplo, transdução de sinal, processamento de proteínas, homeostase redox, modificação de parede celular, metabolismo de carbono, energia, lipídios, lignina e flavonoides. Elas foram classificadas em 11 categorias funcionais, entre elas 10 proteínas para o metabolismo de proteínas, segunda categoria mais presente.

A proteólise envolvida no processo catabólico proteico das células (*proteolysis involved in cellular protein catabolic process*), também representa grande parte das proteínas nucleares identificadas nessa análise comparativa (Figura 25). Entre as proteínas que o representam, estão às proteínas *proteasome subunit beta type 1*, *proteasome subunit alpha type 5*, *proteasome subunit beta type 2*, *alpha 1 subunit of 20s proteasome*.

O proteossoma é um complexo de proteínas capaz de degradar qualquer proteína em oligopeptídeos. Em circunstâncias celulares adversas em que carboidratos são escassos, como durante o processo de recuperação do estresse, plantas podem metabolizar proteínas e lipídios como substratos respiratórios alternativos. A respiração de proteína é menos eficiente do que de carboidratos, entretanto, sob condições adversas, isso representa uma fonte de energia alternativa importante para a célula. Além disso, condições estressantes como falta de nutrientes, choque térmico, exposição a metais pesados aceleram a desnaturação. O estresse

não somente induz a síntese de uma variedade de proteínas relacionadas a esse processo que ajudam a reverter à desnaturação proteica, mas também ativam vias proteolíticas específicas.

A respiração das plantas é principalmente dependente da oxidação de carboidratos (PLAXTON; PODESTÁ, 2006). Apesar disso, sob algumas circunstâncias, quando o suprimento de carboidratos é insuficiente, o metabolismo das células das plantas é modificado e as vias enzimáticas necessárias são induzidas com o objetivo de quebrar os substratos alternativos para a respiração. Nas plantas sob condições de estresse ambiental três substratos alternativos são comumente mobilizados: proteínas, lipídios e clorofila (KUNZ et al., 2009). Tem sido demonstrado que a proteólise é induzida durante a falta de carbono nas plantas. A degradação e o *turnover* proteico no estresse fornecem substratos alternativos para a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Os produtos da degradação podem fornecer elétrons tanto diretamente à cadeia transportadora de elétrons via complexo ETF (*functional electron transfer flavoprotein*), assim como indiretamente por seus produtos catabólicos alimentarem diretamente no ciclo de Krebs (ARAÚJO et al., 2011).

Plantas compartilham características comuns da degradação de proteínas com os mamíferos, por exemplo, a ubiquitinação de proteínas, que as tornam alvos para degradação pelo proteassoma (STUTTMANN et al., 2009). A ubiquitinação é o mecanismo pelo qual proteínas alvo do proteassoma são marcadas para degradação, esse processo *per se* é uma modificação pós-traducional (SULLIVAN; SHIRASU; DENG, 2003). A etapa final do ciclo de vida das proteínas é normalmente associada com o *26S proteasome complex* encontrado no núcleo e no citoplasma das plantas (VIERSTRA, 1996). A proteólise dependente de ATP pelo proteassoma 26S é essencial para inumeráveis processos celulares que controlam a degradação de proteínas que precisam ser marcados pela ubiquitina.

A regulação da quebra protéica e as proteases exercem função essencial no processo de proteólise, o qual é componente necessário para resposta das plantas ao estresse abiótico (JANGPROMMA et al., 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O núcleo como principal organela regulatória da célula organiza a expressão das proteínas necessárias para os processos de defesa e recuperação da planta. Os metabólitos são os produtos finais das vias que foram reguladas pela expressão dessas proteínas e indicam o resultado final desses processos na folha como um todo. Dessa forma, esse estudo permitiu a caracterização da resposta da cana-de-açúcar quando em déficit hídrico e também depois de reidratada. Essas informações são base para o entendimento dos mecanismos regulatórios de defesa e recuperação da cana-de-açúcar.

Na análise comparativa entre Controle e Déficit Hídrico foram identificados os metabólitos e as proteínas responsáveis pela defesa da planta. Em torno de 24% (21) de todos os metabólitos identificados (86) mudaram significativamente no processo de defesa da planta ao Déficit Hídrico quando comparado ao Controle. Desses, 38% (8) são preferencialmente abundantes no estresse e, portanto, podem ser utilizados como marcadores e indicadores desse tipo estresse na planta. Das proteínas totais identificadas (761), 6% (44) foram expressas diferencialmente entre as amostras Controle e Déficit Hídrico e dessas, 53% (21) são de localização nuclear e participam do processo de defesa da planta, portanto, são responsivas ao déficit hídrico. As classes funcionais comuns entre as proteínas responsivas são tradução (*translation*) e processo de oxi-redução (*oxidation-reduction process*).

Já na análise comparativa entre Controle e Recuperação foram identificados os metabólitos e as proteínas que fazem parte do processo de recuperação da planta. Para os metabólitos totais, 24% (21) mudaram significativamente no processo de recuperação das plantas, e desses, 47% (10) são preferencialmente abundantes no tratamento Recuperação e portanto, são os que podem ser utilizados como marcadores de recuperação do estresse. Para as proteínas totais identificadas, 8% (60) foram diferencialmente expressas na Recuperação, e dessas, 52% (32) são de localização nuclear e responsivas à recuperação. As classes funcionais comuns entre essas proteínas são tradução (*translation*) e proteólise envolvida no processo catabólico proteico celular (*proteolysis involved in cellular protein catabolic process*).

