TESE DE DOUTORADO

ADRIANA GRANDIS

***PAPEL DAS ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR NA
FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE CANA DE AÇÚCAR***

*Role of cell wall degradation enzymes during the aerenchyma
formation in sugarcane roots*

São Paulo
2015

ADRIANA GRANDIS

***PAPEL DAS ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR NA
FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE CANA DE AÇÚCAR***

*Role of cell wall degradation enzymes during the aerenchyma
formation in sugarcane roots*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Biologia
de Sistemas.

Orientador: Marcos S. Buckeridge

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

GRANDIS, Adriana

Papel das enzimas de degradação da parede celular na formação do aerênquima em raízes de cana de açúcar
122p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. glicosil hidrolases 2. Proteômica 3. Morte celular programada 4. Parede celular 5. Aerênquima

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica. Janeiro de 2015.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

**Prof. Dr
Orientador**

À todos que me ajudaram nesta tese e ajudam diariamente na minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marcos Buckeridge pela oportunidade de trabalho.

A comissão julgadora que compõe a banca que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

A Benedetta Mattei, Felice Cervone e Julia Di Lorenzo que me receberam de braços abertos na Itália, obrigada pela oportunidade.

Aos pesquisadores, professores e alunos do Departamento di botanica - Univercity di Roma La Sapienza, grandes amigos que fiz na Itália. Grandi amici. Grazie per tutto.

Ao João (Johnny), grande amigo que fiz na Itália que me ajudou nos momentos mais difíceis que passamos longe de casa. Obrigada Joãooooo.

Ao Laboratório de química da profa. Glaucia de Souza, por ceder os iniciadores utilizados nessa tese.

Ao laboratório do prof. Dr. Leonardo D. Gómez da Universidade de York-UK que auxiliou nas análises de sacarificação.

Ao laboratório de proteínas da pesquisadora Adriana Paes Leme e a equipe técnica, que me auxiliou nos primeiros ensaios de proteômica e também na análise de dados.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia do IB por toda a ajuda.

Meus imensos agradecimentos à todo o pessoal do Gate-Lab, pela ajuda com os trabalhos de Biomol, todo o socorro prestado e pelos momentos de alegria. Em especial, profa. Marie-Anne Van Sluys, Tati, Nathalia, Jonas, Paula, Érika e todo o pessoal que me ajudou de alguma forma.

À pós-graduação do Instituto de biociências da USP, pelo serviço e pela atenção.

À Fapesp pela concessão das duas bolsas, Bepe-Itália (2013/0159-0) e Doutorado (2011/17070-3).

A equipe do nosso laboratório Eglee e Vivi, que me ajudou muito durante os experimentos, durante as dificuldades, sem elas tudo seria mais difícil e triste.

Ao Edu, Joan e Marcela, da Unicamp pela amizade e pela oportunidade de aprender ainda mais.

Não foram só os 4 anos desta tese, mas foram mais de 8 anos trabalhando no Lafieco, então não posso deixar de agradecer à todos que passaram por esse Lab e deixaram sempre algum ensinamento e fizeram da minha vida mais feliz. Sendo assim agradeço à todos os alunos e amigos que passaram pelos Laboratórios do Dep. De Botânica.

À Amanda de Souza pela amizade, pelos momentos de reflexão e por mostrar que a vida é muito mais que pensamos, e que nunca o que achamos que é nosso, realmente é. Obrigada por tudo, pela compreensão e pelo carinho.

A Débora, Eveline, Amanda Zisca, Grayce, os últimos dos moicanos (kkkk). Foram pessoas que contribuíram para esse trabalho ficar mais divertido, mais irreverente e não caísse na mesmice de todos os dias.

A minha grande amiga e irmã, que me encheu e me enche todo dia... me enche de alegria, de esperança, de paz e de energia para enfrentar essa longa jornada da nossa vida. Só tenho a te agradecer Bruna Arenque Musa por toda essa compreensão, amor, dedicação e respeito. Por abrir a porta da tua casa e da tua família que amo muito. Nem 1/3 dessa tese seria, se não fosse você me apoiando. Obrigada ☺

A Dani Gaona, pela amizade e por me ouvir sempre... desde os piores momentos que passei a km de distância do Brasil, até os momentos felizes ao vivo e a cores!

Aos meus grandes amigos de sampa, que fizeram dos momentos mais difíceis os mais divertidos. Que me fizeram sair da cama para ir dar um rolê de bicicleta ou ir ao Bar do Luis. Obrigada por tudo e por existirem !!!

Aos meus amigos e família (Grandis e Mazzero) de Piracity, que entenderam toda a minha ausência nesses 8 anos de estudo. Obrigada.

A minha avó Maria Ignês, por mostrar que a vida é mais simples do que imaginamos. Obrigada por ser tão compreensiva e serena.

Obrigada ao meu irmão Lucas, por ser companheiro e sempre mostrar o que é mais coerente ser feito. Obrigada pela serenidade e pelo exemplo de dedicação e competência. Amo você.

Aos meus pais que são meu suporte de amor, carinho e compreensão. Obrigada pelo grande exemplo que são na minha vida. Obrigada por me apoiarem nessa grande loucura que escolhi fazer. Amo vocês ☺

E agradeço à Deus, por mais essa oportunidade de trabalho e de colocar todas essas pessoas na minha vida para que eu aprenda a ser uma pessoa melhor. Obrigada.

ÍNDICE

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	13
AERÊNQUIMA: DEFINIÇÃO, OCORRÊNCIA E CLASSIFICAÇÕES	14
MORTE CELULAR PROGRAMADA (PCD)	15
MODIFICAÇÕES QUE OCORREM NA PAREDE CELULAR DURANTE A FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA	18
OBJETIVO	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
COLETA DO MATERIAL	21
COLETA DO MATERIAL AO LONGO DE 24 HORAS	22
DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO DE AERÊNQUIMA ENTRE OS SEGMENTOS	22
ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	23
<i>Desenho dos oligonucleotídeos específicos.....</i>	<i>23</i>
<i>Extração de RNA</i>	<i>24</i>
<i>Síntese de cDNA para qPCR.....</i>	<i>26</i>
<i>Análise de expressão gênica por PCR em tempo real.....</i>	<i>26</i>
EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS E ENSAIOS ENZIMÁTICOS	27
SACARIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS	29
ANÁLISE PROTEÔMICA	30
<i>Extração de proteínas</i>	<i>30</i>
<i>Preparo das proteínas para digestão.....</i>	<i>32</i>
<i>Digestão das proteínas totais</i>	<i>33</i>
PEPTÍDEOS MULTIPLEX: MARCAÇÃO DOS PEPTÍDEOS COM ISÓTOPOS DE DIMETIL PARA A ANÁLISE DE PROTEÔMICA QUANTITATIVA	34
<i>Identificação e quantificação das proteínas pela fragmentação de peptídeos</i>	<i>37</i>
ANÁLISE DE DADOS	38

RESULTADOS.....	40
DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO DE AERÊNQUIMA EM CADA SEGMENTOS	40
PROTEÍNAS SOLÚVEIS E IDENTIFICAÇÃO DAS HIDROLASES DE PAREDE CELULAR.....	41
EXPRESSÃO GÊNICA	43
QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PARA A PROTEÔMICA	52
ANÁLISE DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	53
SACARIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS DE RAIZ	63
DISCUSSÃO	64
PERCEPÇÃO DO SINAL E MORTE CELULAR PROGRAMADA	65
GLICOSIL HIDROLASES NAS MODIFICAÇÕES DA PAREDE CELULAR DURANTE A FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA	67
ACESSIBILIDADE DAS GLICOSIL HIDROLASES À ARQUITETURA DA PAREDE CELULAR DOS SEGMENTOS DE RAIZ	74
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
ANEXOS	86

RESUMO

A resistência das paredes celulares vegetais à hidrólise enzimática é um dos grandes gargalos tecnológicos para a obtenção do etanol celulósico. Acredita-se que as modificações nas paredes celulares em processos como a mobilização de reservas, formação de aerênquima, amadurecimento de frutos e senescência, por exemplo, envolvam a ativação de módulos funcionais que culminam em alterações nas paredes celulares. Estes módulos são: 1) recepção de um sinal para início do processo; 2) Morte Celular Programada (PCD); 3) separação celular; 4) expansão celular; 5) hidrólise de hemiceluloses e 6) hidrólise de celulose. No caso da formação de aerênquimas lisígenos o processo que se inicia com a PCD e é seguido pela liberação de glicosil hidrolases que atuam na degradação e/ou modificação da parede celular, formando espaços de ar no córtex radicular. A formação de aerênquima nas raízes de cana de açúcar é constitutiva e pouco se sabe sobre os mecanismos de modificação que ocorrem na parede celular durante este processo. Este estudo buscou compreender os padrões de variação expressão gênica, proteínas e de atividades enzimáticas associados à formação do aerênquima em raízes de cana de açúcar, com ênfase no papel das hidrolases de parede celular e em algumas proteínas relacionadas à PCD. Foram utilizados 5 segmentos de raízes de 1 cm cada, a partir do ápice radicular. No material coletado observou-se a formação gradual de aerênquima. Foram realizadas análises transcricional, proteômica e atividade enzimática das glicosil hidrolases e outras proteínas que atuam na modificação da parede celular, os quais foram identificados e quantificados ao longo da formação do aerênquima. As glicosil hidrolases pertencentes às famílias Cazy GH1, GH3, GH17, GH18 bem como expansinas, celulose sintase, lacase, calreticulina, calmodulina e proteínas relacionadas a degradação de pectinas, foram encontradas ao longo dos segmentos, principalmente após o segmento 2. De acordo com a atividade transcricional e dados da proteômica, sugere-se que os polissacarídeos seriam atacados por enzimas nos estágios iniciais da formação do aerênquima (seg 2 e 3). O ataque ocorre principalmente sobre as pectinas e o β -glucano. Contudo, os dados apontam para a deposição de xiloglucano, xilanos e celulose (após seg 3), que formam um compósito ao redor dos espaços de ar. Isto sugere que parte dos polissacarídeos das paredes não sejam degradados ao longo do processo, embora enzimas específicas detectadas possam atuar na modificação dos mesmos, como verificado para algumas pectinases e membros de GH17. Além disso, nos pré-tratamentos com água foi possível observar que há maior sacarificação da parede nos seg. 1 e 2. Contudo quando retira-se a maior parte das pectinas e hemiceluloses após pré-tratamento com NaOH, a sacarificação é maior nos segmentos 2, 3 e 4, devido ao maior acesso e a maior quantidade de celulose. As glicosil hidrolases encontradas neste trabalho sugerem que estas atacam a parede de um específico conjunto de células do córtex que dá origem ao aerênquima. Já no fim do processo, quando há lise celular, algumas paredes de células remanescentes são recalcitrante à hidrólise, provavelmente devido a sua arquitetura e composição. Este trabalho traz informações para o desenvolvimento de futuras tecnologias para a produção do etanol do etanol celulósico de cana-de-açúcar.

Palavras chave: aerênquima, parede celular, glicosil hidrolases, proteômica, morte celular programada.

ABSTRACT

The resistance of plant cell walls to enzymatic hydrolysis is one of the main bottlenecks of the development of technology of production of cellulosic ethanol. It is believed that the modifications in cell walls related to processes of storage mobilization, aerenchyma formation, fruit ripening and senescence, for instance, involve the activation of functional moduli that culminate in alterations of cell walls. These moduli are: 1) signal perception to start the process; 2) Programmed Cell Death (PCD); 3) cell separation; 4) cell expansion; 5) hydrolysis of hemicelluloses and 6) hydrolysis of cellulose. In the case of the formation of lysigenous aerenchyma, the process starts with PCD and is followed by the release of glycosyl hydrolases that act on the degradation and/or cell wall modifications, forming air spaces in the cortex of the root. The formation of aerenchyma in the roots of sugarcane is a constitutive phenomenon and little is known about the mechanisms of modification that occur in cell walls during its development. Thus, the present study focused on the visualization of the patterns of variation of gene expression, proteins and enzyme activities associated to the formation of aerenchyma in roots of sugarcane in order to understand the role of the cell wall hydrolases and some proteins related to PCD in cell wall modifications along the process. Five root segments of 1cm each, starting from root apex, were used. A gradual centripetal formation of aerenchyma was recorded in the cortex of developing roots. Analyses of the transcriptional, proteomic and enzyme activity profiles during the process revealed that several enzymes act on cell wall modifications. The glycosyl hydrolases belonging to the Cazy families GH1, GH3, GH17, GH18, as well as expansins, cellulose synthase, laccase, calreticulin, calmodulin and other proteins related to pectin degradation have been found along the segments, mainly after segment 2. According to the data on transcriptomics and proteomics, it is suggested that enzymes attack polysaccharides during the initial stages of aerenchyma formation (seg. 2 and 3). The attack of the enzymes occurs mainly on pectins and β -glucan. Conversely, the data point out to the deposition (or maintenance) of xyloglucan, xylan and cellulose (after seg. 3), which form a composite that surrounds the air spaces. This suggests that part of the polysaccharides present in cell walls are not degraded during the process, although specific enzymes have been detected that could act on polysaccharide mobilization, such as the GH17 family. Further, under pretreatment with water, it has been observed that cell wall saccharification was higher at segments 1 and 2. On the other hand, when most of the pectins and hemicelluloses are retrieved by pretreatment with NaOH, saccharification is higher of segments 2, 3 and 4, probably due to the higher access to the wall and also to the higher proportion of cellulose. The profiles related to the glycosyl hydrolases found in this work, suggest that these enzymes attack the cell wall. Initially, they are probably kept within a group of cells that will originate the aerenchyma. At the end of the process, when there is cell lysis, the remaining walls of some cells are recalcitrant to hydrolysis probably due to changes in their architecture and composition. Our findings bring promising information that could be used in the future to improve efficiency of hydrolysis for cellulosic ethanol production from sugarcane.

Key words: aerenchyma, cell walls, glycosyl-hydrolases, proteomics, and programmed cell death

INTRODUÇÃO

Processos de modificação da parede celular vegetal

Os polissacarídeos que estruturam a parede celular estão entrelaçados formando uma arquitetura complexa. Como resultado de processos de adaptação evolutiva, as paredes celulares vegetais desenvolveram a vital função de apresentar resistência ao ataque bioquímico exercido por organismos vivos, uma vez que são a primeira barreira entre as células e o ambiente. Sendo a parede celular vegetal um material recalcitrante à digestão enzimática, o ataque à estrutura para a liberação dos açúcares presentes é reduzido (Wingren et al. 2003).

O milho e a cana de açúcar são as espécies-chave já largamente empregadas na geração de bioenergia nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (Ragauskas et al. 2006, Carpita e McCann 2008, Soccol et al. 2010). Além destas, gramíneas como *Sorghum bicolor*, *Panicum virgatum* (switchgrass) e as do gênero *Miscanthus* apresentam alto potencial para o emprego na indústria de biocombustíveis (Pauly e Keegstra 2008). As plantas supracitadas apresentam parede celular do tipo II devido às suas principais hemiceluloses serem compostas de glucano de ligação mista (β -glucano) e arabinoxilano (AX), além de um domínio péctico ser reduzido. O xiloglucano (XG) é encontrado em baixas concentrações, além de uma quantidade alta de compostos fenólicos (17-24%) interligando os polissacarídeos, principalmente como ácido ferúlico (Silva 2005, Crivellari 2012, De Souza 2011, De Souza et al. 2013).

A hidrólise da parede é um dos principais processos necessários para a produção de bioetanol a partir da biomassa. Assim, encontrar e caracterizar as enzimas que possam acessar a complexidade das paredes celulares tem sido foco de muitos estudos (Gilbert 2014). Como resultado, os dados oriundos do uso de coquetéis enzimáticos contendo glicosil hidrolases de microrganismos está se tornando cada vez mais comum (Gómez et al. 2008). Por outro lado, tem sido proposto o emprego biotecnológico de enzimas produzidas pelas próprias plantas, utilizando processos conhecidos em que espécies vegetais possuam parede celular mais acessível ao ataque destas enzimas (Grandis et al. 2014).

A eficiência do processo de pré-tratamento para sacarificação da biomassa pode ser maior se for adquirido o controle sobre os mecanismos que as plantas possuem em degradar suas próprias paredes, de modo que o afrouxamento provocado por tais processos diminuiria a demanda de energia para o pré-tratamento e facilitaria a hidrólise. Em determinados momentos do desenvolvimento vegetal é possível observar que os mecanismos hidrolíticos provocam mudanças estruturais e bioquímicas em alguns órgãos. Estes sistemas provocam a modificação da parede celular, incluindo a hidrólise, para o desempenho de diferentes funções biológicas. Eles se iniciam com (1) as células alvo que têm a percepção de uma mensagem a partir do equilíbrio hormonal, (2) a separação das células, (3) a expansão celular, (4) morte celular programada (*programmed cell death* - PCD), (5) afrouxamento da parede/hidrólise de pectinas e hemiceluloses e (6) a hidrólise da celulose (Grandis et al. 2014). Esses processos naturais de modificação da parede celular ocorrem geralmente durante a formação do xilema (Mittler e Lam 1995), na senescência foliar, em tecidos de órgãos reprodutivos (DeLong et al. 1993; Pennell e Lamb 1997), na mobilização de reservas (Buckeridge et al. 1992, Buckeridge 2010), no amadurecimento de frutos (Cavalari 2009) e na formação de aerênquima radicular (Evans 2003). Este último foi identificado em raízes de cana de açúcar, como resultado da modificação de parede celular incluindo a hidrólise de pectinas da lamela média e β -glucano (Leite 2013), porém as enzimas responsáveis por estas e outras modificações ainda não foram identificadas.

AERÊNQUIMA: definição, ocorrência e classificações

O aerênquima é um tecido especializado que pode se formar em folhas, pecíolos, caules e raízes consistindo em espaços intercelulares interligados longitudinalmente, que facilita a difusão de gases pelo tecido (Armstrong 1979). Pode atuar também como difusor de outros gases como metano, dióxido de carbono e etileno (Colmer 2003). É encontrado principalmente em raízes em resposta adaptativa a uma ampla gama de fatores ambientais que inclui hipóxia (Justin e Armstrong 1991, Drew 1997), resistência mecânica (He et al. 1996b), falta de nutrientes (Drew et al. 1989, Konings e Verschuren 1980, Bouranis et al. 2003) e a dessecação (Drew 1979).

São encontrados dois tipos de aerênquima: o primeiro é denominado aerênquima cortical, como o encontrado em raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) e cana de açúcar (Armstrong 1979, Evans 2003, Jackson e Armstrong 1999, Nishiuchi et al. 2012, Leite 2013). O outro tipo é um tecido branco e esponjoso preenchido com espaços de gás que se forma no caule, hipocótilos, raiz principal, raízes adventícias e nódulos radiculares de leguminosas, como a soja (*Glycine max*), *Sesbania rostrata* e *Viminaria juncea* cultivadas em condições de alagamento (Arikado 1954, Walker et al. 1983, Saraswati et al. 1992, Mochizuki et al. 2000).

O aerênquima pode ser resultado tanto de um processo esquizógeno quanto lisígeno (Arber 1920, Jackson e Armstrong 1999, Seago et al. 2005). O aerênquima esquizógeno, geralmente constitutivo, ocorre quando espaços gasosos intercelulares são formados durante o desenvolvimento, sem o processo de morte celular programada. Esses espaços são formados pelo crescimento celular diferencial, com células adjacentes separando-se umas das outras entre a lamela média, provavelmente com a digestão apenas da lamela média (Laan et al. 1989, 1991, Visser et al. 2003, Evans 2003). Um exemplo de aerênquima esquizógeno está no pecíolo de *Sagittaria lancifolia* (Schussler et al. 1997). O aerênquima esquizógeno é um processo complexo e ordenado, porém sua regulação e os elementos chave que levam à sua formação são pouco estudados (Evans 2003).

O aerênquima lisígeno, onde possuem maior parte dos estudos, pode ser constitutivo ou induzido (por alagamento ou etileno) e envolvem necessariamente morte celular programada seguido da degradação da parede celular. Pode ser encontrado em espécies de cevada (Arikado e Adachi 1955), trigo (Trought e Drew 1980), arroz (Justin e Armstrong 1991), milho (He et al. 1996a, Gunawardena et al. 2001a) e cana de açúcar (Leite 2013).

Morte celular programada (PCD)

O primeiro sinal que desencadeia todo o processo de formação do aerênquima lisígeno induzido é a redução do nível de oxigênio nas raízes, uma vez que na água a sua difusão de oxigênio

passa a ser 10^4 vezes menor que no ar (Armstrong e Drew 2002). Após a redução da oxigenação há o aumento do etileno e do Ca^{2+} citosólico e assim entra em execução todo o processo de PCD e consequente formação do aerênquima (Fagerstedt 2010).

Na formação lisígena, muitas plantas diferem no que diz respeito à dependência de um indutor ambiental para que o aerênquima se inicie. Em arroz, a formação de aerênquima não é induzida, pois alguns trabalhos mostraram que não depende de hipóxia para ser formado, ocorrendo mesmo em solos aerados (Kawai et al. 1998). Entretanto, mesmo quando é constitutivo, o etileno é requerido para sua formação (Yukiyoshi e Karahara 2014), contudo, para outras plantas a formação de aerênquima parece ser independente deste hormônio, como por exemplo em espécies de regiões alagáveis como *Juncus effusus* (Visser e Bogemann 2006). Já para espécies mais estudadas como o milho, a formação de aerênquima é induzida pela baixa concentração de oxigênio e/ou pelo aumento de etileno (Drew et al. 1989, Drew et al. 2000) que induzem a PCD. Entretanto, como visto por esses trabalhos, sinalizando ou não via etileno, as células recebem necessariamente a sinalização via cálcio, o que resulta na PCD e consequentemente formação do aerênquima lisígeno.

A PCD é um processo ordenado de suicídio celular que necessita de uma ativa expressão gênica, ocorre quando há um certo número de eventos do desenvolvimento e facilita com a remoção de tipos celulares específicos que não são mais exigidos (Lam et al. 2001). É conhecida por ocorrer durante eventos do desenvolvimento das plantas como na senescência de folhas e frutos, no desenvolvimento dos elementos traqueais, durante a hipersensibilidade em resposta ao ataque de patógenos e em eventos muito semelhantes a este ocorrem durante a formação do aerênquima sob estresses ambientais tais como hipóxia (Pennel e Lamb 1997, Fagerstedt 2010).

O início do desenvolvimento do aerênquima tem como características principal a PCD, que compreende os seguintes processos celulares subsequentes: condensação da cromatina, fragmentação de DNA e formação de corpos de membranas que circundam as organelas (Reed 2000, Gunawardena et al. 2001a). Foram observados sinais de degradação do núcleo celular durante a morte do córtex das raízes, e estes se iniciam do exterior do córtex e avançam em

direção ao estelo (Henry e Deacon 1981), na mesma direção em que os espaços de ar são formados no córtex.

Durante a PCD, a sinalização por etileno é acompanhada por um aumento citosólico de Ca^{2+} com posterior acidificação do citoplasma, elementos estes requeridos para que se inicie a morte de células corticais de raízes (Morgan e Drew 2004). Corroborando essa informação, em arroz foi observado que há um acidificação no pH citoplasmático, que se inicia em células isoladas específicas do córtex médio antes de formar o aerênquima (Kawai et al. 1998). Esta sinalização é semelhante àquela que ocorre quando há a formação dos elementos traqueais (Morgan e Drew 2004).

A concentração de Ca^{2+} citosólico livre é frequentemente mantida entre 100 a 200 nM (Bush 1995). Porém, essa concentração pode aumentar por causa da afinidade do Ca^{2+} à algumas proteínas, como por exemplo, as calmodulinas (Sanders et al. 1999). O retículo endoplasmático, a parede celular, as mitocôndrias, vacúolos e os cloroplastos têm a capacidade de sequestrar e armazenar o Ca^{2+} em uma escala de milimol, o que é muito maior do que a concentração no citosol (Bush 1995, Trewavas e Malho 1998). Em células animais, os processos de sinalização via Ca^{2+} são melhor estudados. Nestes, as mitocôndrias desempenham um papel central na cascata de morte celular, integrando alterações metabólicas (queda no pH, aumento da concentração de Ca^{2+} e alterações no estado energético) com a PCD. Em seguida observa-se um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial liberando o citocromo *c* e um fator de indução de apoptose que conduz à ativação de caspases ou cisteíno-proteases (Fortes et al. 2001, Virolainen et al. 2002). Em experimentos com trigo, foi observada a abertura do poro mitocondrial e liberação do citocromo *c* apenas nas células com falta de oxigênio e que foram circundadas por altas concentrações de Ca^{2+} , reforçando a participação do cálcio na sinalização para a PCD observado em células animais (Fortes et al. 2001, Virolainen et al. 2002).

Como o processo de PCD que precede formação do aerênquima tem muitas características em comum com a PCD dos elementos traqueais, sugere-se que uma variedade de enzimas hidrolíticas estejam envolvidas em ambos os processos (Morgan e Drew 2004). Embora haja a

determinação das características morfológicas do aerênquima em diversas plantas, a sinalização que leva ao ataque à parede celular é pouco conhecida. Acredita-se que após o colapso interno das células, observado em microscopia eletrônica de transmissão por Campbell e Drew (1983), a perda da integridade do tonoplasto permitiria o acesso das enzimas que estão nos vacúolos e no citoplasma. Com este evento, a dissolução da membrana celular poderia estar completa dentro de 24 horas que é quando se observam células individuais iniciando a morte celular (Evans 2003).

Modificações que ocorrem na parede celular durante a formação do aerênquima

As paredes celulares fornecem características importantes para as plantas, pois são elas que desempenham um conjunto de funções essenciais, como por exemplo, o formato diferencial entre as células necessário para formar tecidos e órgãos. Por formarem a interface entre células adjacentes, paredes celulares muitas vezes desempenham papéis importantes na comunicação intercelular e pela localização periférica desempenham um papel importante nas interações planta-microrganismos, incluindo respostas de defesa contra agentes patogênicos (Kegstra 2010).

Como a formação do aerênquima geralmente é induzida por alagamento (estresse), alguns trabalhos indicam um aumento nas proteínas relacionadas a doenças/resistência e a modificação da parede celular como β -1,3 glucanase, 1,4 glucano proteína sintase, β -glucosidase e metionina sintase, e que estas enzimas podem estar relacionadas com as modificações estruturais observadas em raízes de soja (Kong et al. 2010). Entretanto, em estudos com plantas que possuem capacidade de formação de aerênquima (como o milho), são observadas alterações nas pectinas da parede celular durante a desintegração do córtex radicular em uma fase muito precoce da morte celular (Gunawardena et al. 2001b).

Além das mudanças no conteúdo de pectinas (Gunawardena et al. 2001b), muito pouco tem sido descrito sobre as glicosil hidrolases de parede celular. Alguns estudos focam na regulação molecular da formação do aerênquima e a identidade das enzimas envolvidas no processo de PCD (Subbaiah e Sachs 2003). No trabalho de He et al. (1996a) foi reportado que a atividade da enzima celulase é aumentada na região apical antes de qualquer sinal de anormalidade microscópica da

célula, sugerindo que esta enzima participa da degradação da parede celular durante a formação de aerênquima. Kawase (1974, 1979) demonstrou que as células corticais do estame de girassol tratadas com celulase foram ampliadas radialmente, e algumas desintegradas, o que resultou em um espaço intercelular. A expansão celular é dependente de mudanças na parede celular e do crescimento celular radial que ocorre com a indução de celulasas que atacam as microfibrilas de celulose (Fan e Maclachlan 1966).

Além da celulase, Saab e Sachs (1996) clonaram um gene cuja expressão foi induzida pelo alagamento e tratamento com etileno, que codifica para uma XTH, enzima relacionadas ao afrouxamento da parede celular. Outras enzimas provavelmente estão envolvidas nesses processos de degradação como as pectinases (Jackson e Armstrong 1999) e também proteínas acessórias sem atividade hidrolítica, como as expansinas.

Leite (2013) caracterizou as modificações que acontecem na parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana de açúcar, mostrando que o mesmo se inicia com a morte celular programada. Dados deste trabalho mostram que a hidrólise de parede celular não é total, visto que as principais alterações, incluindo degradação, foram observadas para β -glucano e pectinas (e não dos demais polissacarídeos). A remoção de pectinas, presentes principalmente nas lamelas médias, resultou na separação celular. Também foi observado um aumento proporcional de xiloglucano e arabinoxilano no córtex durante a formação do aerênquima, possivelmente pelo rearranjo da parede celular. No entanto, a ruptura desta estrutura foi observada apenas em algumas regiões específicas. Houve também o colapso da parede celular em algumas regiões onde verificou-se a presença de celulose e xilanos, formando um compósito de parede celular ao redor dos espaços de ar.

Neste contexto, a fim de compreender os mecanismos que levaram às alterações observadas nos polissacarídeos da parede celular das raízes de cana de açúcar durante a formação do aerênquima (observadas por Leite 2013), optou-se neste trabalho por estudar a síntese e a ação das glicosil hidrolases. A hipótese é que haveria uma ação coordenada das glicosil hidrolases, iniciando pelas pectinases que operam as etapas iniciais de separação celular seguidas da síntese

de glicosil hidrolases que degradam o β -glucano. Após este processo, supõe-se que haja a produção de glicosil hidrolases que modifiquem as demais hemiceluloses da parede celular. Tendo em vista que a ação das glicosil hidrolases precisa estar em sintonia com a composição e a arquitetura da parede, os pressupostos elaborados neste trabalho levarão em conta os polissacarídeos-alvo e sua acessibilidade na parede celular. Neste contexto, este trabalho vem contribuir com dados referentes às glicosil hidrolases de parede celular produzidas pela cana de açúcar, a fim de que futuramente seja possível transformá-las geneticamente, para que ao longo do desenvolvimento, a parede celular possa ser mais acessível para a sacarificação e geração de energia.

OBJETIVO

Considerando o conhecimento prévio sobre as alterações na parede celular de cana de açúcar durante o desenvolvimento do aerênquima em raízes de cana-de açúcar, o objetivo deste trabalho foi identificar os padrões de expressão gênica, produção e ação de glicosil hidrolases de suas parede celulares durante o processo de formação de aerênquima.

Objetivos específicos

- Determinar se a atividade enzimática das hidrolases atuantes na degradação da parede celular durante a formação do aerênquima se é perene ou apresenta uma ordem sequencial;
- Determinar em que fase do desenvolvimento da raiz ocorre a transcrição dos genes e a expressão de proteínas relacionadas às enzimas de degradação da parede celular durante a formação do aerênquima;
- Verificar o grau de acessibilidade de hidrolases aos polissacarídeos da parede celular ao longo dos segmentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

Colmos de cana da variedade SP80-3280 foram coletados no sítio Victória na cidade de Piracicaba-SP. Os toletes foram plantados em bandejas contendo vermiculita e, após duas semanas de brotação das gemas e início do desenvolvimento, as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 15 litros também contendo vermiculita. A adubação foi feita com NPK (30:20:30) conforme especificações agrícolas para plantio. Passados cerca de 3 meses de cultivo as raízes foram coletadas (Figura 1).

Figura 1. Aspecto geral plantas de cana de açúcar empregadas nas coletas (A-B); Distinção dos dois tipos de raízes adventícias: raízes brancas (raízes do perfilho), mais jovens e túrgidas, empregadas na coleta e raízes marrons (raízes do tolete), mais velhas e lignificadas (C) e detalhe da região de formação da raiz do perfilho (D).

Cinco lotes de plantas foram cultivados conforme descrito acima, sendo destinados às análises de cálculo da formação do aerênquima, quantificação de proteínas totais e análise de proteômica, análise de expressão gênica e material para ensaios de enzimas hidrolíticas. Com o intuito de acompanhar os diferentes estágios de desenvolvimento do aerênquima, os cinco centímetros mais apicais da raiz foram coletados e as secções foram realizadas a cada centímetro, indo do ápice (seg 1) em direção a base (seg 5), conforme mostra a Figura 2. Estes dados foram coletados em conjunto com a dissertação de mestrado da aluna Débora C.C. Leite (2013).

Figura 2. Segmentos sequenciais de 1 cm das raízes da cana de açúcar do ápice (1) para a base (5) da planta (A); Seções transversais dos segmentos. Barras nas figuras de anatomia representam a escala de 100 μm (B) (Fotos: Retirado de Leite 2013).

As coletas foram realizadas sempre entre às 10 e 12 horas, exceto para o experimento de coletas ao longo de 24h, conforme descrito a seguir. O material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para as futuras análises.

Coleta do Material ao longo de 24 horas

Considerando os dados apresentados por De Souza (2011) que aponta a síntese mais intensa de compostos da parede celular no período noturno, foi realizada amostragem de segmentos também ao longo de um período de 24 horas. Dessa forma, a transcrição de genes de hidrolases de interesse puderam ser estudadas levando em conta possíveis flutuações temporais ao longo de um ciclo diário.

Em cada horário, cada uma das 5 réplicas foi composta por raízes de 10 plantas (total de 50 plantas por horário). As raízes foram amostradas em 4 horários de coleta ao longo de 24 h (0, 6, 12 e 18h). Após as coletas, os mesmos segmentos que correspondiam a cada horário foram agrupados a fim de contemplar as variações de expressão de transcritos durante 24 horas.

Determinação da proporção de aerênquima entre os segmentos

Com o intuito de determinar a proporção de aerênquima em cada um dos segmentos, foram amostradas raízes de 6 indivíduos para análises anatômicas nos mesmos dois lotes coletados para análises bioquímicas. Para tanto, cada segmento foi imerso em uma solução de formalina, ácido acético e etanol (FAA- 70° – Johansen, 1940) colocadas no vácuo e estocados a 5°C até as

análises. O material fixado foi desidratado em série etanólica ascendente de 35%, 50%, 70%, 95% até 100% (v/v), durante uma hora e após esta etapa foi infiltrado em historesina conforme instruções do fabricante (Leica Historesin Kit - Jung®). Secções anatômicas das raízes foram obtidas com espessura de seis a nove milímetros utilizando um micrótomo semi-automático (Leica RM 2145) e foram coradas com o corante Azul de Toluidina (0.025%), pH 4.0 (Vidal, 1977) e posteriormente montados para análise em microscopia de luz (OLYMPUS BX51).

Análises de expressão gênica

Desenho dos oligonucleotídeos específicos

O banco de ESTs de cana de açúcar, (SUCEST -<http://sucest-fun.org/>; Vettore et al., 2001) foi empregado na busca de clusters de sequências expressas na raiz (banco *root tip*, RT) e categorizados por Lima et al. (2001) como referentes à síntese e degradação de parede celular. Tais clusters foram empregados em alinhamentos locais (BLAST – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e triagem de sequências para desenho de iniciadores, o qual se deu por meio da busca de referências quanto à caracterização funcional da proteína correspondente. Assim, de 121 sequências inicialmente selecionadas, após a triagem empregamos 53 para o desenho de iniciadores.

Após a obtenção das sequências de glicosil hidrolases, as mesmas foram analisadas pelo *software Repeatmasker* (<http://www.repeatmasker.org/>) com o intuito de encontrar regiões repetitivas intercaladas no genoma e/ou de baixa complexidade (repetições em *tandem*, sequências de polipurinas, regiões ricas em AT) a fim de mascará-las com a letra N para não interferir na confecção do iniciador.

Após este refinamento e com as sequências em modelo FASTA, foram desenhados 61 pares de oligonucleotídeos específicos (*primers*) para o emprego em PCR em tempo real (Anexo 1).

Para desenho dos iniciadores foram utilizadas as ferramentas *online* Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e IDT OligoAnalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer) com

temperatura de *melting* entre 58 e 60°C, conteúdo de GC de 40 a 60%, e *amplicon* com extensão de 50 a 150 pb.

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen® e ressuspensos em uma concentração estoque de 100 µM em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM pH 8,0). Estes foram então aliquotados em uma concentração de 10 µM e armazenados a -20°C para testes de eficiência na amplificação.

Na Tabela 1 são apresentados as 26 sequências de iniciadores específicos, bem como os parâmetros de temperatura de *melting*, homo e hetero dímeros de cada sequência.

Após a síntese, os oligonucleotídeos específicos foram analisados quanto a à eficiência seguindo parâmetros descritos por Hellemans et al. (2007). Iniciadores com eficiência entre 90 e 110% e capazes de gerar um produto único segundo o padrão observado em curvas de dissociação, foram empregados nas análises por qPCR.

Extração de RNA

A extração de RNA de 200 mg de segmentos de raiz macerados em N₂ líquido foi realizada com o método fenol/isotiocianato de guanidina utilizando reagente TRIzol® (Invitrogen®), seguindo instruções do fabricante.

O material contendo o RNA extraído foi ressuspensado em 30 µL de água e mantido a -20°C, para as posteriores análises.