A combinação de diferentes técnicas nesse estudo revela uma dinâmica regulatória complexa no mecanismo de tolerância da cana-de-açúcar que ainda não foi discutida na literatura. A caracterização do metaboloma foliar e da proteômica nuclear foliar constituem uma sólida base para estudos futuros onde esses dados podem ser correlacionados buscando melhor entendimento da dinâmica da planta quando em déficit hídrico, e se recuperando dele.

Portanto, além de prover base para futuros estudos sobre os mecanismos de tolerância da cana-de-açúcar ao déficit hídrico, este trabalho forneceu novas ferramentas para a engenharia genética, obtendo um panorama do proteoma e do metaboloma da cana-de-açúcar em situações de déficit hídrico e de recuperação.

REFERÊNCIAS

- ABDOLZADE-BAVIL, A.; HAYES, S.; GORETZKI, L.; KRÖGER, M.; ANDERS, J.; HENDRIKS, R. Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 5, p. 1397–1405, 2004.
- ALLA, M.M.N.; KHEDR, A.H.A.; SERAG, M.M.; ABU-ALNAGA, A.Z.; NADA, R.M. Regulation of metabolomics in *Atriplex halimus* growth under salt and drought stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 67, n. 3, p. 281–304, 2012.
- ALLAN, W.L.; SIMPSON, J.P.; CLARK, S.M.; SHELP, B.J. 2-Hydroxybutyrate accumulation in Arabidopsis and tobacco plants is a general response to abiotic stress: Putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 2555–2564, 2008.
- ALLAN, W.L.; BREITKREUZ, K.E.; WALLER, J.C.; SIMPSON, J.P.; HOOVER, G.J.; ROCHON, A.; WOLYN, D.J.; RENTSCH, D.; SNEDDEN, W.A.; SHELP, B.J. Detoxification of succinate semialdehyde in Arabidopsis glyoxylate reductase and NAD kinase mutants subjected to submergence stress. **Botany**, Ottawa, v. 90, n. 1, p. 51–61, Jan. 2012.
- ALMARAJ, R.S. SELVARAJ, N.; VELUSWAMY, G.K.; RAMANUJAN, R.P.; MUTHURAJAN, R.; PALANIYANDI, M. Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, Kyoto, Weinheim, v. 31, p. 1959–1974, 2010.
- AN, S.H.; SOHN, K.H.; CHOI, H.W.; HWANG, I.S.; LEE, S.C.; HWANG, B.K. Pepper pectin methyltransferase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. **Planta**, New York, v. 228, n. 1, p. 61–78, 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Paris, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARAÚJO, W.L.; TOHGE, T.; ISHIZAKI, K.; LEAVER, C.J.; FERNIE, A.R. Protein degradation: an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 16, n. 9, p. 489–498, June 2011
- AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, Vienna, v. 20, n. 3, p. 261–279, 2001.
- AZMAT, R.; HAIDER, S.; NASREEN, H.; AZIZ, F.; RIAZ, M. A viable alternative mechanism in adapting the heavy metal environment. **Biochemistry**, Karachi, v. 41, n. 6, p. 2729–2738, 2009.
- BANCEL, E.; BONNOT, T.; DAVANTURE, M.; BRANLARD, G.; ZIVY, M.; MARTRE, P. Proteomic approach to identify nuclear proteins in wheat grain. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 14, n. 10, p. 4432–4439, 2015.

- BARNABY, J.Y.; KIM, M.; BAUCHAN, G.; BUNCE, J.; REDDY, V.; SICHER, R.C. Drought responses of foliar metabolites in three maize hybrids differing in water stress tolerance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.
- BERNACCHIA, G.F.; SALAMINI, D.B. Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1 996, p. 1043–1 050, 1996.
- BOECKX, T.; WINTERS, A. L.; WEBB, K. J.; KINGSTON-SMITH, A. H. Polyphenol oxidase in leaves: Is there any significance to the chloroplastic localization? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 12, p. 3571–3579, 2015.
- BOISVERT, F.-M.; LAM, Y.W.; LAMONT, D.; LAMOND, A.I. A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, Rockville, v. 9, n. 3, p. 457–470, 2010.
- BORUC, J.; ZHOU, X.; MEIER, I. Dynamics of the plant nuclear envelope and nuclear pore. **Plant Physiology**, Lancaster, Rockville, v. 158, p. 78– 86, 2012.
- BOWNE, J.B.; ERWIN, T.A.; JUTTNER, J.; SCHNURBUSCH, T.; LANGRIDGE, P.; BACIC, A.; ROESSNER, U. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 5, p. 418–429, 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248–254, 1976.
- BROHAWN, S.G.; PARTRIDGE, J.R.; WHITTLE, J.R.R.; SCHWARTZ, T.U. The nuclear pore complex has entered the atomic age. **Structure**, London, v. 17, p. 1156–1168, 2009.
- BRUNET, S.; THIBAUT, P.; GAGNON, E.; KEARNEY, P.; BERGERON, J. J. M.; DESJARDINS, M. Organelle proteomics: looking at less to see more. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 13, p. 629 – 638, 2003.
- BURGE, S.; KELLY, E.; LONSDALE, D.; MUTOWO-MUELLENET, P.; MCANULLA, C.; MITCHELL, A.; SANGRADOR-VEGAS, A.; YONG, S.Y.; MULDER, N.; HUNTER, S. Manual GO annotation of predictive protein signatures: the InterPro approach to GO curation. **Database : the Journal of Biological Databases and Curation**, Oxford, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS, I. To be or not to be in the nucleolus. **Nature Cell Biology**, London, v. 2, p. E107–E112, 2000.
- CASAGRANDE, A.A.; VASCONCELOS, A.C.M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2010. cap. 3, p. 57 78.
- CHEN, X.; GUO, W.; ZHANG, T. Cotton omics in China. **Plant Omics**, Lismore, v. 4, n. 6, p. 278–287, 2011.