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos de genes que codificam para enzimas hidrolíticas de parede celular e proteínas acessórias e suas respectivas especificações para a construção.

nome primer	EST	Sucessor-anotação	Blast - ncbi anotação	Espécie	Similaridade (%)	sequencia do iniciador (FWD)	sequencia do iniciador (REV)
a-galactosidase	SCQSRT2034G08.g	alfa galactosidase	alpha-galactosidase	Oryza sativa Japonica	88	TCCCCATTACACAGCGAGA	ACACGGACATGCAGCCAAAA
a-xilosidase	SCJLRT1020A08.g	alfa xilosidase	alpha-glucosidase (LOC101761758)	Setaria italica	93	GAGCTCTGCAGTCGCTGGAT	CACCAGCTCCACAGGTACA
arabinofuranosida	SCQSRT1034D03.g	arabinosidase	alpha-L-arabinofuranosidase 1-like (LOC102716270)	Oryza brachyantha	86	GGAACGCTGCTACCTTGGA	GGCCAAGACGCGAACTGTCT
b-1,3 glucanase1	SCJLRT1023E06.g	beta 1 3glucanase	beta-1,3-glucanase A (GluA1)	Saccharum hybrid cv	96	AGCGCGTCGAAGAGGTTCTG	CCGCTGCTCTGCAACGTCTA
b-1,3 glucanase2	SCCART2004C04.g	beta 1-3 glucanase	beta-1,3-glucanase A (GluA1)	Saccharum hybrid cv	98	CGCGTCGAAGAGGTTCTGGT	TCAGTACGCGCTCTTCACG
B-glu 14a	SCVPRT2073A02.g	beta glicosidase/exoglucanase	exoglucanase1 (exg1)	Zea mays	89	CCTGCTAGCGTTGGGGAGAG	AGTCACCATGGAGGCCAAG
b-xilosidase	SCCART1002G03.g	beta xilosidase	beta-D-xylosidase 6-like (LOC101755206)	Setaria italica	92	GCCACGGCATCACAATCAGA	ACGTACCAGCGCCTTTCAA
b-galactosidase	SCEPRT2044F09.g	betagalactosidase	beta-galactosidase (LOC100279948)	Zea mays	97	CGGCCCTCGAAGTCGTA	CCGGCTCCATCCACTATCCA
Calcineurin	SCCCLB1004G05.g	calcineurina b like	calcineurin subunit B (LOC100285425)	Zea mays	89	TCGCAGCAGGAGATCGTGT	TGAGGGAGAAGCTCGGGATG
Calmodulina	SCCCLR2003G10.g	Calmodulina	calmodulin-like protein 1 (LOC100283599)	Zea mays	85	CCTCCAGCCAAGCATCAC	GCGGTCGCGGTAGATTAGATG
celulase	SCEQRT1024F11.g	celulase	cellulase (Cel3) mRNA	Zea mays	98	GAGTTCGCCGACAAGTACCG	GAGGAGCTCGTGGTAGC
celulose sintase	SCQGR1044A07.g	celulose sintase	cellulose synthase-like protein	Oryza sativa	91	GTCCACATGACCAAGCATG	TCTTGGGCTGGGAGTTCGTC
expansina	SCQSRT1036C01.g	expansina	expansin-B2-like (LOC102706412)	Oryza brachyantha	85	GTTGGCGTACTCCACCAGCA	CGGGGGCTCACTGTCAACTT
expansina2	SCVPRT2077B02.g	expansina	beta-expansin 4 (LOC100281892)	Zea mays	93	CAGCGTCCCTTCTCGTCGAT	CACATCCCTTGCTCCCTTG
expansina3	SCRURT2011A12.g	expansina	expansin-A22-like (LOC101783155)	Setaria italica	87	CTGCGGCCAGTGCTACAAGA	AAGTTGGTGGCGGTGATGGT
expansina4	SCVPRT2075H10.g	expansina	alpha-expansin 13 precursor	Zea mays	98	CCGGGGAGGCAGTACTTGAG	GATCTGGGGAAGCACGGCTA
lacase 1	SCACSB1039F01.g	lacase	laccase-like	Zea mays	90	TGGCCATGGCAATCTCTCT	CGTGTCACGTTCCGCTTGT
lacase 2	SCCSD1090D07.g	lacase	laccase-like	Zea mays	91	GGTGGAATGCAGACGTGGAG	GGCTGGCGTTAATGGTGT
pec ac 1	SCQAM1045B09.g	pectina acetil esterase	carboxylic ester hydrolase	Zea mays	91	TCCCCAGAACGAGGTGAAA	CTCCTGGCACCAAAATGTTCTT
pec ac2	SCJLFL3013D11.g	pectina acetil esterase	pectinacetylesterase precursor	Zea mays	91	CCGTATCCCTGCAACCAACT	GGCAGGTGTGATCCCTCATT
endo-poligalact.2	SCAGRT2038D08.g	pectina methyl esterase	hypothetical protein	Sorghum bicolor	94	GCACCAAGCTCCTCCCTGAA	GCCGGTTACCACTTCCAGA
endo-poligalact.1	SCEZRT2016H09.g	poligalacturonase	polygalacturonase-like	Setaria italica	83	CAGCAACGATGTGACGGTCA	CGTCCCGACTCGATGGATA
XTH3	SCACSB1036D01.g	xiloglucano endotransglicosidase	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 12-like	Setaria italica	91	TGGGCAACAAGGAGATGCAG	ACGCCGTCGATGTACCACAC
XTH4	SCBGLR1023F11.g	xiloglucano endotransglicosidase	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9-like	Setaria italica	87	CGCTGCACAAGAGAGGAGGA	GCCACCACCACCACCATTC
XTH1	SCEQRT2101A02.g	xiloglucano endotransglicosidase	xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase protein 8 precursor	Zea mays	100	CAACTCCACGCGCAAGTACC	GACGTCAGGTAGAAGGAGGTGACA
XTH2	SCQSRT2034B07.g	xiloglucano endotransglicosidase	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase 3	Bambusa oldhamii	100	CTTCTACCTGTCGTCGAGAACTC	GTCCGGTTGCCAGGAACT

A pureza das amostras foi determinada pela razão da densidade óptica mensuradas em comprimento de onda a 260 e 280nm. A integridade do RNA foi checada em gel de agarose (0,8%) e a quantificação foi realizada a partir da absorbância a 260nm em NanoDrop (ThermoScientific) segundo a fórmula:

$$[\text{RNA}] = (A_{260\text{nm}} \times F_c \times F_d) / 1000$$

onde: **Fc** é o fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorbância no comprimento de onda de 260nm correspondente a 40 µg RNA. mL⁻¹ e **Fd**, o fator de diluição da amostra.

Síntese de cDNA para qPCR

Cinco µg do RNA total foram tratados com DNase I Amplification Grade (Life Technologies) seguindo instruções do fabricante. Posteriormente 1 µg de RNA tratado foi submetido à síntese de cDNA utilizando o sistema de síntese *Multi scribe high capacity cDNA reverse transcription kit* (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA gerado foi empregado como molde em PCR com o iniciador GAPDH (Iskandar et al. 2004) e o produto da amplificação foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0,8 % com tampão TAE 1x e posteriormente corado com brometo de etídeo. O mencionado iniciador gera um fragmento de 417 pb a partir de DNA e 183 pb a partir de cDNA.

Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

Antes do início da quantificação dos genes alvo foram realizadas curvas de diluição com todos os iniciadores específicos selecionados para este trabalho utilizando-se um pool de todas as amostras estoque que foram diluídas nas concentrações de 1/5, 1/25 e 1/125, além da solução estoque (sem diluição). Após feita a qPCR foi escolhida a diluição ideal do cDNA para emprego nas reações posteriores, sendo esta de 1/5.

Tanto os testes iniciais das curvas de diluição como as análises da expressão utilizaram o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) que foi empregado de acordo com o

protocolo do fabricante, em 15 µL finais. A padronização das condições de amplificação das sequências-alvo em 25µL de reação foi a seguinte: 10ng de DNA genômico de cana de açúcar (variedade SP80-3280), 0,2mM dNTPs, 1,25U de GoTaq DNA Polimerase (Promega) e tampão da enzima 1x. Os parâmetros de amplificação consistiram em desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C. Ao final, foi realizado um passo de extensão a 72°C por 5 minutos. As reações de qPCR foram feitas em triplicatas experimentais e curvas de dissociação investigaram a presença de amplificações não específicas. Os oligonucleotídeos específicos bem como a anotação da EST e a homologia dada pelo NCBI utilizados para as análises são apresentados na Tabela 2. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão Tris acetato EDTA (TAE) 1x e posteriormente corado com brometo de etídio.

Os valores de CNRQ (*calibrated normalized relative quantity*; Hellemans et al. 2007) foram determinados pelo software 2.6 qBasePLUS e os iniciadores de referência foram selecionadas usando a ferramenta GeNormPLUS (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica; Hellemans et al, 2007). Os normalizadores testados foram gentilmente cedidos pelo laboratório da Profa. Glaucia de Souza (IQ-USP) e selecionados os que se apresentaram mais constantes entre as amostras. Os resultados dos iniciadores deste trabalho estão apresentados como expressão relativa do valor de CNRQ em relação aos normalizadores UB - *ubiquitin-conjugating enzyme* (SCCCLR1048F12.g), 60S - *60S ribosomal protein* (SCJFRZ2009G01.g), GADPH - *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Iskandar et al. 2004), UBE2 - *ubiquitin-conjugating enzyme E2* (SCBGLR1002D06.g).

Extração de proteínas totais solúveis e ensaios enzimáticos

Após a maceração dos segmentos em nitrogênio líquido, foram aliqüotados 0,5 g do macerado ao qual foi adicionado 1 mL de tampão Mcllvaine pH 5.0 (ácido cítrico e fosfato de sódio) contendo polivinilpirrolidona (PVPP) e fenilmetanosulfonilfluoride (PMSF). Os extratos foram macerados novamente e posteriormente foram centrifugados a 12.000 x g por 30 min a 5°C.

O sobrenadante foi recolhido e o volume final de extrato foi estimado e imediatamente realizados os respectivos ensaios enzimáticos utilizando os substratos sintéticos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Substratos sintéticos de 4-Nitrophenyl (PNP) e seus respectivos açúcares conjugados, bem como a concentração do substrato durante os ensaios enzimáticos. A possível enzima que degrada cada polissacarídeo está apresentada em descrição.

Nomenclatura do substrato	Sigla	Concentração do substrato no ensaio	Descrição
4-Nitrophenyl α -D-galactopiranoside	a-gal	25 mM	hidrólise de mananos
4-Nitrophenyl β -D-glucopiranoside	b-glc	25 mM	hidrólise de celulose
4-Nitrophenyl α -D-xilopiranoside	a-xil	25 mM	hidrólise de xiloglucano
4-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside	a-araf	10 mM	hidrólise de pectinas (arabinano)
4-Nitrophenyl α -L-arabinopiranoside	a-arapi	10 mM	hidrólise de pectinas (arabinano)
4-Nitrophenyl α -L-fucopiranoside	a-fuc	25 mM	hidrólise de xiloglucano
4-Nitrophenyl β -D-cellobioside	b-cel	25 mM	hidrólise de celulose
4-Nitrophenyl β -D-galactopiranoside	b-gal	25 mM	hidrólise de pectinas (galactanos)
4-Nitrophenyl β -D-glucuronide	b-glur	25 mM	hidrólise de arabinoxilanos e pectinas
4-Nitrophenyl β -D-xilopiranoside	b-xil	25 mM	hidrólise de arabinoxilanos e pectinas
4-Nitrophenyl β -D-mannopiranoside	b-man	10 mM	hidrólise de mananos

Os ensaios enzimáticos foram realizados a partir de 50 μ L de substrato (PNPs na concentração inicial de 50 ou 20 mM) e 50 μ L do extrato bruto de proteínas totais (concentração final do substrato na Tabela 2). A mistura foi incubada a 40°C durante 20 min para os seguintes substratos: a-gal, a-glc, a-araf, a-arapi, b-xil e b-gal (Tabela 2). Para os demais substratos (b-man, b-glur, b-cel, a-xil e a-fuc) foi necessária a incubação por uma hora, pois muitas vezes não havia atividade para alguns substratos.

Em seguida foram adicionados 900 μ L de carbonato de sódio 0,05 M para reagir com o p-nitrofenol liberado e interromper a atividade. A leitura do p-nitrofenol foi realizada em espectrofotômetro a 405nm, de acordo com Alcântara *et al.* (1999).

A atividade enzimática específica foi determinada através da seguinte equação:

$$[[(((\text{absorbância}/\text{constante}) * \text{VTE}) * \text{VTEB}) \div \text{VEE}) \div t] \div \text{PTEB}] 10^3 \div = \mu\text{mol açúcar} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$$

Onde, **Constante** é o coeficiente de extinção molar do PNP-açúcar (14.500); **VTE** é o volume total de ensaio (2 mL); **VTEB** é o volume total de extrato bruto em mL; **VEE** é o volume de enzima

utilizada no ensaio (0,01mL); **t** é o tempo do ensaio enzimático (15 min); **TPEB** é proteína total (mg) do extrato.

O conteúdo de proteínas totais em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford de quantificação de proteínas (Bradford,1976), utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA).

Sacarificação dos segmentos

A fim de compreender o grau de acessibilidade das enzimas em relação à composição da parede celular, foi realizado o método de sacarificação dos segmentos das raízes de cana de açúcar. Esta análise foi realizada em colaboração com o laboratório do prof. Dr. Leonardo D. Gómez da Universidade de York, Inglaterra. Neste experimento, duas condições de pré-tratamentos foram testadas: NaOH 0,5 N (para sacarificar somente a celulose) e água fervente (para sacarificar os componentes de parede celular mais solúveis, como o β -glucano). Ambos os pré-tratamentos foram realizados à 90 °C por 30 min.

Após o pré-tratamento, a biomassa foi lavada por mais 6 vezes em 500 μ L de tampão de acetato de sódio antes das hidrólises enzimáticas. As amostras foram incubadas com agitação a 50 °C na presença do coquetel enzimático (Celluclast - celulase de *Trichoderma reesei* e Novozyme 188 - celobiase de *Aspergillus niger*, em um coquetel contendo a proporção de 4:1, respectivamente) como descrito em Gómez et al. (2010). Após incubação, as reações foram aliqüotadas em microplacas e as amostras foram novamente mantidas a 50 °C. Após este período de incubação, a quantificação de açúcares liberados pela sacarificação foi efetuada. Esse procedimento foi realizado automaticamente por uma estação de trabalho robotizada - *liquid handling station* conforme descrito por Gómez et al. (2010).

Análise Proteômica

Extração de proteínas

A análise de proteômica foi realizada no Laboratório de *Genomica Funzionale e Proteomica dei Sistemi Modello* – Dipartimento di botanica - Università di Roma *La Sapienza*.

Quinhentos mg de macerado em nitrogênio líquido de segmentos de raiz foram empregados nas extrações sequenciais de acordo com os métodos de Borderies et al. (2003) e Feiz et al. (2006) com algumas modificações.

A extração de proteínas foi realizada utilizando o tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 6,5 (contendo 1mM de fenilmetanosulfonilfluoride (PMSF) diluído em etanol 1%). Nesta extração foi adicionado o coquetel de inibidor de proteases utilizado conforme instruções do fabricante (Sigma Aldrich). Nesta solução foram adicionados diferentes sais a fim de fracionar as proteínas do material. Para tanto utilizamos: NaCl 0,15 M seguido de NaCl 1 M, CaCl₂ 0,2 M, EDTA 50 mM e LiCl 3 M. O sal NaCl foi utilizado para extração de proteínas retidas na parede celular por interações iônicas em duas concentrações para fracionarmos proteínas mais solúveis e mais abundantes das demais. O CaCl₂ é descrito como um sal eficiente na extração de proteínas de parede celular (Smith et al. 1984). O emprego de EDTA nas extrações visa possibilitar a solubilização de proteínas associadas às pectinas, pois é um quelante de cálcio (Selvendram e O'Neil 1987). Já o LiCl foi utilizado a fim de extrair glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Voight 1985) e também proteínas de parede celular.

Proteínas foram extraídas em duas lavagens consecutivas de 500 µL cada, totalizando 1 mL de solução final. Os extratos foram incubados a 5 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 30 min a 4 °C e repetida a extração com a mesma solução.

A fim de manter as mesmas concentrações de proteínas, somente 800 µL do extrato foi dialisado em membranas de celulose (Sigma *tubing* com diâmetro de 6 mm) que retêm proteínas maiores que 12.000 Da. Os sacos de diálise com cada extrativo foram mantidos em água destilada a 5°C durante 16 h e após este período as amostras foram secas em um concentrador de amostras do

tipo speed vac. Para quantificação das proteínas totais, o material foi ressuspensionado em 40 μ L de tampão de corrida (Tris 50 mM pH 6,8 M, glicerol 8%, SDS 20% e bromofenol 4% com β -mercaptoetanol) e as amostras extraídas com o emprego de LiCl e EDTA que foram digeridas em solução (ver abaixo), foram diluídas em 30 μ L de tampão contendo ureia 6 M, tiuréia 2 M e bicarbonato de amônio 50 mM. A concentração de proteínas foi obtida utilizando o método de Bradford (1976).

Figura 3. Detalhe da metodologia empregada para fracionar as proteínas para análise proteômica. Gel 1D SDS-Page contendo o padrão de todas as repetições de um segmento (A) e dos cortes realizados entre as repetições a fim de separar ainda mais as proteínas (B). Essas fatias foram cortadas em pedaços menores para digestão (C) e acondicionadas em microtubos de 2 mL (D).

Para fracionamento das proteínas, principalmente as frações que são mais concentradas que outras, em algumas frações de extrativos foram realizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE (12% acrilamida, 0,3% bis-acrilamida) de acordo com Laemmli (1970). Esses géis foram feitos apenas para as frações de NaCl 0,15 M e 1 M e CaCl_2 0,2 M. Após coloração com Colloidal Coomassie pelo método de Neuhauff et al. (1985) os géis foram seccionados nas seguintes bandas de acordo com o padrão de peso molecular específico em cada gel: 1). Para os géis de extratos obtidos com NaCl 0,1 e 1 M, as bandas de cada amostra (contendo 90 μ g de proteínas) foram cortadas em 3 partes: parte 1 – proteínas com peso molecular entre 250 até 72 kDa; parte 2 proteínas entre 72 até 28 kDa; e parte 3 proteínas menores que 28 kDa. 2) Para os géis de CaCl_2 0,2 M (contendo 6 μ g de proteínas) cada banda foi cortada em 2 partes: parte 1 – proteínas entre 250-

36 kDa e parte 2 proteínas até 36 kDa. Para evitar contaminação, todos os segmentos de raízes que representavam a mesma réplica experimental foram colocados no mesmo gel, totalizando aproximadamente 20 géis. Frações de LiCl e EDTA apresentaram baixo rendimento e foram misturadas para serem analisadas juntas (contendo apenas 1,7 µg de proteínas) (Figura 3).

Preparo das proteínas para digestão

Após a determinação da concentração de proteínas nas amostras, foram feitos géis para um maior fracionamento das mesmas (como descrito na Figura 3). Após os cortes dos géis, as amostras foram submetidas ao processo de redução e alquilação das proteínas, e subsequente digestão (frações de NaCl 0,1 M e 1 M e CaCl₂ 0,2 M). Contudo, para algumas frações que não foram separadas em gel, foi realizado o mesmo processo de redução e alquilação e a digestão foi realizada em solução (EDTA e LiCl), como descrito abaixo.

- preparo de proteínas em gel

Depois da migração de cada amostra de proteínas das frações NaCl 0,1 M e 1 M e CaCl₂ 0,2 M em gel e da fragmentação do gel em partes menores, que foram cortadas em pedaços menores de 1 x 1 mm (Figura 3 c,d), foi realizado o processo de branqueamento e desidratação dos pedaços de gel, seguido da redução e alquilação das proteínas presentes em cada amostra pelo protocolo proposto por Shevchenko et al (2006).

Às porções menores de gel foram adicionados 500 µL de acetonitrila 100% seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente para desidratação e descoloração. A acetronitrila foi removida e foram adicionados 150 µL da solução de DTT 10 mM Dithiothreitol, diluído em bicarbonato de amônio 100 mM e incubados a 56 °C por 30 min. O DTT quebra as ligações dissulfeto entre as cisteínas que subsequentemente são alquiladas com a adição de iodoacetamida.

Após resfriamento, foram adicionados 500 µL de acetonitrila 100% e as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. A parte líquida foi removida e posteriormente foram adicionados 80 µL da solução de IAA (Iodoacetamida 55 mM diluída em

bicarbonato de amônio 100 mM). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente e no escuro por 20 min. Depois desse período, foram adicionados novamente 500 µL de acetonitrila 100%. As amostras foram agitadas e em seguida a todas as soluções foram removidas do gel.

A coloração do gel foi removida com 100 µL da solução de bicarbonato de amônio 100 mM com acetonitrila 100% (v/v) mantendo as amostras por 30 min em temperatura ambiente. Para finalizar o processo foram re-adicionados 500 µL de acetonitrila 100% e quando o gel estava bem descolorido foi removido todo o líquido do gel. Neste estágio as amostras foram congeladas para posterior digestão.

- *Preparo das proteínas em solução*

No primeiro passo, as amostras foram diluídas em 40 µL de 6 M de uréia, 2 M tiuréia e de bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0. Foi adicionado 1 µL da solução de DTT (10 mM Dithiothreitol em água destilada) e as amostras foram incubadas a 56 °C por 30 min. Foi adicionado 1 µL de IAA (iodoacetamida 50 mM diluída em bicarbonato de amônio 50 mM). A mistura foi incubada por 20 min no escuro em temperatura ambiente. A redução e a alquilação foram necessárias para manter as proteínas mais lineares (cadeia primária) para que a tripsina pudesse agir efetivamente. Depois desse processo, as proteínas foram digeridas (Shevchenko et al. 1996, modificado).

Digestão das proteínas totais

Depois da redução e alquilação, as proteínas foram submetidas à digestão com tripsina (*trypsin grade modified* - PROMEGA) diluída em bicarbonato de amônio 10 mM e acetonitrila 10%. Durante o ensaio enzimático as amostras foram mantidas por 16 h à 37 °C, com agitação constante. Para as amostras em gel foi utilizada tripsina 13 ng/µL até cobrir toda a superfície do gel (aproximadamente 80 µL) de acordo com o protocolo de Shevchenko et al. (2006). Neste ensaio, a tripsina foi bloqueada adicionando 150 µL da solução de ácido fórmico 5% diluído em acetonitrila 100% (1:2) e incubado por 15 min à 37 °C sob agitação. Os sobrenadantes contendo todos os peptídeos extraídos do gel foram removidos e secos em concentrador de amostras. As amostras em

solução foram digeridas com 13 ng/ μ L de tripsina de acordo com o protocolo modificado de Shevchenko et al. (1996).

Os componentes restantes da digestão (por exemplo: moléculas que contêm aminas primárias e interferem na marcação dos peptídeos) foram retiradas por dessalinização (Shevchenko et al. 2006). Em todas as amostras utilizou-se dois tipos de colunas de cromatografia de fase micro-reversa com resinas de octadecil C18 - 47 mm (*disk solid phase extraction* 3M®) e outra Oligo R3® (*Applied Biosystems*® - PN 1-9001-05). As amostras foram filtradas de acordo com as especificações do fabricante. O sobrenadante contendo todos os peptídeos foi novamente seco em concentrador de amostras para a marcação com dimetil, descrita abaixo.

Peptídeos Multiplex: marcação dos peptídeos com isótopos de dimetil para a análise de proteômica quantitativa

Depois da digestão, dessalinização e secagem, as amostras foram submetidas a diferentes marcações a fim de obter uma análise quantitativa de cada proteína entre os segmentos das raízes de cana de açúcar. Para isso foi utilizado o protocolo descrito em Boersema et al. (2009) otimizado para 25 μ g de proteína que era a quantidade aproximada de proteínas nas amostras.

Os grupos de amostras (contendo segmentos de raiz e os diversos fracionamentos com sais realizados) foram marcados sequencialmente para manter o mesmo padrão na marcação. A marcação do segmento 3 da raiz foi feita em duplicata em um mesmo tubo a fim de evitar diferenças na marcação dos peptídeos. O segmento 3 foi o controle normalizador entre as amostras porque há uma limitação no número de amostras marcadas que são lidas e comparadas por LC-MS/MS. Todas as amostras foram ressuspensas em 100 μ L of TEAB 100 mM (triethyl ammonium bicarbonate) contendo os grupamentos de aminas primárias livres e em seguida foram ressuspensos os peptídeos.

Foram adicionadas às amostras 4 μ L de formaldeídos específicos a 4% (v/v) (CH_2O , CD_2O ou $^{13}\text{CD}_2\text{O}$ - light, intermediate e heavy, respectivamente) dependendo da intensidade de cada marcador na sua respectiva amostra (Tabela 3) as quais foram manual e gentilmente agitadas.

Adicionou-se 4 μL de cianoborodrito 0,6 M (NaBH_3CN ou NaBD_3CN) dependendo da intensidade da amostra (light, intermediate e heavy) (Tabela 3, Figura 4).

Os tubos foram agitados constantemente em vórtex durante 1 hora em temperatura ambiente. A ação do marcador foi bloqueada com a mudança de pH pela adição de 16 μL de solução de amônia 1% (v/v) e posterior acidificação adicionando 8 μL de ácido fórmico 5% (vol/vol). Esse processo foi realizado em gelo para prevenir o aquecimento das amostras.

As amostras foram agrupadas de acordo com seus marcadores (segmentos 1, 2 e 3, e segmentos 3, 4 e 5) que passaram pelo mesmo processo de dessalinização pelas colunas de C18 e Oligo R3 descritas acima. Depois da dessalinização, as amostras foram novamente secas em concentrador de amostras e ressuspensas em 20 μL de ácido fórmico 0,01% pra início das análises em LC-MS/MS. O resumo de cada parte foi descrito na Figuras 4 e 5.

Tabela 3. Mudança de massas dos peptídeos pela combinação de formaldeído e cianoborodrito durante a marcação com isótopos de dimetil e suas respectivas intensidades (light, intermediate e heavy) de acordo com cada segmento de raiz (modificado de Boersema et al 2009).

Label	Intensidade do marcador dimetil		
	Light	Intermediate	Heavy
Aumento de massa por marcador	+28.0313 Da	+32.0564 Da.	+36.0757 Da.
Isotopo de formaldeído	CH_2O	CD_2O	$^{13}\text{CD}_2\text{O}$
Isótopo de cianoborodrito	NaBH_3CN	NaBH_3CN	NaBD_3CN
Segmentos das raízes	1 e 5	2 e 4	3

A Figura 5 resume as estratégias empregadas para a extração do material e análise de proteômica das raízes de cana de açúcar durante a formação do aerênquima.

O experimento inicial consistiu em 25 amostras divididas em 5 segmentos de raízes (que são os tratamentos a serem comparados) divididos em cinco replicas (A, B, C, D, E).

Todas as amostras foram digeridas e marcadas para análise em espectrometria de massas. Encontrados os peptídeos, foram identificadas as proteínas e quantificadas entre os segmentos de raiz.

Figura 4. Esquema do desenho experimental que foi conduzido para a extração de proteínas dos segmentos das raízes de cana de açúcar (A e B). Depois da digestão, os peptídeos foram marcados com os componentes de dimetil adicionando diferentes massas aos peptídeos (*light*, *intermediate* e *heavy*) (C e D). Cada amostra foi marcada com diferentes massas e misturadas para análise. Os espectros de massa apresentam a separação por massas das 3 amostras unidas para cada peptídeo, que contribui na separação e quantificação do mesmo em cada amostra. A análise que foi utilizada é a de *shotgun* por LC-MS/MS (E).

Figura 5. Esquema do experimento que foi realizado com os segmentos de raízes de cana de açúcar para o preparo e fracionamento das amostras para análise por *shotgun* em LC-MS/MS.

A análise de LC-MS/MS dos segmentos das raízes de cana de açúcar foram realizadas em um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap (ThermoScientific) acoplado a uma fonte de íons em nano-spray (NS Ion Source, ThermoScientific). A separação dos peptídeos foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida - Ultimate 3000 nano-LC system (Dionex-ThermoScientific) equipado com uma coluna de RP-HPLC column (75 μm $\times$ 15 cm) empacotada com resina C18 (Magic C18 AQ 3 μm ; Michrom BioResources) utilizando um gradiente linear de 95% do solvente A (ácido fórmico 0,1%) e 5% do solvente B (de acetonitrila 98% e ácido fórmico 0,1%) para 55% do solvente B com um tempo de corrida de 160 min com uma taxa de fluxo de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A aquisição de dados foi realizada a fim de obter uma alta resolução com um escaneamento do Mass Spectrometer em Fourier Transformation no espectrômetro de massas em uma resolução em média de 30.000 pela largura máxima (m/z 400) seguida por eventos de MS/MS em um ion trap linear com os 5 íons mais intensos. O aumento da eficiência nos eventos de MS/MS, foi habilitado para excluir íons não atribuídos e de carga única pela triagem do modo de mudança de carga. A dissociação pela colisão induzida era desencadeada quando o precursor excedia 500 contagens de íons. A duração da exclusão dinâmica foi ajustada para 15 segundos. O tempo de acúmulo de íons foi definido para 300 ms (MS) e 50 ms (MS/MS).

Dados no formato .RAW foram exportados diretamente do programa Xcalibur, e a busca de proteínas foi realizada pela plataforma do Maxquant (<http://www.maxquant.org/>) contra uma base de dados de proteomas preditos pelo banco Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), e utilizando para a montagem das proteínas o banco de dados das ESTs de cana de açúcar (<http://sucet-fun.org/>).

O critério de busca foi realizado da seguinte forma: 1) total especificidade triptica (clivagem depois de resíduos de lisina e arginina); 2) foram autorizadas clivagens perdidas; como a carbamidometilação de resíduos de cisteína foram definidos como uma modificação fixa; oxidação de metionina foi definido como modificação variável; 3) também foi considerada a marcação com dimetil entre as amostras com as 3 intensidades dos marcadores. A massa tolerante foi de 6 ppm pelo precursor de íons e 0,5 Da por íons fragmentados. A taxa de falsos peptídeos descobertos

(*false discovery rate* – FDR) foi de 5% para o nível de peptídeos e a validação usando o número de hits das sequências de proteínas utilizando a base de dados reversa. Os resultados foram comparados com o banco de dados específico para cana de açúcar, e analisados com o auxílio do software Perseus (<http://www.perseus-framework.org/>) para a quantificação da abundância das proteínas (Cox e Mann 2008).

Análise de dados

Dados referentes a atividade enzimática, expressão de genes, sacarificação da biomassa e quantidade de proteínas foram analisados com o auxílio do software JMP 5.0.1 (Copyright© 1989 - 2002 SAS Institute Inc.). Foi testado a homogeneidade de variância e em seguida realizado o teste paramétrico Anova – *One-way* seguido do teste a posteriori de *Tukey*, considerando significativo o valor de $P < 0,05$.

Nas análises de dados da proteômica, das 1082 proteínas encontradas em todas as amostras, foi realizado um filtro inicial de valores válidos para cada proteína encontrada ao menos em 3 réplicas experimentais. Após este processo, foi realizado outro filtro normalizando a presença e ausência das proteínas de acordo com o segmento 3 em cada corrida, pois nas corridas havia proteínas que não foram identificadas para a mesma amostra. Para tanto, o segmento 3 foi colocado em dois grupos de amostras para ser o segmento comparativo entre duas corridas no equipamento LC-MS/MS (desenho experimental de marcadores Figura 4). Após essa primeira filtragem, restaram 525 proteínas que foram identificadas e normalizadas.

Destas 525 proteínas consideradas nas análises, foram selecionadas as relacionadas a síntese e degradação da parede celular e as de PCD (morte celular programada). A quantificação relativa destas proteínas foi determinada com base na razão entre os segmentos de raiz subsequente (1/2, 2/3, 3/4 e 4/5) conforme descrito no desenho experimental realizado (Figura 4). Os termos de ontologia genética para cada sequência foram obtidos junto ao Blast2GO com a apresentação dos principais termos dos processos biológicos, componente celular e função

molecular de cada proteína, e quando enzima, comparada junto ao Kegg para obter o E.C. (*Enzyme code*) e o nome da enzima homóloga.

Para quantificar as proteínas ao longo dos segmentos foi utilizado o software Maxquant, que opera calculando as razões normalizadas entre as intensidades das amostras marcadas referentes as mesmas proteínas identificadas. Para realizar as quantificações relativas entre as razões foram utilizadas as razões normalizadas, calculadas e ajustadas pelo programa entre os segmentos de raiz. A razão foi calculada para os segmentos na seguinte forma: 2/1, 3/2, 3/4 e 4/5 (proporção entre a quantificação de uma dada proteína no segmento n em relação à sua abundância no segmento n-1). Devido ao tipo de marcação escolhida entre as amostras foi necessário que algumas das razões fossem invertidas no sentido de formar um gradiente de razões ao longo da análise, sendo assim as razões 2/1 e 3/2 foram invertidas (1/x) para que se tornassem equivalentes a 1/2 e 2/3. A análise de dados dessas razões de cada proteína entre os segmentos foi realizada pelo teste paramétrico Anova - *One-way* considerando significativos valores de $P < 0,05$.

A partir desses dados que foram significativos pelo teste Anova, foi realizada uma outra normalização com o intuito de deixar as razões transformadas para melhor compreender a sua abundância relativa entre os segmentos. Quando negativos, os valores das razões expressam que as proteínas diminuam ao longo dos segmentos e quando os valores são positivos expressam um aumento nas proteínas ao longo dos segmentos. Para ajustar os valores de forma a poder avaliar as variações ao longo dos 5 segmentos, os dados de razão foram submetidos a seguinte operação: diferença entre segmentos = $(R-1) * -1$. Onde R é a razão entre dois segmentos. Estes dados estão apresentados nas tabelas de proteínas de PCD e de parede celular.

A partir dessas razões normalizadas foi possível analisar os padrões de variação das proteínas em cada segmento de raiz. Para isso foram construídos gráficos representativos, onde foi considerado que o segmento 1 da raiz seria a base relativa de todos os outros dados, sendo este considerado o valor 0. A partir do segmento 1, havia a informação proporcional dos segmentos (dada pela razão) para cada proteína. Para isso, os dados do segmento 2 eram a os valores correspondentes a razão 1/2, uma vez que 1 era o valor 0. Para o segmento 3, foi somado o valor

do segmento 1/2 e 2/3, que corresponde ao que ocorreu entre os dois segmentos, o valor do segmento 4 foi somado as razões, 1/2, 2/3 e 3/4 e o segmento 5 foi realizada a somatória de todos as razões. Desta forma cumulativa foi possível avaliar se as proteínas estavam aumentando de concentração entre segmentos ou se estavam reduzindo a concentração, baseados no segmento 1 (conforme Figura 6).

Foram realizados gráficos de cluster (*heatmap*) para todas as proteínas encontradas. Todas as análises e gráficos foram construídos com o auxílio do software Perseus (<http://www.perseus-framework.org/>) (Cox e Mann 2008), versão 1.5.0.0. Para a construção do *heatmap* os dados foram transformados em $\log_2$ seguido de Z-score de acordo com as instruções do tutorial de análise proteômica do Perseus.

Figura 6. Delineamento experimental utilizado nas análises de proteômica quantitativa a partir das razões normalizadas obtidas pelo software Maxquant.

RESULTADOS

Determinação da proporção de aerênquima em cada segmentos

A porcentagem de aerênquima foi determinada entre os segmentos de raízes de cana de açúcar como é mostrado na Figura 7. Pode ser observado que nos segmentos 1 e 2 não há a formação de aerênquima, seguido da presença desta estrutura a partir do segmento 3. A fim de

minimizar os efeitos da variabilidade ao longo dos segmentos, o número amostral dos cortes foi de 3 a 5 por indivíduo, com réplicas amostrais biológicas compostas de 8 indivíduos coletados em dois lotes de plantas. Foi observado que em raízes de cana de açúcar a porcentagem de aerênquima varia entre 10% e 30% nos segmentos 3 a 5.

Figura 7. Distribuição dos dados correspondentes a porcentagem de aerênquima (área da secção transversal) no córtex de raízes de cana de açúcar em diferentes segmentos do ápice (1) para a base (5) (n=8).

Proteínas solúveis e identificação das hidrolases de parede celular

A concentração de proteínas apresentou diferenças significativas apenas no segmento 1 com a maior concentração de proteínas em relação a todos os outros segmentos ($P < 0,0001$), conforme observado na Figura 8.

Figura 8. Proteínas solúveis totais extraídas com tampão Mcllvaine (pH 5,0) para análise da atividade enzimática dos segmentos (1 a 5) das raízes de cana de açúcar. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5) e letras representam diferença significativa entre a quantidade de proteínas dos segmentos pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados substratos sintéticos que são apresentados na Tabela 2. A maioria dos substratos utilizados é para exo-enzimas, pois o 4-nitrofenol (composto que reage com o carbonato de cálcio em meio alcalino e resulta na coloração a ser quantificada a 405 nm) é ligado a uma molécula de monossacarídeo, formando uma ligação glicosídica clivável por exo-hidrolases. Como o reconhecimento se dá através do açúcar, a clivagem indica a ação específica da hidrolase sobre monossacarídeos presentes nos terminais não redutores de poli e oligossacarídeos.

Neste trabalho foram feitas tentativas de incubar os extratos enzimáticos dos segmentos com polissacarídeos com o objetivo de verificar a ação de endo-enzimas sobre arabinoxilano, galactomanano e xiloglucano. No entanto, em nenhum dos ensaios se verificou qualquer indício de ação enzimática e por isto tais resultados não são mostrados.

No entanto, um substrato que pode indicar atividade de endo-enzima sobre fragmentos de celulose é o B-CEL (β -celobiose). Este substrato possui mais de um açúcar ligado pelo carbono 4 à molécula de 4-nitrofenil (duas glicoses β -1,4 ligadas) que pode ser utilizada para testar a presença de possíveis celobiohidrolases (exo- β -1-4 glucanase) ou endo- β -1,4-glucanases. O resultado demonstrou a presença de atividade de celulase no ensaio com o extrato de raiz para este substrato (Figura 10). Além da celulase, outras enzimas podem estar atuando na hidrólise sobre o substrato B-CEL, notadamente xiloglucanases e mananases que podem reconhecer a ligação β -1-4 entre duas glucoses. A atividade B-CEL específica coincidiu com a atividade sobre B-GLC, o que parece realmente indicar atividades complementares de hidrolases sobre oligossacarídeos oriundos da celulose.

A presença da atividade de α -gal (Figura 10) pode indicar a hidrólise de galactoses ligadas na forma α , que possivelmente no tecido estaria associada à hidrólise de polissacarídeos do tipo galactomanano. Porém, em cana de açúcar já foi observado que há uma quantidade muito baixa de manose na parede celular (De Souza et al. 2013). Portanto, uma vez que a ação das α -galactosidases solúveis é muito observada no ciclo celular, esta enzima pode estar atuando em outras vias metabólicas, como por exemplo a hidrólise de rafinose.

Atividades de α -arabinosidases (nas formas furanosídicas e piranosídicas) e de β -galactosidases foram detectadas ao longo dos segmentos da raiz (Figura 9). Esta última, bem como a forma piranosídica da arabinose, apresentaram um padrão de evolução da atividade com elevação ou pico no segmento 3. Nestes casos é possível que haja associação com ramificações neutras de pectinas (arabinanos e galactanos). Já a atividade sobre a forma furanosídica de arabinose só aumentou no segmento 5, podendo estar relacionada com a desramificação de arabinoxilanos.

Analisados em conjunto, os resultados de atividade indicam que atividade geral de exo-glicosil hidrolases e de uma celulase (B-CEL) nos segmentos das raízes de cana, estas aumentam gradativamente até o segmento 3 (Figura 9), segmento este que é o primeiro a apresentar evidências da presença de aerênquima (Figura 7).

Expressão gênica

Durante o desenvolvimento, além da formação do aerênquima que foi caracterizada como tendo iniciado provavelmente no segmento 3 e progredindo até o segmento 5 (Figura 7), as raízes de cana desenvolvem, ao mesmo tempo, outros processos. Enquanto o meristema apical é responsável pela produção de novas células, apresentando intensa atividade de divisão e expansão celular (segmentos 1 e 2), o desenvolvimento do sistema vascular ocorre principalmente nos segmentos 2 e 3. Ainda que o foco principal deste trabalho tenha sido a formação do aerênquima e em particular a produção de hidrolases de polissacarídeos, alguns aspectos dos padrões de expressão evidenciaram possíveis correlações com os outros processos mencionados acima.