CHEUNG, A.Y.; REDDY, A.S.N. Nuclear architecture and dynamics: territories, nuclear bodies, and nucleocytoplasmic trafficking. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 258, p. 23–25, 2012.

CHO, M.H.; COREA, O.R.A.; YANG, H.; BEDGAR, D.L.; LASKAR, D.D.; ANTEROLA, A.M.; MOOG-ANTEROLA, F.A.; HOOD, R.L.; KOHALMI, S.E.; BERNARDS, M.A.; KANG, C.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Identification and characterization of arogenate dehydratases. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 282, n. 42, p. 30827–30835, 2007.

CHOUHDARY, M.K.; BASU, D.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, S. Dehydration-responsive nuclear proteome of rice (*Oryza sativa* L.) illustrates protein network, novel regulators of cellular adaptation, and evolutionary perspective. **Molecular & Cellular Proteomics: MCP**, Rockville, v. 8, n. 7, p. 1579–1598, 2009.

COLQUHOUN, I.J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems. **Journal of Pesticide Science**, Norwich, v. 32, n. 7, p. 200–212, 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - quarto levantamento safra 2015/16**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

COOK, D.; GRUM, D.S.; GARDNER, D.R.; WELCH, K.D.; PFISTER, J. A. Influence of endophyte genotype on swainsonine concentrations in *Oxytropis sericea*. **Toxicon**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 105–111, 2013.

CRAMER, G.R.; VAN SLUYTER, S.C.; HOPPER, D.W.; PASCOVICI, D.; KEIGHLEY, T.; HAYNES, P.A. Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to water deficit. **BMC plant biology**, London, v. 13, n. 1, p. 49, 2013.

CRUTCHFIELD, C.A.; MELAMUD, W.; LU, E.; RABINOWITZ, J.D. **Visualizing RNA dynamics in the cell**. Oxford: Academic Press, 2010. 384 p. (Methods in Enzymology, 352).

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

DAVEY, M.P.; IAN WOODWARD, F.; PAUL QUICK, W. Intraspecific variation in cold-temperature metabolic phenotypes of *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. **Metabolomics**, New York, v. 5, n. 1, p. 138–149, 2009.

DEAN, J.V.; MILLS, J.D. Uptake of salicylic acid 2- O - b - D -glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, p. 603–612, 2004.

- DEBOER, K.D.; DALTON, H.L.; EDWARD, F.J.; HAMILL, J.D. RNAi-mediated down-regulation of ornithine decarboxylase (ODC) leads to reduced nicotine and increased anatabine levels in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, n. 4/5, p. 344–355, 2011.
- DEMPSEY, D.A.; VLOT, A.C.; WILDERMUTH, M.C.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **The Arabidopsis Book**, New York, v. 9, p. e0156, 2011.
- DREGER, M. Proteome analysis at the level of subcellular structures. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 589–599, 2003.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417–440, 2006.
- DUNDR, M.; MISTELI, T. Functional architecture in the cell nucleus. **Biochemical Journal**, London, v. 356, p. 297–310, 2001.
- EDWARDS, D.; BATLEY, J. Plant bioinformatics: from genome to phenome. **Trends Biotechnology**, London, v. 22, p. 232–237, 2004.
- EMBRAPA. **Cultivo do milho**: glossário. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/glossario.htm>. Acesso em: 26 abr. 2016.
- ENDRES, L. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, Oak-Park, v. 4, p. 31–37, 2010.
- ERHARDT, M.; ADAMSKA, I.; FRANCO, O.L. Plant nuclear proteomics: inside the cell maestro. **The FEBS Journal**, Hoboken, v. 277, p. 3295–3307, 2010.
- FARRÉS, J.; HOLMBERG, N.; SCHLATTNER, U.; BAILEY, J. E.; WALLIMANN, T.; KALLIO, P.T. Expressing creatine kinase in transgenic tobacco: a first step towards introducing an energy buffering system in plants. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 49–59, Feb. 2002.
- FERCHA, A.; CAPRIOTTI, A.L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; SAMPERI, R.; STAMPACHIACCHIERE, S.; LAGAN, A. Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 108, p. 238–257, 2014.
- FIEHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R.N. WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, Berlin, v. 18, p. 1157–1161, 2000.
- FINK, J.L.; KARUNARATNE, S.; MITTAL, A.; GARDINER, D.M.; HAMILTON, N.; MAHONY, D.; KAI, C.; SUZUKI, H.; HAYASHIZAKI, Y. Towards defining the nuclear proteome. **Genome Biology**, London, v. 9, R15, 2008.

FINKEMEIER, I.; SWEETLOVE, L.J. The role of malate in plant homeostasis. **Biology Reports**, Oxford, v. 13410, p. 47–1, June 2009.

FLORIS, M.; MAHGOUB, H.; LANET, E.; ROBAGLIA, C.; MENAND, B. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Marselha, v. 10, n. 7, p. 3168–3185, 2009.

FOLTA, K.M.; KAUFMAN, L.S. Preparation of transcriptionally active nuclei from etiolated *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 5, p. 504–510, Apr. 2000.

FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; REDESTIG, H.; ARITA, M.; SAITO, K. Integrated omics approaches in plant systems biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 13, p. 532–538, 2009.