Transcritos referentes à celulose sintase (SCQGRT1044A07.g) apresentaram o mesmo padrão ao longo dos segmentos (Figura 10), indicando que as células da raiz mantêm a produção de celulose constante em toda a raiz. O perfil de expressão não permite atribuir tal atividade a qualquer um dos processos em curso na raiz (divisões celulares no meristema apical, formação do aerênquima e produção de tecidos vasculares).

Figura 9. Atividades específicas ($\mu\text{mol açúcar min}^{-1} \text{mg.prot}^{-1}$) de glicosil hidrolases de parede celular presentes no extrato protéico total de diferentes segmentos de raízes de cana de açúcar empregando substratos de 4-nitrofenil (siglas dos PNPs ver Tabela 2). Barras representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=4) letras representam diferença estatisticamente significativa da atividade entre os segmentos pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Figura 10. Perfil de expressão diferencial do gene celulose sintase nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Não houve significância pelo teste ANOVA-Tukey (P < 0,05).

Considerando que o processo de morte celular programada (PCD) ocorre em paralelo à formação do aerênquima, sendo provavelmente evento essencial no processo, alguns dos genes sabidamente relacionados à PCD foram acompanhados no sentido de identificar o estágio em que PCD ocorreu na raiz. Neste sentido, foram analisados os padrões de expressão de dois genes que codificam para proteínas sensoras de Ca^{2+} que podem indicar o início de PCD e ter alguma relação com a iniciação (talvez ser um dos primeiros eventos) da formação do aerênquima. Conforme observado na Figura 11, a partir do segmento 2 até o 4 houve um aumento no acúmulo de transcritos referentes ao gene CBL (*Calcineurin B Like* - SCCCLB1004G05.g), em relação ao segmento 1. Contudo, no segmento 5 o acúmulo é menor, com níveis similares ao observado no segmento 2. O perfil transcricional de CAM (calmodulina - SCCCLR2003G10.g) apresentou o mesmo padrão de CBL (Figura 11).

Figura 11. Perfil de expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo de cálcio (Calcineurina e Calreticulina) nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam a média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0.05$).

Visando observar as variações em expressão gênica que pudessem estar relacionadas diretamente à formação do aerênquima, genes associados com a hidrólise de lignina e polissacarídeos foram avaliados nos 5 segmentos isolados.

Os padrões de expressão de genes que codificam para lacases (lacase 1 - SCACSB1039F01.g e lacase 2 - SCCCSD1090D07.g) demonstram aumento no acúmulo de transcritos principalmente no segmento 2 (Figura 12). Lacase 1 apresentou um pico no segmento 2 e posteriormente se manteve constante. Por outro lado, a lacase 2 apresentou um aumento nos níveis do transcrito persistente até os segmentos 2 e 3, decaindo nos segmentos 4 e 5 e atingindo níveis similares aos observados

no segmento 1 (Figura 12). Isso sugere que a lignina presente no tecido possa ser alvo de hidrólise enzimática.

Figura 12. Perfil de expressão diferencial de genes relacionados à hidrólise de lignina (lacases) nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey (P<0.05).

No que diz respeito aos transcritos referentes às enzimas que atuam sobre xiloglucano, empregamos quatro pares de iniciadores para amplificação de XTHs, desenhados a partir da sequência de 4 ESTs distintas (XTH1 - SCEQRT2101A02.g, XTH2 - SCQSRT2034B07.g, XTH3 - SCBGLR1023F11.g e XTH4 - SCACSB1036D01.g) (Figura 13). A enzima xiloglucano endo-transglicosilase/hidrolase (XTH) tem a capacidade de clivar o polissacarídeo (atividade de xiloglucano endo-hidrolase - XEH) ou reagrupar as cadeias de xiloglucano (atividade de xiloglucano endo-transglicosilase - XET). Empregando os iniciadores XTH1 e 2 (ref. aos SAS SCEQRT2101A02.g e SCQSRT2034B07.g) foi observado o mesmo padrão de acúmulo de transcritos, sendo maior e significativo no segmento 1 em relação aos demais (Figura 13). Porém, resultados de alinhamento múltiplo sugerem que estas não se tratam do mesmo gene. Estas duas XTH podem estar relacionadas aos processos de divisão celular e expansão celular, pois no segmento 1 é onde estes processos estão ocorrendo com maior intensidade, pois trata-se da região que contém o meristema apical da raiz. Além disso, estas XTHs poderiam também estar relacionadas à formação do aerênquima, pois nesta etapa de expansão celular é requerida para início das modificações teciduais características deste evento (Kawai et al. 1998).

O emprego dos iniciadores XTH3 demonstraram que o transcrito alvo tem o mesmo padrão ao longo de todos os segmentos não sendo possível atribuir a expressão deste transcrito a eventos específicos na raiz. O perfil de expressão de XTH4 apresentou consonância com a formação do

aerênquima uma vez que aumentou gradativamente do segmento 2 até o segmento 5. No entanto, também apresentou alto nível de expressão no segmento 1 (Figura 13).

Figura 13. Perfil de expressão diferencial dos genes de xilogucano endo-transglicosilase/hidrolase (XTH) nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0,05$).

Além das XTH e da celulose sintase (Figuras 13 e 10), outra classe de proteínas que participa nos processos de crescimento, relacionada à expansão celular, é a das expansinas (Figura 14). Todos os transcritos referentes a expansinas analisados (EXP1 - SCQSRT1036C01.g; EXP2 - SCVPRT2077B02.g; EXP3 - SCRURT2011A12.g; EXP4 - SCVPRT2075H10.g) apresentaram o mesmo padrão ao longo da raiz, com maiores níveis no segmento 1 e 5. Estas quatro expansinas foram checadas quanto a sua similaridade entre si e os resultados de alinhamento múltiplo sugerem que não se tratam do mesmo gene. Os padrões de variação de EXP1 e EXP2 são similares ao padrão observado, por exemplo, para XTH4 (Figura 13), com alta expressão no segmento 1 e expressão crescente entre os segmentos 2 e 5 (Figura 14). Já os genes EXP3 e EXP4 apresentaram um padrão ligeiramente distinto, com um decréscimo a partir do segmento 1 até o 4 e um aumento no segmento 5 (Figura 14).

Figura 14. Perfil de expressão diferencial dos genes que codificam para expansinas nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tukey ($P<0,05$).

A transcrição de enzimas que atacam as pectinas foi avaliado através de medidas de expressão dos genes correspondentes a duas endo-poligalacturonases (EPG1 - SCEZRT2016H09.g e EPG2 - SCAGRT2038D08.g). Estes genes apresentaram padrões distintos de expressão entre os segmentos, embora (Figura 15). Enquanto EPG1 apresentou níveis crescentes em direção ao segmento 5, o PG2 acumulou-se nos segmentos 2 e 3, reduzindo seus níveis nos segmentos subsequentes.

Para os transcritos correspondentes às outras pectinases, sequências estas na sua maioria anotadas como pectinas acetil esterases (iniciadores pec ac 1 e 2, desenhados com base nas ESTs SCQGAM1045B09.g e SCJLFL3013D11.g) houve uma tendência geral nessas hidrolases de pectina serem maiores a partir do segmento 2 (Figura 15). Os resultados para a expressão gênica das hidrolases que atacam as pectinas (endo-poligalacturanases e pectinas acetil esterases) sugerem que as pectinas são inicialmente desacetiladas anteriormente ao ataque pelas endo-hidrolases.

Figura 15. Perfil de expressão diferencial dos genes relacionados a enzimas de degradação de pectinas nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0.05$). ** não há homogeneidade.

Além da α -arabinofuranosidase clivar substituições de arabinoses do arabinoxilanos, ela também pode estar relacionada com a hidrólise de ramificações neutras (arabinanos) do ramnogalacturanano 1 (RG-1). O padrão transcricional observado para o gene que codifica para a α -arabinofuranosidase (SCQSRT1034D03.g) demonstrou um nível constante de expressão entre os segmentos 1 e 2 e um maior acúmulo de transcritos nos segmentos 3, 4 e 5 (Figura 16). Nas raízes de cana de açúcar, a β -galactosidase apresentou um padrão semelhante de expressão gênica em relação à α -arabinofuranosidase, com menores níveis de transcritos no segmento 1 em relação aos demais, sendo que no segmento 2 e 5 a tendência foi de maior expressão (Figuras 17 e 16). Para a α -galactosidase (SCQSRT2034G08.g) é demonstrado o mesmo padrão que o observado para β -galactosidase (Figura 17). A expressão e a atividade observadas para as β -galactosidase está relacionada a hidrólise das ramificações com galactanos presentes em RG-1.

Figura 16. Perfil de expressão diferencial do gene de arabinofuranosidase nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0.05$).

Figura 17. Perfil de expressão diferencial dos genes que codificam para α - e β -galactosidases nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($p < 0.05$).

Foram quantificadas as expressões de dois genes que codificam para β -1,3 glucosidases (SCJLRT1023E06.g e SCCCRT2004C04.g), responsáveis pela hidrólise de β -glucanos ou calose, e o padrão de expressão observado para ambas foi o mesmo, sendo os níveis de transcritos menores no primeiro segmento, aumentando no segundo e mantendo-se constantes ao longo dos demais segmentos (Figura 18).

Figura 18. Perfil de expressão diferencial dos genes relacionados a enzimas de degradação de β -1,3-glucano (calose) nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0.05$). ** não há homogeneidade.

Foi observado também um aumento nos níveis de transcritos que correspondem a uma celulase (SCEQRT1024F11.g) e uma β -1,4 glicosidase (SCVPRT2073A02.g) no segmento 2 em relação aos demais segmentos (Figura 19). Estes dois genes estão relacionados à hidrólise de glucanos β -1,4 ligados, como a celulose.

Figura 19. Perfil de expressão diferencial dos genes relacionados a degradação de celulose (celulase e β -1,4 glicosidase) nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P < 0.05$).

Três classes de enzimas em plantas são identificadas por degradar xilano: endo- β -xilanases, as β -xilosidases e as α -arabinofuranosidases. As duas primeiras são responsáveis por clivar especificamente as ligações na cadeia de principal de xilano e a última remove as substituições de arabinoses de cadeia lateral do xilano ou de oligossacarídeos de arabinoxilanos, além de participar da hidrólise de pectinas, como descrito anteriormente (Figura 16). Nos segmentos de raízes de cana de açúcar, transcritos referentes a β -xilanase (SCJLRT1020A08.g) apresentaram maiores níveis de transcritos para todos os outros segmentos exceto para o primeiro segmento (Figura 20). Já o

padrão transcricional observado para o gene que codifica para a α -arabinofuranosidase (SCQSRT1034D03.g) demonstra maior acúmulo de transcritos nos segmentos 3, 4 e 5 (Figura 16). Observando esses dados transcricionais referentes a xilanases e arabinofuranosidases é possível sugerir que o arabinoxilano das raízes de cana de açúcar também esteja sendo modificado ao longo dos segmentos.

A α -xilanase, apresenta o mesmo padrão de transcritos da β -xilanase, porém está relacionada a modificações nas xiloses do xiloglucano (Figura 20). Na cana de açúcar é observado baixas concentrações desse polissacarídeo, entretanto durante a formação do aerênquima foi observado um aumento de xiloglucano no córtex das raízes ao longo dos segmentos (Leite, 2013) e esta enzima pode estar relacionada a essas modificações observadas no xiloglucano que interage fortemente com a celulose que também está sendo modificada.

Figura 20. Perfil de expressão diferencial dos genes que codificam para α - e β -xilanases nos segmentos (1 a 5) de raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($P<0.05$). ** não há homogeneidade.

Quantificação das proteínas para a proteômica

A fim de determinar a concentração de proteínas que foi utilizada na análise de proteômica, todas as extrações envolvendo os diferentes solventes foram quantificadas. Na Figura 21 é possível observar que, dentre as frações extraídas, as frações iniciais de NaCl são mais abundantes em proteínas do que os passos subsequentes: CaCl_2 , EDTA e LiCl. Entre os segmentos há uma diferença significativa do primeiro em relação aos demais no que diz respeito às proteínas totais extraídas com NaCl. Isto é o esperado, pois esta região da raiz está o meristema apical, região

de intensa atividade metabólica e síntese de proteínas, o que contribui para o maior número rendimento nesse segmento. Já na extração com EDTA, o segmento 3 apresenta maior rendimento e difere dos demais. Contudo, foi observado que a extração com EDTA e LiCl resulta em baixo rendimento em relação aos demais métodos (menos de 1 µg de proteína) e portanto esses extratos foram agrupados para serem analisadas conjuntamente. Sendo assim, após a junção das amostras de EDTA e LiCl, quantificou-se novamente o conteúdo de proteínas (Figura 22).

Figura 21. Conteúdo total de proteínas de todas frações extraídas sequencialmente dos segmentos das raízes de cana de açúcar. Valores de P representam o teste ANOVA comparando os segmentos em cada extração (n=5). O segmento 3* representa uma segunda extração do mesmo segmento para compor a quantificação das proteínas pelo método de dimetilação, explicado em material e métodos.

Figura 22. Conteúdo total de proteínas das frações extraídas sequencialmente dos segmentos das raízes de cana de açúcar. Frações de EDTA e LiCl foram unidas e quantificadas novamente, o segmento 3* representa uma segunda extração do mesmo segmento para compor a quantificação das proteínas pelo método de dimetilação, explicado em material e métodos.

Análise das proteínas identificadas

Após a análise de todas as extrações de proteínas e réplicas biológicas dos segmentos das raízes de cana de açúcar no software Maxquant, foram identificadas 1084 proteínas (Anexo 2). Destas, 113 foram relacionadas à síntese, degradação e modificação da parede celular de acordo

com a ontologia genética obtida pelo banco de dados do Blast2GO (Anexo 2). Ao todo foram identificadas 34 glicosil hidrolases (3 GH18, 7 GH3, 5 GH1, 2 GH28, 1 GH31, 11 GH17, 5 GH38) e outras enzimas e proteínas acessórias relacionadas às modificações da parede celular durante a formação do aerênquima como: 5 lacases, 7 expansinas, 1 pectinesterase, 2 poligalacturanases, 3 endo-1,3-1,4- β -glucanases, 2 β -xilosidases, 3 α -galactosidases, 3 arabinofuranosidases, 2 α -glucosidases e 2 celulose-sintases (Anexo 2).

Devido a limitação de reprodutibilidade na técnica de proteômica de amostras complexas, foi realizado um filtro manual (conforme análise de dados Figura 6) das réplicas de amostragem que identificou apenas 525 proteínas que foram distribuídas em um *heatmap* com o valor das razões obtidas entre os segmentos (Anexo 3). Este conjunto de proteínas (que muitas vezes excluiu parte das enzimas relacionadas a parede celular) foi considerado tanto para a análise daquelas que podem estar envolvidas à morte celular programada quanto para as proteínas relacionadas à degradação e síntese de parede celular. A quantificação, obtida pelo método de marcação por dimetilação, foi realizada pela razão relativa entre os segmentos 1 para 2, 2 para 3, 3 para 4 e 4 para 5, formando uma escala gradativa a favor do desenvolvimento da raiz, bem como da formação do aerênquima radicular.

Após essa análise explanatória foi necessário selecionar deste total de 525 proteínas aquelas de interesse tanto para analisar a PCD quanto modificações na parede celular durante a formação do aerênquima. Neste sentido, foram selecionadas 35 proteínas relacionadas à parede celular (Tabela 4 e Anexo 4) e 83 proteínas relacionadas à PCD (Anexo 5). Em relação as proteínas de parede celular foi realizado alguns cálculos de normalização com o intuito de apresentar da melhor forma os dados obtidos (Tabela 4), contudo os valores absolutos estão expressos no Anexo 4. Para as proteínas de PCD, o mesmo foi realizado porém os valores encontram-se na mesma tabela no Anexo 5.

Destas proteínas relacionadas a parede celular, algumas apresentam a mesma anotação embora sejam referentes à ESTs distintas (Tabela 4), estas foram re-anotadas com o auxílio do Blast2GO com a busca no Uniprot, NCBI e Kegg. As buscas dos termos ontogeneticos (Go-Terms)

são apresentados na Tabela 4 e Anexos 4 e 5 com as respectivas proteínas e nome do SAS do Sucest.

Com o intuito de compreender melhor as diferenças entre as proporções (razões calculadas entre segmentos) das proteínas ao longo dos segmentos de raiz, foi realizada uma normalização nos dados de razão onde o segmento 1 foi considerado com o valor 0 e todos os outros foram relativizados em relação ao segmento anterior (Figura 23). Sendo assim foi possível observar que para algumas glicosil hidrolases o padrão de variação ao longo dos segmentos foi semelhante.

Foram identificadas 5 proteínas da família GH1 (possivelmente relacionadas com atividade de β -glucosidase) ainda que apenas 3 apresentassem valor significativo para o cálculo das razões entre os segmentos (Tabela 4). A proteína pertencente à família GH1 (ref. ao SAS SCEQHR1082B01.g) apresentou menor quantidade relativa entre a razão 1/2 representando que do segmento 1 para o 2 teve uma redução na concentração de proteínas. Em seguida há um aumento da proporção de GH1 em relação ao segmento 2 para os demais segmentos até o 5 verificado pelo aumento exponencial das razões entre 2/3, 3/4 e 4/5 (Tabela 4 e Figura 23). A GH1 (ref. ao SAS SCCCCL3001B10.b) também reduziu a proporção de proteínas do segmento 2 em relação ao 1 e reduziu a concentração de proteínas ao longo dos segmentos. A outra GH1 (ref. ao SAS SCAGLR1021F11.g) mostrou um aumento do segmento 1 para o 2 sendo constante entre 2, 3 e 5 e reduzindo a proporção no segmento 5 (Figura 23).

No que diz respeito as glicosil hidrolases da família GH17, na qual estão situadas as proteínas identificadas como β -1,3 glucanases e que podem hidrolisar o β -glucano, foram encontradas 6 proteínas, sendo que 3 delas apresentaram diferenças significativas. Duas GH17 (ref. aos SAS SCEZHR1088G11.g e SCEQRT1025C10.g) apresentaram menor abundância do segmento 1 para os demais ao longo de todas as razões entre os segmentos, enquanto que outra enzima da família (ref. ao SAS SCJFRT1008G05.g) tornou-se mais abundante a partir do segmento 3 em relação para os demais (Tabela 4 e Figura 23). Duas GH17 que foram encontradas nos segmentos e não tiveram diferenças significativas apresentaram uma tendência de maior acúmulo ao longo dos segmentos enquanto que outra foi de diminuição ao longo dos segmentos (Tabela 4). Contudo ao

realizar o alinhamento de sequências foi observado que há grande similaridade entre essas GH17, podendo estas fazerem parte da mesma proteína.

Apesar de apresentar apenas duas endo-1,3(4) β -glucanases, que são conhecidas como liquenases e degradam exclusivamente β -glucanano, apenas uma dessas proteínas apresentou diferenças significativas (ref. ao SAS SCVPRT2081E09.g) com maior abundância no segmento 2 em relação ao segmento 1, aumentando também gradativamente a razão até o 4, em seguida de diminuindo sua razão no 4/5 que corresponde a diminuição da abundância da proteína no quinto segmento, que segue o mesmo padrão de algumas GH17 (Figura 23), a outra liquenase (SCCCLR2C01H02.g) apesar de não ser significativa ($P=0,083$) mostra um padrão diferenciado de proporção relativa entre segmentos, permanece constante a expressão do segmento 1 ao 3, diminui no quatro e volta a ser igual aos demais no quinto segmento (Figura 23).

As xilosidases e arabinofuranosidases que são agrupadas na família GH3 apresentam um perfil muito similar, todas tornando-se mais abundantes na transição do primeiro para o segundo segmento. Apenas metade dessas enzimas da família GH3 prosseguiram em seu padrão crescente entre as razões dos segmentos 2/3 (ref. aos SAS SCAGRT2037A11.g; SCCCRT1002G03.g e SCEQLR1093F09.g) reduzindo as razões entre os segmentos subsequentes. As demais GH3 reduziram a quantidade a partir da razão 3/4 (Tabela 4 e Figura 23). Entre as enzimas cuja identificação sugere se tratem de α -arabinofuranosidases ou β -xilosidase (ref. aos SAS SCCCCL4009F05.g e SCQSRT1034D03.g), foi observado um aumento no segmento 2 em relação ao 1, seguido de uma redução em todos os segmentos (Tabela 4 e Figura 23).

A GH18 (*probable chitinase or xylanase inhibitor* – SCMCCL6051E03.g) apresentou um padrão bimodal de quantidade relativa entre os segmentos com maiores níveis em 1/2 e 3/4 e menores em 2/3 e 4/5. Ou seja, sua ocorrência aumenta nos segmentos 2 e 4 e reduz em 3 e 5 (Tabela 4 e Figura 23). Duas β -galactosidases (ref. aos SAS SCCCCL6004H07.g e SCEPRT2044F09.g) apresentam esse mesmo padrão bimodal apresentado pela GH18, com níveis aumentados em 1/2 e 3/4. Contudo, uma terceira β -galactosidase (SCCCCL4001H11.g) apresentou padrão distinto das razões, sendo crescente ao longo dos segmentos e reduzindo no quinto (4/5) (Tabela 4 e Figura 23).

As proteínas relacionadas a expansão celular (expansinas) também apresentaram esse mesmo padrão, porém não apontaram diferenças significativas (Tabela 4). Duas expansinas foram identificadas e mostram padrões distintos entre si, uma delas (ref. ao SAS SCCCCL4006H09.g) foi maior apenas no segmento 1 decaindo drasticamente nos demais, enquanto a outra expansina (ref. ao SAS SCSGLV1004F11.g) apresentou uma redução na quantidade relativa apenas a partir do segmento 3, aumentando novamente no segmento 5 (Tabela 4), esta última apresenta o mesmo padrão dos transcritos de expansina que aumentam no segmento 1 e 5 (Figura 14).

As proteínas *fasciclin-like arabinogalactan* (proteoglicanos que muitas vezes são glicosiladas com estruturas de arabinogalactanos do tipo II) apresentaram maiores níveis no segmento 2 em relação ao 1 reduzindo entre os outros segmentos (Tabela 4).

A família de enzimas que teve mais proteínas encontradas e significativas foi a GH3 (relacionadas às xilosidases e arabinofuranosidases), onde a maioria apresentou o mesmo padrão ao longo dos segmentos (Figura 23). Já para a família GH1 que contempla as beta-glicosidases, apresenta maiores proporções ao longo dos segmentos enquanto que outra apresenta menor proporção no segmento 2. O que é possível concluir observando todos os dados é que há um aumento relativo nos níveis de glicosil hidrolases de parede celular a partir do segmento 2, o que persiste entre os segmentos 3 e 4. De acordo com suas atividades enzimáticas e seus padrões de ocorrência, estas podem estar atuando na modificação da parede ao longo da formação do aerênquima (Tabela 4 e Figura 23).

Tabela 4. Valores normalizados das razões entre as proteínas de parede celular encontradas nos diferentes segmentos das raízes de cana de açúcar. Valores representam a mediana entre 5 réplicas amostrais e valores de P significativos são apresentados em negrito ($P>0,05$) obtidos pelo software de montagem e quantificação Maxquant e de estatística Perseus. Termos GO foram obtidos com as ferramentas do software Blast2GO. Valores negativos representam diminuiu a concentração ao longo do segmento de a para o b (a/b) valores positivos representam que aumentou a concentração ao longo dos segmentos de a para b.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Diferença entre os segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
1	SCQSRT2034G08.g	Alpha-galactosidase(UNIPROT)	0.243	0.329	0.272	-0.432	0.353	fintra-Golgi vesicle-mediated transport; root hair elongation; starch biosynthetic process	apoplast;plant-type cell wall;vacuole	alpha-galactosidase activity [EC:3.2.1.22];E3.2.1.22B
2	SCQSRT1034D03.g	Alpha-L-arabinofuranosidase(UNIPROT)	0.708	0.439	0.198	-0.101	0.000	glucuronoxylan metabolic process; L-arabinose metabolic process; xylan biosynthetic process; xylan catabolic process	apoplast;plant-type cell wall;vacuole	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity [EC:3.2.1.55];E3.2.1.55
3	SCEQRT1025C10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.782	0.282	0.052	0.083	0.000	anatomical structure form. involved in morphogenesis;carbohydrate metabolic processorgan development;organelle organization;post-embryonic development;	anchored to plasma membrane;plant-type cell wall	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
4	SCEZHR1088G11.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.532	-0.111	-0.107	-0.157	0.004	asymmetric cell division; auxin polar transport; carbohydrate metabolic process; cellular response to organic substance; cellular response to oxygen-containing compound; regulation of cell size; regulation of meristem growth; root morphogenesis	anchored to plasma membrane;endoplasmic reticulum;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity
5	SCJFRT1008G05.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.034	0.498	0.288	0.100	0.020	carbohydrate metabolic process; regulation of innate immune response; regulation of programmed cell death;response to bacterium; response to cold	anchored to plasma membrane;apoplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	beta-glucosidase activity;cellulase activity;protein binding
6	SCR FAM2071E02.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.144	0.167	0.043	0.234	0.241	carbohydrate metabolic process; cell communication; regulation of cellular process; regulation of gene expression, epigenetic; response to organic substance; response to oxygen-containing compound	anchored to plasma membrane;cell wall;cytoplasmic part;nucleus;plasmodesma	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
7	SCRFLR1055B07.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	-0.431	0.022	-0.160	-0.157	0.278	cytokinin mediated signaling pathway	plasma membrane	
8	SCRURT2006B10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.037	0.079	0.174	0.195	0.605	carbohydrate metabolic process;gene silencing; multicellular organismal development; organelle organization	anchored to membrane;cell wall;plasma membrane;plasmodesma	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
9	SCCCCL4001H11.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.707	0.258	0.230	-0.047	0.000	alcohol biosynthetic process; carbohydrate metabolic process;catabolic process; cell wall biogenesis; developmental cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; hydrogen peroxide metabolic process; plant-type cell wall modification; regulation of biological process	apoplast;cytosol;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity;carbohydrate binding
10	SCCCCL6004H07.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.179	-0.674	0.678	0.018	0.000	biological regulation; carbohydrate metabolic process; cellular biosynthetic process ;cellular process involved in reproduction; plant-type cell wall organization	apoplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity
11	SCEPRT2044F09.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.101	-0.457	0.650	-0.160	0.000	carbohydrate metabolic process; cellular cation homeostasis; cellular modified amino acid biosynthetic process; divalent metal ion transport; hydrogen peroxide catabolic process; plant-type cell wall biogenesis; plant-type cell wall modification; polyamine catabolic process; regulation of meristem growth; response to karrikin; root hair elongation	apoplast;cytosol;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity
12	SCCCCL4009F05.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)(UNIPROT)	0.536	-0.011	-0.043	-0.044	0.000	arabinan catabolic process; response to arsenic-containing substance;seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity
13	SCQSAM1030G04.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)(UNIPROT)	-0.420	-0.108	-0.039	-0.095	0.279	arabinan catabolic process; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity

Continuação Tabela 4.

	SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Diferença entre os segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
			seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
14	SCCCLR2C01H02.g	Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase OS=Zea mays PE=1 SV=1 (UNIPROT)	-0.208	-0.001	-0.328	0.304	0.083	glycolysis;Golgi organization;hyperosmotic response;response to cadmium ion;response to salt stress;response to temperature stimulus;water transport	apoplast;cytosol;nucleus;plasma membrane	hydrolase activity	carboxymethylenebutenolide dase [EC:3.1.1.45];E3.1.1.45
15	SCVPRT2081E09.g	Endo-1,3(4)-beta-glucanase 1;Endo-1,4-beta-glucanase 1;Endo-1,3-beta-glucanase 1;Laminarinase-1;(UNIPROT)	0.409	0.243	0.186	-0.118	0.052	amino acid import;cell wall macromolecule catabolic process;endoplasmic reticulum unfolded protein response;ER to Golgi vesicle-mediated transport;N-terminal protein myristoylation		glucan endo-1,3-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group;glucan endo-1,4-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group	
16	SCCCCL4006H09.g	Expansin(UNIPROT)	-0.387	0.077	-0.251	-0.163	0.746	cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; plant-type cell wall modification; sexual reproduction; trichoblast differentiation	extracellular region; Golgi apparatus; plant-type cell wall; plasmodesma		
17	SCSGLV1004F11.g	Expansin(UNIPROT)	0.057	-0.243	0.019	0.203	0.195	organelle organization; plant-type cell wall loosening; plant-type cell wall modification involved in multidimensional cell growth; regulation of stomatal movement; response to gibberellin stimulus; response to red light; syncytium formation; unidimensional cell growth	chloroplast;cytosol;extracellular region;plant-type cell wall;plasmodesma	structural constituent of cell wall	
18	SCEPLR1051B04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.172	-0.034	0.155	-0.046	0.265	alcohol biosynthetic process; cell growth; cellular component organization; plant-type cell wall organization or biogenesis; regulation of hormone levels;shoot system development; single-organism transport; steroid biosynthetic process; trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane;cell wall;vacuolar membrane		
19	SCQGRT1040D08.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	-1.209	-0.195	-1.255	0.267	0.471	alcohol biosynthetic process;biological regulation;secondary cell wall biogenesis;steroid biosynthetic process;trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane; Golgi apparatus; plant-type cell wall; plasmodesma		
20	SCQSLR1040G04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.510	-0.365	-0.159	-0.138	0.007	acetyl-CoA metabolic process; brassinosteroid biosynthetic process; cell growth; plant-type cell wall organization; regulation of meristem growth; root development; secondary cell wall biogenesis; sterol biosynthetic process	anchored to plasma membrane; cell wall; cytoplasmic part; intracellular membrane-bounded organelle		
21	SCRFLR1034D04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.514	-0.074	-0.472	-0.133	0.002	brassinosteroid biosynthetic process;cell growth;secondary cell wall biogenesis;trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma		
22	SCVPRZ2036F10.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.402	0.045	-0.158	0.027	0.198	acetyl-CoA metabolic process;brassinosteroid biosynthetic process;cell growth; plant-type cell wall organization; regulation of meristem growth; root development; secondary cell wall biogenesis; sterol biosynthetic process	anchored to plasma membrane;cell wall;cytoplasmic part;intracellular membrane-bounded organelle		
26	SCAGLR1021F11.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	-0.584	-0.474	-0.282	-0.177	0.000	carbohydrate metabolics ;cellular response to cold; defense response by callose deposition in cell wall; defense response to fungus; induced systemic resistance; negative regulation of defense response; response to salt stress; response to symbiotic fungus	apoplast ;chloroplast envelope; cytosolic ribosome; endoplasmic reticulum; ER body; Golgi apparatus; membrane ;nucleus; peroxisome; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;copper ion binding;fucosidase activity;phosphatidic acid binding;protease binding	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];E3.2.1.21
23	SCCCCL3001B10.b	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.492	0.077	0.032	-0.276	0.000	carbohydrate metabolic process; cellular response to ethylene stimulus; cellular response to iron ion;cellular response to nitric oxide; lignin biosynthetic process; pollen tube growth; regulation of cellular process; response to carbohydrate stimulus; response to other organism; response to salt stress	apoplast;chloroplast;cytosolic ribosome;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;coniferin beta-glucosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIB
24	SCEQHR1082B01.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	-0.681	0.463	0.341	0.167	0.000	carbohydrate metabolic process; glucosinolate metabolic process; pollen tube growth; response to other organism; response to salt stress	apoplast ;chloroplast; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;esculin beta-glucosidase activity;thiogalactosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];E3.2.1.21
25	SCEQLB1066E08.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.337	-0.035	-0.125	0.131	0.192	carbohydrate metabolic process; cellular component organization; cellular response to ethylene stimulus; lignin biosynthetic process; response to carbohydrate stimulus	apoplast;chloroplast;cytosolic ribosome;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIB
26	SCJFLR1017E03.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.300	-0.093	-0.129	-0.083	0.168	carbohydrate metabolic process; cellular response to ethylene stimulus; lignin biosynthetic process	apoplast ;chloroplast; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;coniferin beta-glucosidase activity;esculin beta-glucosidase activity	

Continuação Tabela 4.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Diferença entre os segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5						
27	SCAGRT2037A11.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.705	0.240	-0.133	0.128	0.038	arabinan catabolic process; regulation of meristem growth; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	
28	SCCART1002G03.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.475	0.252	-0.179	-0.136	0.009	arabinan catabolic process; response to chemical stimulus ;seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	beta-D-xylosidase 4 [EC:3.2.1.37];XYL4
29	SCCCSB1003H06.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.605	-0.276	0.005	-0.138	0.001	arabinan catabolic process; regulation of meristem growth; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	
30	SCEZRZ3015A12.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.590	-0.249	0.055	-0.091	0.001	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	beta-D-xylosidase 4 [EC:3.2.1.37];XYL4
31	SCEQLR1093F09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein(UNIPROT)	0.220	0.123	-0.013	-0.432	0.001	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIX
32	SCEZLB1007A09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein(UNIPROT)	0.272	-0.014	0.235	0.108	0.500	carbohydrate metabolic process;cell wall organization or biogenesis;cellular	anchored to membrane; cytosol; extracellular region; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuole	xylan 1,4-beta-xylosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIX
33	SCCCCL2001B11.b	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)(UNIPROT)	0.311	-0.021	0.275	-0.039	0.019	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	chitinase [EC:3.2.1.14];E3.2.1.14
34	SCCCCL4003F09.g	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)(UNIPROT)	0.235	-0.004	0.164	-0.231	0.662	carbohydrate metabolic process;cellular process;response to abiotic stimulus;response to stress;single-organism process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	chitinase [EC:3.2.1.14];E3.2.1.14
35	SCJLRT1020A08.g	Probable alpha-glucosidase Os06g0675700 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os06g0675700 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	0.331	-0.098	0.310	-0.259	0.613	plant-type cell wall biogenesis; plant-type cell wall organization; xylan catabolic process; xyloglucan metabolic process	apoplast; chloroplast; cytosol; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity;xyloglucan 1,6-alpha-xylosidase activity	alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20];malZ

Figura 23. Principais mudanças cumulativas entre os segmentos de raízes de cana de açúcar durante a formação do aerênquima. Dados foram calculados para as proteínas de hidrólise da parede celular e normalizados a partir das razões obtidas a partir do segmento 1. Números em cada amostra representam as proteínas citadas na Tabela 4. O segmento 1 passou a ser o controle sempre iniciando com 0, quando positivo traduz que há aumento das enzimas entre os segmentos e quando negativo/diminui indica que houve redução da concentração dessas proteínas (Mediana de 5 indivíduos).

As proteínas supostamente relacionadas à PCD (83 proteínas) encontram-se listadas no Anexo 5, que foram selecionadas obtidas a partir de toda a literatura de PCD em plantas. Contudo apenas 4 classes dessas proteínas são mais estudadas em relação a PCD em plantas: *calmodulin-binding protein*, *calreticulin*, *cytochrome c* e *b* e *cathepsin B*. Sendo assim as calmodulinas e

calreticulinas responsáveis pela primeira percepção da sinalização via cálcio e PCD em plantas, foram analisadas a distribuição das proteínas ao longo dos segmentos, sendo encontradas três calmodulinas (SCCCCL2001B01.b; SCVPLR1049C09.g) e 2 calreticulinas (SCSGST1072D03.g; SCEPLR1051D05.g) que apresentaram diferenças significativas. O padrão de ocorrência de calreticulinas e calmodulinas mostrou redução na proporção destas proteínas na transição do segmento 1 para o 2, sendo os níveis de uma calmodulina constante. Isso pode indicar que o processo de morte celular programada se inicia já nos primeiros segmentos, ou seja, nos estágios iniciais de formação do aerênquima. Citocromos c e b (SCUTLR1058A12.g e SCCCLR1001H04.g) e a catepsin B (SCCCLB1023F09.g) também são observados durante a morte celular programada, neste caso os dados também foram significativos, aumentando a quantidade relativa principalmente no segmento 2 (Figura 24).

Figura 24. Principais mudanças cumulativas entre os segmentos de raízes de cana de açúcar durante a formação do aerênquima. Dados foram calculados para as proteínas relacionadas a morte celular programada (PCD) e normalizados a partir das razões obtidas a partir do segmento 1. O segmento 1 passou a ser o controle sempre iniciando com 0, quando positivo traduz que há aumento das enzimas entre os segmentos e quando negativo/diminui indica que houve redução da concentração dessas proteínas (Mediana de 5 indivíduos).

Outras proteínas que podem estar relacionadas à PCD foram observadas ao longo dos segmentos, como *ATP synthase subunit α*, *cystein protease*, *cytochrome b e c*, *enolases*, *heat shock proteins*, proteínas relacionadas ao metabolismo de jasmonato (*jasmonate e jasmonic acid*),

ascorbate peroxidase e *superoxide dismutase*, sugerindo que PCD está ocorrendo ao longo dos segmentos (Anexo 5). Diversas dessas proteínas elencadas nessa análise foram descritas em trabalhos que relacionaram fatores externos, como alagamento e seca na indução da PCD e formação de aerênquima (Kaufmann e Hengartner 2001, Ahsan et al. 2007, Swidzinski et al. 2004, Hashiguchi et al. 2009, Komatsu et al. 2009, Nanjo et al. 2010).

Sacarificação dos segmentos de raiz

Visto que as paredes celulares são modificadas ao longo da formação do aerênquima, para quantificar a suscetibilidade dos polissacarídeos à hidrólise enzimática foram realizados ensaios de sacarificação nos diferentes segmentos de raízes de cana de açúcar. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com NaOH, em relação ao pré-tratamento com água quente, resulta em maior acessibilidade às enzimas do coquetel, visto que houve maior liberação de açúcares em todos segmentos e maior acesso dessas hidrolases à celulose (Figura 25). Dentre as amostras pré-tratadas com água quente, os segmentos 1 e 2 apresentaram maior sacarificação em relação aos demais, devido a maior solubilidade dos polissacarídeos presentes nestes segmentos. Já nos segmentos pré-tratados com NaOH foi visto que há uma diminuição no poder de sacarificação principalmente no 1 em relação aos demais (Figura 25).

Figura 25. Sacarificação em diferentes pré-tratamentos (NaOH e água) nos segmentos (1 a 5) das raízes de cana de açúcar. Dados representam média e o erro padrão (n=5). Letras diferentes representam significância pelo teste ANOVA-Tuckey ($p < 0,05$) entre segmentos em cada pré-tratamento, valor de P para NaOH = 0,003 e água = 0,002.