GALMÉS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 653–665, 2011

GEBRE, G.M.; BRANDLE, J.R.; KUHNS, M.R. Influence of rewatering and time of sampling on solute accumulation of two *Populus deltoides* clones. **Tree Physiology**, Victoria, v. 17, n. 5, p. 341–6, 1997.

GILAR, M.; OLIVOVA, P.; DALY, A.E.; GEBLER, J.C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 28, n. 14, p. 1694–1703, 2005.

GOOD, A.G.; ZAPLACHINSKI, S.T. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. Morgan 1984, p. 9–14, 2006.

GOUW, J.A. **Plants signal stress with a toluene burst**. Disponível em <<http://www.thefreelibrary.com/Plants+signal+stress+with+a+toluene+burst.-a054644667>>. Acessado em: 25 set. 2015.

GRABER, T.E.; HOLCIK, M. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 3, n. 12, p. 825, 2007.

GUO, H.; LI, Z.; ZHOU, M.; CHENG, H. cDNA-AFLP analysis reveals heat shock proteins play important roles in mediating cold, heat, and drought tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*. **Functional & Integrative Genomics**, Heidelberg, v. 14, n. 1, p. 127–133, Mar. 2014.

GUY, C.; KOPKA, J.; MORITZ, T. Plant metabolomics coming of age. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 132, p. 113–116, 2008.

HAO, P.; ZHU, J.; GU, A.; LV, D.; GE, P.; CHEN, G.; LI, X.; YAN, Y. An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. **Proteomics**, Hoboken, v. 15, n. 9, p. 1544–1563, 2015.

HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; NOVOA, I.; LU, P.D.; CALFON, M.; SADRI, N.; YUN, C.; POPKO, B.; PAULES, R.; STOJDL, D.F.; BELL, J.C.; HETTMANN, T.; LEIDEN, J.M.; RON, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 619–633, 2003.

HAYAT, S.; HASAN, S.A.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 3, n. 4, p. 297–304, 2008.

HAYNES, P.A.; ROBERTS, T.H. Subcellular shotgun proteomics in plants: Looking beyond the usual suspects. **Proteomics**, Malden, v. 7, p. 2963–2975, 2007.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics: putting the green genomes to work. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 30 p. 471–482, 2003.

HOCHBERG, U.; DEGU, A.; TOUBIANA, D.; GENDLER, T.; NIKOLOSKI, Z.; RACHMILEVITCH, S.; FAIT, A. Metabolite profiling and network analysis reveal coordinated changes in grapevine water stress response. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 184, Dec. 2013.

HOFFMAN, D.E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M.E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 33, n. 8, p. 1298–1313, 2010.

HOFFMAN, D.E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M.E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 33, n. 8, p. 1298–1313, 2010.

HOLCIK, M.; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 318–327, Apr. 2005.

HU, T.; LIU, S.; AMOMBO, E.; FU, J. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. **Frontiers in front Science**, Lausanne, v. 6, p. 1–13, June 2015.

HUBER, L.A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 4, p. 74–80, 2003.

INMAN-BAMBER, N.G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, London, v. 89, p. 107-122, 2004.

INMAN-BAMBER, N.G.; JAGER, J.M. de. Effect of water stress on growth, leaf resistance and canopy temperature in field-grown sugarcane. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Bloemfontein, v.60, p.156-161, 1986.

INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, London, v. 92, p. 185–202, 2005.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 8, p. 3371–3399, 2009.

ISOKPEHI, R.D.; SIMMONS, S.S.; COHLY, H.H.P.; EKUNWE, S.I.N.; BEGONIA, G.B.; AYENSU, W.K. Identification of drought-responsive universal stress proteins in viridiplantae. **Bioinformatics and Biology Insights**, Auckland, v. 5, p. 41–58, 2011.

IZILDA, D. **Caracterização do proteoma nuclear de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) de 1 e 4 meses de idade**. 2012. 170 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

JANGPROMMA, N.; SAITO, A.; ARAKI, T.; JAISIL, P.; SONGSRI, P.; DADUANG, S.; KAWAGUCHI, Y.; DHIRAVISIT, A.; THAMMASIRIRAK, S. Molecular cloning and characterization in eukaryotic expression systems of a sugarcane cysteine protease inhibitor gene involved in drought tolerance. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 38, n. 4, p. 724–736, 2014.

JOAQUIM, A.P. **Estudo das etapas de ativação do processo de benzilação da polpa de medulla de bagaço de cana-de-açúcar**. 1997. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

JONSSON, P.; JOHANSSON, A.I.; GULLBERG, J.; TRYGG, J.A.J.; GRUNG, B.; MARKLUND, S.; SJÖSTRÖM, M.; ANTTI, H.; MORITZ, T. High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 77, n. 17, p. 5635–5642, Sept. 2005.

JUNG, E.; HELLER, M.; SANCHEZ, J.C.; HOCHSTRASSER, D.F. Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. **Electrophoresis**, Kyoto, v. 21, p. 3369–3377, 2000.

KHAN, M.K.; KOMATSU, S. Rice proteomics : recent developments and analysis of nuclear proteins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 12, p. 1671–1681, 2004.

KORN, M.; GA, T. Predicting Arabidopsis freezing tolerance and heterosis in freezing tolerance from metabolite composition. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 224–235, 2010.

KOSE, F.; WECKWERTH, W.; LINKE, T.; FIEHN, O. Visualizing plant metabolomic correlation networks using clique-metabolite matrices. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1198–1208, Dec. 2001.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T. Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 711, p. 1–14, 2014.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.

- KUNZ, H.H.; SCHARNEWSKI, M.; FEUSSNER, K.; FEUSSNER, I.; FLUGGE, U.I.; FULDA, M.; GIERTH, M. The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 9, p. 2733–2749, 2009.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v. 227, n. 5259, p. 680–685, Aug. 1970.
- LAM, Y.W. The nucleolus. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, n. 7, p. 1335–1337, Apr. 2005.
- LAMOND, A.I.; EARNSHAW, W.C. Structure and function in the nucleus. **Science**, Washington, v. 280, p. 547–553, 1998.
- LAMOND, A.I.; SPECTOR, D.L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 4, p. 605–612, 2003.
- LANARAS, T.; MOUSTAKAS, M.; SYMEONIDIS, L.; DIAMANTOGLIOU, S.; KARATAGLIS, S. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, n. 2, p. 307–314, June 1993.
- LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 25, p. 275–294, 2002.
- LEE, B.R.; KIM, K.Y.; JUNG, W.J.; AVICE, J.C.; OURRY, A.; KIM, T.H. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1271–1279, 2007.
- LEHMANN, M.; LAXA, M.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R.; OBATA, T. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, New York, v. 8, n. 1, p. 143–153, 2012.
- LI, Y.-F.; WANG, Y.; TANG, Y.; KAKANI, V.G.; MAHALINGAM, R. Transcriptome analysis of heat stress response in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **BMC plant biology**, London, v. 13, n. 1, p. 153, 2013.
- LIU, K. Voltage-dependent K⁺ channels as targets of osmosensing in guard cells. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 10, n. 11, p. 1957–1970, Nov. 1998.
- LOUKEHAICH, R.; WANG, T.; OUYANG, B.; ZIAF, K.; LI, H.; ZHANG, J.; LU, Y.; YE, Z. SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5593–5606, Sept. 2012.
- LUGAN, R.; NIOGRET, M.F.; KERVAZO, L.; LARHER, F.R.; KOPKA, J.; BOUCHEREAU, A. Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into ESK1 function. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 32, n. 2, p. 95–108, 2009.

- LUO, Q.; SUN, L.; HU, X.; ZHOU, R. The variation of root exudates from the hyperaccumulator *Sedum alfredii* under cadmium stress: Metabonomics analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2014.
- LYON, D.; CASTILLEJO, M.A.; MEHMETI-TERSANI, V.; KLEEMAIER, C.; WIENKOOP, S. Drought and recovery: independently regulated processes highlighting the importance of protein turnover dynamics and translational regulation in *Medicago truncatula*. **Molecular e Celular Proteomics**, Vienna, v. 7, p. 1–58, 2016.
- MACHADO, R.S. RIBEIRO, R.V.; EDUARDO, P.; MARCHIORI. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, dez. 2009.
- MAEDA, H.; SHASANY, A.K.; SCHNEPP, J.; ORLOVA, I.; TAGUCHI, G.; COOPER, B.R.; RHODES, D.; PICHERSKY, E.; DUDAREVA, N. RNAi suppression of Arogenate dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 3, p. 832–849, 2010.
- MANNERS, G.D. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. **Plant Toxins**, Porto Alegre, v. 5, p. 9–35, 1996.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? a review. **Phytochemistry**, Jerusalem, v. 67, n. 21, p. 2318–2331, 2006.
- MAZZUCHELLI, E.H.L.; SOUZA, G.M.; PACHECO, A.C. Rustificação de mudas de eucalipto via aplicação de ácido salicílico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 4, p. 443–450, dez. 2014
- MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, n. 1, p. 1, 2004.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, Cambridge, v. 126, n. 5, p. 969–980, 2006.
- MEREWITZ, E.B.; DU, H.; YU, W.; LIU, Y.; GIANFAGNA, T.; HUANG, B. Elevated cytokinin content in ipt transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 1315–1328, 2012.
- MISTELI, T. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, p. 1841–1844, 2000.
- MUÑOZ, A.; CASTELLANO, M.M. Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? **Comparative and Functional Genomics**, Madrid, v. 2012, p. 1-8, 2012.

NAYA, L.; LADRERA, R.; RAMOS, J.; GONZÁLEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C.; MINCHIN, F.R.; BECANA, M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 2, p. 1104–1114, 2007.

OLIVEIRA, E.C.A. Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 951–960, 2010.

OLIVER, D.J.; NIKOLAU, B.; WURTELE, E.S. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. **Metabolic Engineering**, Ames, v. 4, p. 98–106, 2002.

OLIVER, M.J.; BEWLEY, J.D. Plant desiccation and protein synthesis: VI. Changes in protein synthesis elicited by desiccation of the moss *tortula ruralis* are effected at the translational level. **Plant Physiology**, Calgary, v. 74, n. 4, p. 923–927, Apr. 1984.

PANDEY, A.; CHOUDHARY, M.K.; BHUSHAN, D.; CHATTOPADHYAY, A.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, N. The nuclear proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) reveals predicted and unexpected proteins. **Journal of Proteome Research**, New Delhi, v. 5, p. 3301–3311, 2006.

PASSIOURA, J.B. Drought and drought tolerance. In: BELHASSEN, E. (Ed.). **Drought tolerance in higher plants: genetically, physiological and molecular biological analysis**. Dordrecht: Kluwer, 1997. p. 1-5.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Update on stress tolerance common components , networks , and pathways of cross- tolerance to stress: the central role of “ redox ” and abscisic acid-mediated controls. **Turkish Journal of Botany**, Harpenden, v. 129, p. 460-468, 2015.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 311–323, 2003.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191 p.