DISCUSSÃO

Recentemente, estudos que abordam uma ampla variedade de dados, que avaliam desde aspectos relacionados ao padrão transcricional até o perfil de produção de proteínas vêm sendo intensificados. No caso dos estudos mais aprofundados em proteômica, o principal objetivo é chegar a conclusões a respeito da dinâmica do metabolismo protéico (Nelson et al. 2014). Neste sentido, este trabalho teve como principal objetivo estudar os mesmos elementos supracitados (expressão gênica, proteômica e atividade enzimática) referentes às glicosil hidrolases de parede celular e proteínas relacionadas à morte celular programada que possivelmente participam do processo de formação do aerênquima em raízes de cana de açúcar.

Considerando a teoria de que nas plantas há módulos de degradação da parede celular e que estes módulos podem ocorrer da mesma forma dependendo do tecido em que estão localizados (Grandis et al. 2014), os dados deste trabalho vem mostrar que no aerênquima de raízes de cana de açúcar ocorre o mesmo processo quando comparado com a mobilização de parede celular de reserva, amadurecimento de frutos, interação planta-microrganismo e abscisão foliar. Todos esses processos levam a modificação celular, utilizando a hidrólise da parede. Os módulos que compõe esses processos são: (1) percepção de um sinal, (2) separação celular, (3) expansão celular, (4) PCD, (5) hidrólise ou afrouxamento de hemiceluloses e celulose, (6) hidrólise de celulose (ver Grandis et al. 2014 em anexo).

Os dados obtidos nesse estudo mostram que muitos desses módulos foram verificados através da análise de expressão gênica e de proteínas de algumas hidrolases, bem como a atividade de algumas glicosil hidrolases, principalmente de pectinases, que possibilitou a compreensão das modificações nos polissacarídeos da parede durante a formação do aerênquima observadas por Leite (2013).

A formação do aerênquima ocorre centripetamente no córtex das raízes de cana de açúcar (Leite, 2013), se iniciando entre o segundo e o terceiro centímetro da raiz a partir do ápice e concluindo-se no quinto centímetro. (Figuras 2 e 7). As proporções de ocupação do córtex pelos

espaços abertos pelo aerênquima observadas neste trabalho corroboram os dados produzidos por Leite (2013), que reportou a porcentagem de cerca de 19% de aerênquima no córtex no terceiro segmento de raiz, totalizando 40% quinto centímetro. O que foi observado neste e nos demais estudos que envolvem aerênquima em cana de açúcar (Tetsushi e Karim 2007; Begum et al. 2013) é que não ocorre indução a formação do mesmo por fatores ambientais (como ocorrem em raízes de milho), sendo um processo muito similar ao de formação do aerênquima em arroz, considerado constitutivo, isto é, faz parte do desenvolvimento da raiz (Webb e Armstrong 1983; Jackson et al. 1985).

Percepção do sinal e morte celular programada

Antes da formação do aerênquima, postula-se que inicialmente há uma sinalização via etileno para que, na sequência, ocorra um aumento citosólico de Ca^{2+} para acionar a PCD (Kawai et al. 1998; Morgan e Drew 2004). Proteínas responsivas a cálcio, requeridas para a sinalização, sofrem alterações conformacionais após interação com este íon, ativando as suas respectivas respostas à montante (Harmon et al. 2001, DeFalco et al. 2010) levando à ativação de toda a cascata de sinalização para PCD e consequente à formação do aerênquima. A partir dos dados de expressão gênica, foi observado um aumento no acúmulo de transcritos referentes a essas proteínas a partir do segmento 2 (Figura 11).

Dentre as proteínas cuja expressão foi quantificada, duas destas codificam para uma *calmodulin-binding protein* que apresentaram perfis opostos. Uma delas possui acúmulo de proteínas que se mantem constante entre os segmentos enquanto a outra apresenta redução ao longo dos segmentos. Transcritos referentes *calreticulin* aumentaram após o segmento 1, indicando que possa estar relacionado com as proteínas que permaneceram constantes ao longo dos segmentos, ou ainda devido a diminuição dessas proteínas há a sinalização para que haja a transcrição de novas proteínas (Figura 11). Quando se fala em transcritos, a sinalização é muito rápida e pode ser que muitas vezes seja até instantânea (*short-term*) para que mRNAs sejam ativados e transcritos, enquanto que para as proteínas o aumento de expressão é de longa duração

(*long-term*) (Buchanan et al. 2000) fazendo com que a correlação entre transcritos e proteínas seja de difícil análise. O relevante no caso das duas proteínas mencionadas acima, assim como a presença de outras proteínas como o *cytochrome b e c* e a *cathepsin B*, é que tanto os transcritos como as proteínas foram encontrados ao longo dos segmentos o que sugere que a sua presença esteja relacionada com o processo de morte celular programada (Figura 11 e Anexo 5).

Outro indicio de que esteja ocorrendo PCD é a fragmentação de DNA (Reed 2000; Gunawardena et al., 2001a) que pode ser inferido pela técnica de *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL). Esta técnica foi utilizada por Leite (2013) e confirmou a existência de PCD nos segmentos de raiz de cana de açúcar, que se inicia a partir do segmento 2, com um ligeiro aumento na quantidade até o 4º segmento. O aumento do número de transcritos referentes à proteínas ligantes à cálcio no segmento 2 corrobora a intensificação de PCD no mesmo segmento de raiz visto pela fragmentação dos núcleos. Além destes transcritos, dados do presente trabalho também sugerem um aumento da expressão de outras proteínas relacionadas à PCD a partir do segmento 2 (Figura 24 e Anexo 5), o que indica que parte dos módulos estão ocorrendo (Grandis et al. 2014). Outra evidência de PCD também obtida por Leite (2013) foi obtida através de análises por microscopia de transmissão, onde foi evidenciado o colapso das células, incluindo a degradação de organelas e desaparecimento do citoplasma nas regiões de aerênquima.

Assim, os dados obtidos no presente trabalho acrescentam mais uma dimensão que sugere fortemente que PCD ocorra ao mesmo tempo em que o aerênquima se forma em cana de açúcar. Uma série de proteínas que poderia estar também relacionada com a PCD durante a formação do aerênquima encontra-se no Anexo 5. Estas ainda terão que ser estudadas com maior profundidade a fim de verificar se há correlação ou não com PCD, mas pelo que se conhece da literatura (Kaufmann e Hengartner 2001, Ahsan et al. 2007, Swidzinski et al. 2004, Hashiguchi et al. 2009, Komatsu et al. 2009, Nanjo et al. 2010, Rahji et al. 2011) é provável que sim.

O processo de PCD ocorre em paralelo com modificações em pectinas, hemiceluloses e celulose, durante os módulos de separação celular, expansão e degradação de polissacarídeos. Porém, até o momento, em cana de açúcar não se sabia quais hidrolases de parede celular

poderiam estar relacionadas com o processo de modificação nas paredes celulares que, segundo Leite (2013) e Grandis et al., (2014) acaba gerando um compósito formado por parede modificada e que aparentemente dá sustentação às cavidades formadas pelo aerênquima nas raízes .

Glicosil hidrolases nas modificações da parede celular durante a formação do aerênquima

Apesar da maioria dos trabalhos tratar a formação de aerênquima lisígeno como um processo que leva à degradação completa da parede celular (Kawase 1974, 1979, Gunawardena et al. 2001b, Morgan e Drew 2004), os dados deste trabalho acoplados aos dados de microscopia de transmissão e anticorpos monoclonais para polissacarídeos de parede celular (Leite 2013) apontam para uma modificação da composição e da arquitetura da parede celular e não de uma completa degradação da parede. Em outras palavras, fica cada vez mais claro que as transformações na parede têm também a função de gerar uma estrutura física que deve exercer um papel biológico importante na condução de gases através dos espaços de ar encontrados no aerênquima.

Levando-se em conta as glicosil hidrolases de parede celular citadas nos trabalhos de Jackson e Armstrong (1999) (expansinas, celulasas, XTH e pectinases), a hipótese deste trabalho é de que haveria uma ordem de ataque das glicosil hidrolases à parede celular, no intuito de facilitar o acesso aos polissacarídeos. Esta sequência se iniciaria com a degradação de pectinas da lamela media. Dentre os trabalhos que suportam essa hipótese está o de Gunawardena et al. (2001b), que verificou a modificação de pectinas em uma fase muito precoce da morte celular em raízes de milho, assim como Leite (2013), que também observou que as pectinas presentes nas junções triangulares desapareciam ao longo da formação do aerênquima de cana. Neste contexto, foi observado que o padrão de expressão de genes que codificam para pectinases segue positivamente a formação do aerênquima. Este é o caso dos transcritos de endo-poligalacturonase e da β -galactosidase cujos acúmulos se iniciam a partir do segmento 2 e se eleva linearmente até o segmento 5 (Figuras 15 e 17).

Os dados referentes à atividade enzimática indicam também uma degradação inicial das pectinas que aumenta até o segmento 3 observado pelo aumento da atividade específica dos substratos: α -arapi, α -arf e β -gal. Essas atividades sugerem ataque a arabinanos e galactanos presentes nas pectinas (Figura 9). Na proteômica não foi observado um aumento de endopoligalacturanases ao longo dos segmentos que corroborasse a degradação de homogalacturonanos. Contudo, foi observada a presença pontual delas, que foram removidas da análise por causa das restrições adotadas. Por isto, as endopoligalacturonases são apenas listadas como proteínas totais encontradas nas raízes (Anexo 2).

Já os transcritos e proteínas referentes às enzimas responsáveis pela remoção de cadeias laterais das pectinas, como é o caso das β -galactosidases e a α -arabinofuranosidases (Tabela 4 e Figura 23), acumularam-se nos segmentos 2 e 4 e uma das proteínas de β -galactosidase aumenta linearmente a partir do segmento 2 (Figura 23). Foi identificada também uma tendência de acúmulo de transcritos e de proteínas ao longo dos segmentos de uma α -galactosidase e uma α -glucosidase, que podem estar envolvidas no processo de degradação de outros polissacarídeos de parede, como galactomananos e xiloglucanos respectivamente (Tabela 4). Observando o conjunto de dados que convergem para degradação de pectinas juntamente com dados de composição da parede (Leite 2013), é possível inferir que a degradação das pectinas está diretamente envolvida no processo de formação de aerênquima nas raízes de cana de açúcar, bem como na separação das células como proposto na teoria dos módulos (Grandis et al. 2014).

Por ser muito solúvel, o β -glucano é conhecido como um polissacarídeo de transição, sintetizado em tecidos em alongamento e que desaparece quando o alongamento celular diminui (Carpita 1996, Kim et al. 2000). Contudo existem controvérsias, já que o β -glucano pode ser depositado na parede contribuindo para o afrouxamento e permitindo a expansão celular (Buckeridge et al. 2004). Portanto, é possível que a retirada do β -glucano da parede celular durante a formação do aerênquima possa tornar a parede mais rígida e menos acessível a outras glicosil hidrolases. Isso é observado no perfil dos genes e de proteínas que evidenciam um maior nível de glicosil hidrolases que atacam esse polissacarídeo entre os segmentos 2 e 3 (Figuras 18 e 19 e

Tabela 4). Posteriormente à retirada do β -glucano (Leite 2013) a formação do aerênquima é concluída, sendo este polissacarídeo aquele cuja variação melhor se relaciona temporalmente com a formação do aerênquima.

O padrão de expressão de genes que codificam para β -1,3-glucanase (GH17) (Figura 18), como também pela presença de proteínas que correspondem às endo-1,3;1,4 β -glucanase elevada no segmento 2 (Tabela 4 e Figura 23) sugerem possível ataque ao β -calose e ao β -glucano na parede celular desses segmentos. Conforme observado por Leite (2013), no quinto segmento de raiz não foi verificada a presença de β -glucano. Visto que a família de GH17 contém enzimas distintas mas com uma estrutura de alta similaridade: β -1,3 glucanases e β -1,3;1,4 glucanases (Lashbrook et al. 1994), que sugere que estas possuem um ancestral comum. A β -1,3 glucanase é uma proteína abundante encontrada nas plantas superiores e é encontrada no desenvolvimento, fertilização, mobilização de reservas do endosperma, na divisão celular (Stone e Clarke 1992), como resposta ao ataque de patógenos (Bucher et al. 2001) e relacionada a degradação de calose (Worrall et al. 1992). Ainda alguns estudos sobre calose (um β -1,3 glucano) mostram a importância desse polissacarídeo na capacidade de transferência de substâncias intracelulares através dos plasmodesmos. Portanto, a degradação de calose pode ser um indício de que a comunicação entre as células formadoras do aerênquima esteja aumentando. De fato, genes que codificam para enzimas da classe GH17 têm sido demonstrado participar ativamente do processo de tráfego intercelular em *Arabidopsis* (Levy et al. 2007, Simpson et al. 2009).

A presença de proteínas relacionados às enzimas β -1,3;1,4 glucanases, encontradas também nos segmentos de raiz (Tabela 4 e Figuras 23) e que degradam o β -1,3;1,4 glucano durante o alongamento de tecidos vegetativos em gramináceas (Cosgrove 1999, Hoj e Fincher 1995), sugere que as enzimas produzidas possivelmente estão relacionadas a expansão celular das raízes. Sendo assim, devido a esses diversos processos nos quais a família GH17 parece participar, pode-se sugerir que os membros dessa família encontrados nos segmentos de cana de açúcar participem da formação do aerênquima.

Como a região da raiz em estudo compreende principalmente uma região meristemática (segmento 1), seguida de uma região em desenvolvimento, visto ainda pela presença de grande quantidade de β -glucanos e enzimas da família GH17, onde a formação dos tecidos ocorre concomitantemente com a formação do aerênquima lisígeno, foi observado um padrão semelhante de transcritos de celulose sintase nos 5 segmentos indicando que há parede ainda em formação (Figura 10). Outra evidência que corrobora esta hipótese é detecção de alta expressão de transcritos de expansinas no segmento 1 (Figura 14) e entre as proteínas a expansina é observada sendo constante entre os segmentos (Tabela 4). O padrão de expressão de genes que codificam para expansinas foi de acúmulo no primeiro segmento, decaindo no segundo e seguido de um aumento marcante do terceiro segmento em diante. As expansinas podem estar atuando, neste caso, no afrouxamento e na expansão da parede celular, etapa requerida para que haja o ataque de glicosil hidrolases à parede, e que é outra etapa da teoria de módulos (Grandis et al. 2014). Em outros processos, como o amadurecimento de frutos, tem sido observada a regulação positiva da expressão de genes de expansinas em resposta ao etileno, promovendo a extensibilidade da parede (Rose et al. 2000). Entretanto, nas raízes de cana de açúcar as oscilações nos níveis da proteína correspondente não foram estatisticamente significativas, evidenciando um possível descontinuidade entre os processos de expressão gênica e tradução (Figura 14 e Tabela 4).

A expressão de genes que codificam para XTH também foi observada ao longo dos segmentos, mostrando três padrões transcricionais. Dois transcritos de XTH acumularam-se mais marcadamente no segmento 1, possivelmente por esta ser uma região de intensa divisão, diferenciação e expansão celular. Outro transcrito referente também à XTH apresentou níveis constantes ao longo de todos os segmentos. Por último, foi avaliado o padrão transcricional de um gene que codifica para uma XTH com sequência primária com alta similaridade à identificada no trabalho de aerênquima em raízes de milho (Rajhi et al. 2011). Em cana de açúcar tal transcrito apresentou forte acúmulo do segmento 2 até o 5 (Figura 13), mas na análise proteômica não foi identificada nenhuma XTH, possivelmente pela dificuldade de extração dessa proteína.

As proteínas de XTH compõem o grupo de genes da subfamília GH16 de acordo com a classificação do CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes* - Cantarel et al., 2009) e apresentam uma grande diversidade de substratos específicos como membros de ligações β - 1,3 ou β -1,4 de vários glucanos e galactanos, porém bem distantes da família de celulasas GH7 (Michel et al. 2001, Eklof, 2010) e mais próximas das hidrolases de bactérias e fungos β -1,3;1,4-glucanos CRH (para *Congo Red Hypersensitive*) relacionados com quitina, β -1,6- e β -1,3-glucanos (Cabib et al. 2008). Devido a essa similaridade entre as famílias de proteínas, duas das endo 1,3;1,4 beta-glucanase foram observadas.

Leite (2013) observou aumento de deposição de xiloglucano e arabinoxilanos no córtex durante a formação do aerênquima, sugerindo o requerimento de enzimas como a XTH. Por outro lado, a quantidade de xiloglucano em cana-de-açúcar é relativamente baixa por se tratar de uma parede celular do tipo II (Carpita 1996, De Souza et al. 2013) dados apontam que gramíneas apresentam aproximadamente 5% de xiloglucano, enquanto que arabinoxilanos e β - glucanos são dominantes (Hoffman et al. 2005, Cavalier et al. 2008, Fincher 2009, Hsieh e Harris 2009). Assim, é possível especular que a quantidade de XTH necessária para remodelar este carboidrato seja igualmente baixa e daí o padrão de expressão gênica ser visível enquanto o de expressão de proteínas não o ser. Mais especificamente, é possível que os níveis de XTH sejam baixos o suficiente para não ultrapassar o limiar de detecção do espectrômetro, ou ainda não apresentar uma sequência de peptídeos que tenha identificação com o banco de dados e com as análises realizadas.

XTH e expansinas são conhecidas como proteínas associadas à expansão da parede celular em plantas (Rose et al. 2002, 2000). No caso da formação do aerênquima em cana verifica-se que a expansão celular ocorre inicialmente, já entre os segmentos 1 e 2, sendo possível que os padrões de expressão gênica e de proteínas observados estejam diretamente relacionados ao processo de expansão celular que, segundo Grandis et al. (2014) seria mais um dos módulos funcionais que antecede a formação do aerênquima em raízes de cana.

A parede de cana de açúcar possui em sua composição também arabinoxilanos, os quais ocorrem em maiores proporções em relação a todas as outras hemiceluloses (De Souza et al. 2013).

Sabe-se que diferenças na estrutura fina dos arabinoxilanos podem influenciar no modo de ação das enzimas (Buckeridge e De Souza, 2014), onde a redução de substituições com radicais acetil, ácidos ferúlicos, arabinose e ácido glucurônico diminuem a acessibilidade aos polissacarídeos além de requerer menor quantidade de enzimas para sua completa hidrólise (Mortimer *et al.* 2010). Sendo assim, possíveis modificações nas ramificações dos arabinoxilanos, sugeridas pela detecção de glicosil hidrolases específicas para estes polissacarídeos, podem estar diretamente correlacionados com a degradação de algumas ramificações e da mudança estrutural das paredes, contribuindo na formação no aerênquima das raízes de cana de açúcar. A presença de transcritos das xilosidases (Figura 23) e proteínas relacionadas à modificação/degradação como xilosidases e α -arabinofuranosidases da família GH3 (Tabela 4 e Figura 23) foram verificadas ao longo dos segmentos, com padrão de acúmulo a partir do segmento 2. Essas enzimas são capazes de hidrolisar tanto L-Ara and D-Xyl presentes tanto em hemiceluloses como pectinas, sendo consideradas como enzimas bifuncionais (Montes et al. 2008). Um aumento destas atividades enzimáticas foi observado principalmente no segmento 3, além do aumento de transcritos de β -xilosidase no segmento 2 (Figura 9). Já o transcrito de α -arabinofuranosidase acumula-se a partir do segmento 3 (Figura 16) coincidindo com pico de detecção da proteína (segmentos 3 e 4) e atividade enzimática (Figura 9) correspondentes.