PINHEIRO, C.; PASSARINHO, J.A.; PINTO, C.R. Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 11, p. 1203–1210, 2004.

PLAXTON, W.C.; PODESTÁ, F.E. The functional organization and control of plant respiration. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 159–198, May 2006.

PRYOR, B.M.; CREAMER, R.; SHOEMAKER, R.A.; MCLAIN-ROMERO, J.; HAMBLETON, S. Undifilum, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. **Botany**, Ottawa, v. 87, n. 2, p. 178–194, 2009.

RAMESH, P.; MAHADEVASWAMY, M. Effect of formative phase drought on different classes of shoots shoot mortality cane attributes yield and quality of four sugarcane cultivars. **Journal of Agronomy & Crop Science**, Berlin, v. 185, p. 249-258, 2000.

RASMUSSEN, S.; PARSONS, A.J.; JONES, C.S. Metabolomics of forage plants: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1281–1290, 2012.

REDDY, A.S.N.; DAY, I. S.; GÖHRING, J.; BARTA, A. Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 158, p. 67–77, 2012.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GARCÍA, P.C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L.R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 2, p. 315–321, 2001.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J.E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **Plant Journal**, Jerusalem, v. 32, n. 3, p. 329–342, 2002.

RODRIGUES, F.A.; LAIA, M.L.; ZINGARETTI, S.M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, Clare, v. 176, p. 286–302, 2009.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 39, p. 715–733, 2004.

RYAN, C.A.; LAMB, C.J.; JAGENDORF, A.T.; KOLATTUKUDY, P.E.; LEE, H.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Plant Signaling Behavior**, New Brunswick, v. 92, n. 6, p. 493–6, 1995.

SCHNITZLER, J.P.; MADLUNG, J.; ROSE, A.; ULRICH SEITZ, H. Biosynthesis of p-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. **Planta**, New York, v. 188, n. 4, p. 594–600, 1992.

SCOTT, H.B.; OLIVER, M.J. Accumulation and polysomal recruitment of transcripts in response to desiccation and rehydration of the moss *Tortula ruralis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 577–583, 1994.

SHARMA, P.; SHANKER DUBEY, R. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 8, p. 854–864, 2005.

SHARMA, S.S. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 711–726, 2006.

SHAW, P.J.; BROWN, J.W.S. Plant nuclear bodies. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 614–620, 2004.

SILVA, T.G.F. Biometria da parte aérea da cana soca irrigada no submédio do vale do São Francisco. **Revista Ciência Agronômica**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 500–509, jul./set. 2012.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A.P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-11, 2012.

SIMOVA-STOILOVA, L.; VASEVA, I.; GRIGOROVA, B.; DEMIREVSKA, K.; FELLER, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 2/3, p. 200–206, 2010.

SIMS, G.K.; O'LOUGHLIN, E.J.; CRAWFORD, R.L. Degradation of pyridines in the environment. **Critical Reviews in Environmental Control**, Columbus, v. 19, n. 4, p. 309–340, Jan. 1989.

SINGH, B.; USHA, K. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 137–141, 2003.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 98, p. 91–97, 2006.

STUTTMANN, J.; LECHNER, E.; GUÉROIS, R.; PARKER, J.E.; NUSSAUME, L.; GENSHIK, P.; NOËL, L.D. COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 284, n. 12, p. 7920–7930, 2009.

SUBRAMANIAN, K.S.; CHAREST, C.; DWYER, L.M.; HAMILTON, R.I. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, n. 9, p. 1582–1591, 1997.

SULLIVAN, J.A.; SHIRASU, K.; DENG, X.W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 12, p. 948–958, dez. 2003.

SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 817–836, 2003.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A.K.; WESTERHUIS, J.A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, New York, v. 8, n. S1, p. 3–16, June 2012

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, T.; KAKEHI, J. I. Polyamines: Ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2010.

TAYLOR, S.W.; FAHY, E.; GHOSH, S.S. Global organellar proteomics. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, p. 82–88, 2003.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, New York, v. 220, n. 1, p. 105–117, 2004.

TIMPA, J.D.; BURKE, J.J.; QUISENBERRY, J.E.; WENDT, C.W. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 3, p. 724–728, 1986.

TOUNEKTI, T.; HERNÁNDEZ, I. Salicylic acid. **Biochemical Journal**, Gages, v. 1, p. 41–162, 2013.

UDAWAT, P.; JHA, R.K.; SINHA, D.; MISHRA, A.; JHA, B. Overexpression of a Cytosolic Abiotic Stress Responsive Universal Stress Protein (SbUSP) mitigates salt and osmotic stress in transgenic tobacco plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1–21, Apr. 2016.

UNICA. **União da indústria de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 6, p. 3-14, 2007.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 1–7, 2001.

VIERSTRA, R.D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 32, n. 1/2, p. 275–302, 1996.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, Faisalabad, v. 61, n. 3, p. 199–223, 2007.

WEBB, K.J.; COOKSON, A.; ALLISON, G.; SULLIVAN, M.L.; WINTERS, A.L. Polyphenol oxidase affects normal nodule development in red clover (*Trifolium pratense* L.). **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 5, p. 700, Dec. 2014.

XIA, J.; SINELNIKOV, I.V.; HAN, B.; WISHART, D.S. Metaboanalyst 3.0: making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, n. W1, p. W251–257, 2015.

XIA, J.; SINELNIKOV, I.; HAN, B.; WISHART, D.S. MetaboAnalyst 3.0: making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, p. 251-257, 2015.

YANG, J.; KLOPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 1, p. 1–4, 2009.

YANG, T.; BAR-PELED, L.; GEBHART, L.; LEE, S.G.; BAR-PELED, M. Identification of galacturonic acid-1-phosphate kinase, a new member of the GHMP kinase superfamily in plants, and comparison with galactose-1-phosphate kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 284, n. 32, p. 21526–21535, 2009.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 8, p.187-206, 2003.

YU, J.; DU, H.; XU, M.; HUANG, B. Metabolic responses to heat stress under elevated atmospheric CO₂ concentration in a cool-season grass species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 137, n. 4, p. 221–228, 2012.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J.C. Sugarcane response to water-deficit stress during early growth on organic and sand soils. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, New York, v. 5, p. 403-414, 2010.

ZHUANG, H.; FU, Y.; HE, W.; WANG, L.; WEI, Y. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 475, June 2015.

ANEXO

Proteínas nucleares		Controle			Déficit Hídrico			Recuperação		
ID	Descrição	média Score	média Peptídeos	média Fmol	média Score	média Peptídeos	média Fmol	média Score	média Peptídeos	média Fmol
SCCCRZ2C03E03	wound stress protein precursor	3059.12	4.67	10.27	3080.87	3.50	22.20	2274.51	6.33	51.32
SCAGLR1043C02	apx2 - cytosolic ascorbate peroxidase	-	-	-	2640.74	7.33	30.96	4348.15	11.33	61.83
SCAGLR2026F05	histone h4 replacement cg3379-pc	14479.73	7.33	62.48	9215.38	7.00	118.16	14069.78	7.67	94.16
SCJLRZ1019E11	uncharacterized protein LOC100273241 [Zea mays]	759.92	12.00	13.97	878.12	11.50	16.91	1189.00	12.00	32.81
SCCCLR1C03E08	grx_s17 - glutaredoxin subgroup ii	467.69	20.00	41.12	697.27	16.50	12.62	402.97	16.50	48.05
SCSGLR1084C03	r40c1 protein - rice	-	-	-	941.66	10.50	17.21	563.93	14.00	28.99
SCCCLR1024A05	transaldolase 2	334.52	14.00	25.99	487.43	12.50	35.61	1087.78	13.50	45.30
SCCCLB1024A02	chaperone protein DnaJ-like	-	-	-	519.15	12.00	18.97	625.37	11.00	25.00
SCJLLB2080E05	thiol disulfide interchange protein txla	-	-	-	1010.12	6.50	11.14	1464.90	5.00	14.98
SCACLR1057G08	activator of 90 kda heat shock protein atpase	-	-	-				648.56	8.00	17.67
SCUTRZ3071B08	unknown [Zea mays]	-	-	-	1034.51	5.50	12.73	1259.19	4.50	15.74
SCACLR1130B08	40s ribosomal protein s25-1	915.27	4.50	31.68	1938.97	3.67	32.62	1335.81	4.50	22.24
SCCCLR2C02F03	cytochrome b5							1800.49	4.50	12.70
SCCCLB1004H02	ubiquitin-activating enzyme e1 expressed	-	-	-	311.97	20.50	16.53	474.49	32.00	14.96
SCCCLR2002F10	-				1686.37	6.00	17.57	1140.19	7.00	11.27
SCEQRT1025H04	heat-shock protein 101							597.32	20.00	19.34
SCVPLR1049H03	60s acidic ribosomal protein p2b	572.65	4.00	8.01	747.54	5.00	17.31	1050.24	6.00	15.39
SCCCRZ1002F11	beta-tubulin r2242	-	-	-	407.66	13.00	8.94	538.06	13.00	6.15
SCCQRT2066C02	apx1 - cytosolic ascorbate peroxidase	-	-	-	1961.18	9.00	19.10	932.32	6.33	4.53
SCCCL3002B06.b	isochorismate synthase 1	979.47	10.00	18.22	-	-	-	-	-	-
SCCCLR1022B09	elongation factor 1-alpha	11326.79	19.00	125.32	11404.43	13.33	101.97	8541.27	13.67	150.23

SCRUFL1114B10.b	nadph-dependent reductase	7946.94	4.00	65.05	-	-	-	5638.79	2.67	81.01
SCAGFL1085C10	chloroplast lipocalin	-	-	-	736.20	9.00	17.96	3921.87	10.00	62.76
SCJLRT1016A04	plastid-lipid-associated protein 2	-	-	-	-	-	-	2772.44	12.67	74.40
SCJFRZ2033G02	plastid-lipid associated protein 3	1754.42	7.00	18.79	-	-	-	6996.77	6.67	55.92
SCUTLR1058B02	s-adenosylmethionine synthetase 1	704.72	11.50	17.89	999.40	10.67	14.23	1543.20	13.33	30.61
SCQGLR1085E02	putative protein SORBIDRAFT_04g001720 [Sorghum bicolor]	1738.47	3.00	17.78	-	-	-	2527.12	3.33	40.33
SCCCLR1072E04	usp family protein	-	-	-	1767.10	9.00	31.82	1315.72	6.00	30.27
SCRUFL4022D09	putative protein SORBIDRAFT_06g022380 [Sorghum bicolor]	-	-	-	-	-	-	3562.24	6.00	32.38
SCQSLR1089A11	carotenoid cleavage dioxygenase	-	-	-	-	-	-	447.04	9.00	27.50
SCRLSD1009H10	putative protein SORBIDRAFT_04g001270 [Sorghum bicolor]	-	-	-	930.27	9.50	52.71	1698.51	9.67	21.04
SCUTRZ2023F12	ATP/GTP-binding protein [Zea mays]	-	-	-	1779.71	2.00	31.99	2305.36	3.00	39.49
SCQSLR1089C08	chloroplast Ptr ToxA-binding protein [Saccharum hybrid cultivar GT28]	2663.89	5.33	0.00	5887.11	11.67	63.50	3707.07	10.67	38.04
SCCCRZ2C04B02	proteasome subunit beta type 6 precursor	488.66	6.00	15.85	2126.16	6.67	31.46	-	-	-
SCCCCL3003F11.b	citrate glyoxysomal precursor	-	-	-	833.93	10.00	29.69	-	-	-
SCCCSD1095A07	30S ribosomal protein S9 [Zea mays]	1977.33	7.00	30.15	1360.83	6.33	26.28	1432.20	4.50	58.19
SCJLLR1011C10	PUTATIVE: aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Setaria italica]	-	-	-	779.64	11.67	23.30	-	-	-
SCCCLR2003G02	60s ribosomal protein l3	-	-	-	405.95	7.00	16.59	-	-	-

SCCCRZ2003A07	aminopeptidase m	-	-	-	403.76	16.00	16.00	-	-	-
SCCCCL3120D10.b	catalase- expressed	-	-	-	1177.28	7.33	11.04	792.87	7.50	16.14
SCVPLB1016F07	polyphenol oxidase [Saccharum hybrid cultivar]	664.57	13.00	5.91	701.55	9.33	4.19	2130.61	11.00	20.22
SCRFLB1053B01	ankyrin repeat domain-containing protein 2 [Zea mays]	794.64	15.00	12.67	-	-	-	545.58	11.00	15.26
SCCCCL4011B08	2-isopropylmalate synthase B	627.12	25.33	13.02	485.01	18.00	48.63	-	-	-
SCEZLB1014G09	PUTATIVE: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A [Setaria italica]	2796.16	5.33	19.03	5197.64	6.00	5.60	2167.93	4.67	38.11
SCEZRZ1016D05	polyphenol oxidase [Saccharum hybrid cultivar]	1554.96	7.67	26.89	1054.85	6.00	3.19	4675.79	11.00	33.87
SCJFRZ2015G01	60S ribosomal protein L18-like protein [Miscanthus sinensis]	1724.25	5.00	27.22	-	-	-	504.13	2.00	7.98
SCEQAM1036A06	sucrose phosphate synthase B [Saccharum hybrid cultivar ROC22]	610.98	21.33	28.33	-	-	-	338.83	15.00	10.50
SCCCLR2001G11	TPA: plastid-specific 30S ribosomal protein 1 [Zea mays]	921.14	7.33	33.49	-	-	-	-	-	-
SCCCLB1C04H06	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvatedehydrogenase complex	949.08	5.33	37.41	-	-	-	-	-	-
SCCCLR1C07D10	TPA: 40S ribosomal protein S28 [Zea mays]	4288.87	3.33	46.91	-	-	-	-	-	-
SCQSRT2031G03	Rubisco LS methyltransferase, substrate-binding domain [Saccharum hybrid cultivar R570]	536.23	11.00	51.88	340.57	8.50	23.51	812.93	12.00	12.23
SCVPLB1015D09	vip1 protein	1063.13	6.67	139.67						
SCUTST3128B03	harpin binding protein 1	577.81	10.67	8.01	638.87	8.33	19.47	8072.53	14.67	132.72

SCBFRZ2045A05	putative protein SORBIDRAFT_06g033090 [Sorghum bicolor]	572.43	4.33	4.40	1056.74	6.50	6.90	-	-	-
SCACLR2007D12	proteasome subunit beta type 1	562.85	9.67	7.52	1164.39	7.50	36.61	-	-	-
SCAGLR2026H05	proteasome subunit alpha type 5	655.81	7.33	11.27	821.59	6.33	17.73	-	-	-
SCCCLR1001H04	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kda protein	2654.43	5.33	13.39	1349.60	3.33	13.90	-	-	-
SCRFLR1012C07	60s ribosomal protein	1178.58	6.00	17.01	2025.92	5.33	33.83	-	-	-
SCCCLR1048G12	proteasome subunit beta type 2	1349.68	9.33	24.55	2220.45	10.50	44.63	-	-	-
SCRULR1020D11	fructose-bisphosphate aldolase	2109.38	10.67	26.21	919.88	7.67	14.85	362.97	6.00	5.93
SCCCST2002G06	protein binding protein	2836.34	7.33	26.98	1771.19	5.67	12.21	-	-	-
SCCCCL4008F04	40s ribosomal protein s27	2591.87	4.00	29.02	1838.48	4.00	33.21	-	-	-
SCCCLR1001B04	alpha 1 subunit of 20s proteasome	1252.18	11.33	29.68	1581.71	10.00	35.35	-	-	-
SCCCRT1C06B08	putative protein SORBIDRAFT_07g028880 [Sorghum bicolor]	2219.97	11.33	32.68	1605.66	6.50	23.07	-	-	-
SCCCLR2C01F11	40s ribosomal protein s10	1511.97	3.67	36.86	3732.19	6.50	63.23	-	-	-
SCSGHR1066A02	50s ribosomal protein chloroplast expressed	1777.59	5.67	41.11	745.16	3.50	17.85	-	-	-
SCCCCL3140B12	60s ribosomal protein l4	6070.25	18.33	68.61	3795.25	14.33	52.67	3549.23	12.00	11.79
SCCCLR2001F07	40s ribosomal protein s20	10669.72	4.00	90.65	10538.37	6.00	89.50	-	-	-