Em conjunto esses dados apontam para a degradação e uma possível modificação do arabinoxilano presente na parede. Foi observado que há um aumento nos xilanos mais aderidos a parede ao longo dos segmentos, enquanto que alguns dos arabinoxilanos foram degradados (Leite 2013), o que corrobora os dados de transcrição, proteínas e atividade reportados neste trabalho. A presença de expressão de um provável inibidor de xilanases (GH18), cuja proteína expressa aumenta gradativamente ao longo dos segmentos em direção ao segmento 4 (Tabela 4, Figura 23) sugere que a atividade enzimática sobre arabinoxilanos possa ser controlada através da inibição dessas hidrolases.

No presente trabalho, o padrão de transcritos de celulase e de uma β -1,4-glucosidase evidenciaram acúmulo no segundo segmento, permanecendo constantes nos demais (Figura 19).

Contudo a celulose foi um dos componentes da parede cuja proporção mais aumentou ao longo dos segmentos, possivelmente não só pelo desenvolvimento do cilindro vascular, como também em razão da deposição de celulose ao redor do espaços de ar formados no tecido (Leite 2013). Na análise proteômica também foram identificadas glicosil hidrolases da família GH1 na qual estão inseridas as β -glucosidases (Tabela 4), que podem estar agindo no ataque à celulose na parede, como visto por Kawase (1974, 1979) em células corticais do estame de girassol tratadas com celulase. Contudo essas celulasas podem estar agindo apenas na modificação da parede, participando da formação de compósitos de parede celular contendo celulose, (Leite 2013). Isto contraria o que se esperava com base na literatura, onde a celulose é dita ser completamente degradada (Horton e Osborne 1967, Drew et al. 1979, Subbaiah e Sachs 2003). Em aerênquima de cana, a celulose pode estar sendo travada pela produção de lignina que impede o acesso a essas cadeias de glicose. Estas medidas não puderam ser feitas e portanto esta hipótese carece de verificação.

No entanto, foi observada a expressão de genes que codificam para lacases a partir do segmento 2, o que indica que pode ter havido modificações nas ligninas nos tecidos do córtex e também do cilindro vascular, possivelmente travando a parede em pontos específicos e impedindo a ação de outras glicosil hidrolases (Figura 12 e Anexo 2). Esta hipótese tem que ser considerada com parcimônia, uma vez que a função da lacase ainda não foi demonstrada claramente. Várias linhas de pesquisa sugerem o seu envolvimento na biossíntese de lignina, principalmente em estudos com lignificação em madeira. Outros baseiam-se na sua capacidade em oxidar precursores de lignina e a sua localização na parede celular durante a lignificação do xilema (Davin et al. 1992, Driouich et al. 1992, Sterjiades et al. 1992, Bao et al. 1993, McDougall e Morrison 1996, Ranocha et al. 2002). Contudo será necessário quantificar a lignina nos segmentos para verificar se o teor de lignina muda ao longo da raiz.

Visto que foram alteradas algumas das hemiceluloses pela expressão de transcritos e proteínas de parede e também houve aumento a expansão celular (Figuras 14 e 13, Tabela 4), observado microscopicamente por Leite (2013) e pela transcrição de XTH e expansinas observadas

neste trabalho, é possível especular que a teoria modular empregada para as hemiceluloses nos diferentes processos fisiológicos de modificações da parede das plantas se aplica para a formação de aerênquima lisígeno em cana de açúcar. Contudo os dados de aumento de celulase não resultam em degradação de celulose como é suposto que aconteça (Figura 19). O que parece haver é somente um rearranjo da celulose com o auxílio dessas enzimas, o que contribui para a formação um compósito de celulose junto aos xilanos e xiloglucano (Leite 2013). Este processo resulta na formação dos espaços de ar, que dividem as células vivas do córtex com as células que morreram para a formação do aerênquima (Figura 7).

Os dados deste trabalho mostram que as glicosil hidrolases são sintetizadas principalmente entre os segmentos 2 a 3. É relevante salientar que o aerênquima é resultado da remoção seletiva de grupos específicos de células do córtex, logo as glicosil hidrolases atacam apenas as células-alvo e são todas produzidas antes mesmo da formação completa do aerênquima. Isso pode ser resultado da composição da parede celular especificamente dessas células, que devem possuir polissacarídeos modificados que permitem o acesso dessas enzimas. Neste contexto, a fim de verificar a suscetibilidade das paredes (ao longo dos segmentos de raiz) ao ataque das glicosil hidrolases, foi realizado um experimento de sacarificação da biomassa dos segmentos de raiz.

Acessibilidade das glicosil hidrolases à arquitetura da parede celular dos segmentos de raiz

Com a finalidade de verificar a suscetibilidade da parede celular destes segmentos de raiz à ação das glicosil hidrolases estudadas neste trabalho, foram efetuados ensaios de sacarificação, utilizando coquetéis enzimáticos contendo diversas hidrolases. Estes foram aplicados à parede celular após pré-tratamentos com água quente e com álcali (Figura 25). Os resultados de sacarificação mostraram que o pré-tratamento com NaOH possibilita a hidrólise com maior facilidade do que o pré-tratamento com água quente. Diante da maior concentração de celulose nos segmentos 3, 4 e 5 (Leite 2013) foi possível obter uma maior sacarificação pela presença de maiores quantidades de glicose no material oriundo destes segmentos. A maior sacarificação com o

pré tratamento com o álcali se dá possivelmente devido ao maior acesso a parede celular obtido após a retirada de ésteres de acetila e ácido ferúlico (Silva 2005, Crivellari 2012, De Souza 2011, De Souza et al. 2013), o que aumenta o acesso das xilanases aos xilanos e assim abre caminho para a hidrólise da celulose e xiloglucano, principalmente do segmento 2 ao 4 (Figura 25).

Neste contexto, polissacarídeos e alguns carboidratos mais solúveis estão presentes principalmente nos primeiros segmentos das raízes de cana de açúcar (segmentos 1 e 2), o que faz com que o tratamento com água seja mais efetivo para verificar a sacarificação do que o tratamento com NaOH. Neste sentido, polissacarídeos de parede celular como as pectinas mais ramificadas e o β -glucano estão em maior quantidade nesses segmentos iniciais (Leite 2013). No segmento 1 essa proporção é maior por se tratar de uma região meristemática com alta taxa de divisão celular, necessitando de maior quantidade de sacarose livre para o desenvolvimento, visto pelo aumento da proteína invertase neste segmento (Tabela 4). Já no que diz respeito ao β -glucano, apesar de característico de paredes do tipo II como um polissacarídeo de transição (Carpita 1996, Kim et al. 2000), reforçamos a conclusão de Leite (2013) que a degradação deste polissacarídeo é concomitante com a formação do aerênquima. Este não é degradado no cilindro vascular e nas diferentes distâncias do ápice analisadas, inclusive onde os tecidos já estão completamente desenvolvidos.

Integrando os dados dos dois pré-tratamentos realizados é possível inferir o que pode estar ocorrendo entre as glicosil hidrolases estudadas com a composição da parede das raízes de cana. Ao solubilizar esses polissacarídeos em água (o que simula uma condição da planta *in vivo*) as hidrolases do coquetel têm maior acesso a parede e outros componentes nos segmentos 1 e 2 principalmente, reduzindo nos demais segmentos, pois o acesso aos polissacarídeos foi reduzido. Entretanto, quanto o acesso a esses polissacarídeos foi facilitado com o pré-tratamento de NaOH foi visto uma maior sacarificação nos segmentos que antes não eram acessíveis pelo método de água quente.

Todavia, quando o pré-tratamento é realizado com NaOH, que remove esses polissacarídeos mais solúveis durante o processo, é visto que nos segmentos 1 e 5 a sacarificação é

menor em relação aos segmentos 2, 3 e 4 (Figura 25). O decréscimo na sacarificação pode estar relacionado à maior concentração de pectinas fortemente aderidas a celulose e consequentemente a uma menor ação das enzimas nesse segmento, como visto em Lionetti et al. (2010). Estes autores observaram que a redução na concentração de certas pectinas da parede celular leva à maior sacarificação de biomassa de plantas transgênicas de *Arabidopsis* modificadas, devido ao fato dessas pectinas estarem bloqueando o acesso das glicosil hidrolases a outros polissacarídeos (Lionetti et al. 2010).

No segmento 5, a menor sacarificação pode estar relacionada à formação de um compósito de celulose e hemiceluloses (arabinoxilano e xiloglucano) (Leite 2013), que estaria influenciando no acesso da enzima à celulose. Já nos demais segmentos vimos que a sacarificação é maior, pois a partir do segmento 1 as pectinas passam a ser removidas do tecido (observado principalmente pela expressão gênica das pectinases, e por dados de composição da parede celular), dando espaço para as glicosil hidrolases agirem. Isso indica que as hipóteses sobre a existência de uma ação sequencial das enzimas (De Souza et al. 2012), e da consequente existência de módulos nos quais polissacarídeos específicos são atacados (Grandis et al. 2014) são possivelmente válidas para a formação do aerênquima em cana de açúcar, pois para ter acesso à celulose, arabinoxilano e xiloglucano a pectina e os β -glucanos precisam ser removidos.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar da maioria dos trabalhos tratar a formação de aerênquima lisígeno como degradação completa da parede celular (Kawase 1974, 1979, Gunawardena et al. 2001b, Morgan e Drew, 2004), os dados de glicosil hidrolases e proteínas relacionadas a PCD encontradas neste trabalho, acoplados aos dados de microscopia de transmissão e anticorpos monoclonais para polissacarídeos de parede celular (Leite 2013), apontam para uma modificação da composição e da arquitetura da parede celular e não de uma completa degradação da parede durante a formação do aerênquima lisígeno em raízes de cana de açúcar.

Neste trabalho foi observado que glicosil hidrolases são produzidas nas raízes de cana de açúcar e estas atacam a parede celular, degradando principalmente as pectinas, pelo aumento da expressão de pectinases, endo-poligalacturanases, β -galactosidases, α -arabinosidases, seguido da degradação de β -glucano pela expressão de transcritos e proteínas de β -1,3 glicosidases e β -1,4 glucosidases. Modificações na estrutura de xilanos, arabinoxilanos e celulose também são sugeridas devido ao fato do aumento das glicosil hidrolases: β -xilosidase, α -arabinosidases, XTH e celulasas ao longo dos segmentos de raiz.

Estes dados suportam a hipótese de que as plantas modificam a parede celular em diversas situações (como a formação de aerênquima) por seus próprios sistemas enzimáticos. O mesmo processo deve ocorrer para o aerênquima nas raízes onde os módulos são ativados endogenamente, resultando em alterações nas paredes (Grandis et al. 2014). Neste contexto, este trabalho vem contribuir com dados referentes às glicosil hidrolases produzidas pelas plantas, a fim de que, conhecendo quais hidrolases estão envolvidas nesses processos de modificação das paredes, seja possível utilizá-las biotecnologicamente.

Os dados de sacarificação apontam que modificações da arquitetura da parede impostas pelas plantas impedem o ataque de suas próprias glicosil hidrolases, dificultando o acesso a celulose. Barreiras como a recalcitrância da biomassa podem ser rompidas, no intuito de modificar a produção de determinadas glicosil hidrolases e também de implementar modificações nos polissacarídeos da parede, dando acesso aos açúcares fermentáveis que estão disponíveis na parede celular, utilizando o pré-tratamento biológico proposto por Grandis e colaboradores (2014), sem utilizar grandes quantidades de energia para executar pré-tratamentos industriais, que gera alto custo e grandes quantidades de efluentes indesejáveis do ponto de vista ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Lee KW, Bahk J, Lee BH. 2007. A proteomic screen and identification Waterlogging-regulated proteins in tomato roots. *Plant Soil* 295: 37–51.
- Alcântara PHN, Dietrich SMC, Buckeridge MS. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 653-663.
- Arber A. 1920. *Water Plants: A Study of Aquatic Angiosperms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Arikado H, Adachi Y. 1955. Anatomical and ecological responses of barley and some forage crops to the flooding treatment. *Bulletin Faculty Agriculture, Mie University* Tsu Mie 11: 1-29.
- Arikado H. 1954. Different responses of soybean plants to an excess of water with special reference to anatomical observations. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 23: 28–36.
- Armstrong W, Drew MC. 2002. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel Y, Eshel A and Kafkafi U, eds. *Plant roots: the hidden half*, 3rd edn. New York: Marcel Dekker, 729–761.
- Armstrong W. 1979. Aeration in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 7: 225–332.
- Bao W, O'Malley DM, Whetten R & Sederoff RR. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 636–638.
- Begum MK, Alam MR, Islam MS. 2013. Adaptive mechanisms of sugarcane genotypes under flood stress condition. *World Journal of Agricultural Sciences* 1: 056-064.
- Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJR. 2009. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols* 4: 484-494.
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ. 2003. Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. *Planta* 217: 382-391.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. Charper 18. Signal perception and transduction p. 931-936. American Society of Plant Physiologists. 1367p.
- Bucher GL, Tarina C, Heinlein M, Di Serio F, Meins Jr F, Iglesias VA. 2001. Local expression of enzymatically active class I beta-1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco, *Plant J.* 28: 361–369.
- Buckeridge MS, Rocha DC, Reid JSG, Dietrich SMC. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 86: 145–151.
- Buckeridge MS, Rayon C, Urbanowicz B, Tiné MAS, Carpita NC. 2004. Mixed Linkage (1→3),(1→4)- β -D-Glucans of grasses. *Cereal Chemistry* 81: 115–127.
- Buckeridge MS. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol* 154: 1–7.
- Bush DS. 1995. Calcium relulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of plant physiology and Plant molecular biology.* 103: 7-13.

- Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A & Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421–3432.
- Buckeridge MS, De Souza AP. 2014. Breaking the Glycomic Code of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. *BioEnergy Research*. DOI: 10.1007/s12155-014-9460-6.
- Cabib E, Farkas V, Kosik O, Blanco N, Arroyo J, McPhie P. 2008. Assembly of the yeast cell wall Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283: 29859–29872.
- Campbell R & Drew MC. 1983. Election microscopy of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to oxygen shortage. *Planta* 157: 350-357.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233–D238.
- Carpita NC, McCann MC. 2008. Maize and sorghum: genetic resources for the bioenergy grasses. *Trends Plant Science* 13: 415–420.
- Cavalari AA. 2009 Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica Papaya*). Tese de Doutorado em Biologia Vegetal - Universidade Estadual de Campinas.
- Cavalier DM, Lerouxel O, Neumetzler L, Yamauchi K, Reinecke A, Freshour G, Zabolina OA, Hahn MG, Burgert I, Pauly M, et al. 2008. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* 20: 1519–1537.
- Colmer TD. 2003. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots, *Plant Cell Environ.* 26: 17–36.
- Cosgrove DJ. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391–417.
- Cox J, Mann M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 26: 1367-72.
- Crivellari AC. 2012. Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar. Dissertação entregue a Universidade de São Paulo.
- Davin LB, Bedgar DL, Katayama T & Lewis NG. 1992. On the stereospecific synthesis of pinorensin in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry.* 31: 3869–3874.
- De Souza AP, Grandis A, Leite DCC, Buckeridge MS. 2013. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *BioEnergy Research* 7: 24-35.
- De Souza AP. 2011. Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida de CO₂. Tese de Doutorado pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 208p.
- De Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second generation bioethanol. *BioEnergy Research* 6: 564-579.
- DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA. 2010. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J* 425: 27–40

- Delong A, Calderon-Urrea A, Dellaporta SL. 1993. Sex determination gene TASSELSEED2 of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* 74: 757-768.
- Drew M. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:223-250.
- Drew MC, He CJ & Morgan PW. 1989. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen or phosphate starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 91:266-271.
- Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H & Jamet E. 2006. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls *Plant Methods*. p 2:10.
- Drew MC, He CJ, Morgan PW. 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*. 5: 124-127.
- Drew MC, Jackson MB, Giffard S. 1979. Ethylene-Promoted Adventitious Rooting and Development of Cortical Air Spaces (Aerenchyma) in Roots May Be Adaptive Responses to Flooding in *Zea mays* L. *Planta* 147: 83-88.
- Driouich A, Laine AC, Vian B, Faye L. 1992. Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J*. 2: 13–24.
- Eklof JM. 2010. Glycoside hydrolase family 16. CAZypedia. <http://www.cazypedia.org> (April 21, 2010)
- Evans DE. 2003. Aerenchyma formation. *New Phytologist*, 161: 35-49.
- Fagerstedt KW. 2010. Programmed Cell Death and Aerenchyma Formation Under Hypoxia. In: S. Mancuso and S. Shabala (eds.), *Waterlogging Signalling and Tolerance in Plants*, 99 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fan DF, MacLachlan GA. 1966. Control of cellulase activity by indoleacetic acid. *Can J Bot* 44: 1025-1034.
- Fincher GB. 2009. Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. *Plant Physiol* 149: 27–37
- Fortes F, Castilho RF, Catisti R, Carnieri EGS, Vercesi A. 2001. Ca²⁺ induces a cyclosporin A- insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 33: 43–51.
- Gilbert H. 2014. Developing Novel Enzyme Repertoires for the Efficient Deconstruction of Plant Biomass Tailored for the Bioenergy Industry. In: M. C. McCann et al. (eds.), *Plants and BioEnergy, Advances in Plant Biology* 4 p.197-209.
- Gómez LD, Whitehead C, Barakate A, Halpin C, McQueen-Mason SJ. 2010. Automated saccharification assay for determination of digestibility in plant materials. *Biotechnology for Biofuels*, 3-23. doi:10.1186/1754-6834-3-23.
- Gómez LM, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*. 178: 473–485.
- Grandis A, de Souza AP, Tavares EQP, Buckeridge MS. 2014. Using Natural Plant Cell Wall Degradation Mechanisms to Improve Second Generation Bioethanol. In: M. C. McCann et al. (eds.), *Plants and BioEnergy, Advances in Plant Biology* 4 p.211-230.

- Gunawardena A, Lan H, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR & Evans DE. 2001a. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214.
- Gunawardena A, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR & Evans DE. 2001b. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of Aerenchyma formation, aspatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant, Cell & Environment* 24: 1369-1375.
- Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF. 2001. The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol* 151: 175–183
- Hashiguchi A, Sakata K, Komatsu S. 2009. Proteome analysis of early-stage soybean seedlings under flooding stress. *J. Proteome Res.* 8: 2058–2069.
- He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1996a. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology* 112: 463-472.
- He CJ, Pinlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW. 1996b. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiol* 112: 1679-1685.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8(2):R19.
- Henry C M, Deacon JW. 1981. Natural (non-pathogenic) death of the cortex of wheat and barley seminal roots, as evidenced by nuclear staining with acridine orange. *Plant and Soil* 60: 255-274.
- Drew MC. 1979. Properties of roots which influence rates of absorption. In: *The Soil Root Interface* (Ed. by J. L. Harley & R. Scott Russell) pp. 21-38. Academic Press, London.
- Hoffman M, Jia ZH, Pena MJ, Cash M, Harper A, Blackburn AR, Darvill A, York WS. 2005. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydr Res* 340: 1826–1840.
- Hoj PB, Fincher GB. 1995. Molecular evolution of plant beta-glucan endo-hydrolases, *Plant J.* 7: 367–379.
- Horton RF, Osborne DJ. 1967. Senescence, abscission and cellulase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Nature* 214: 1086-1088.
- Hsieh YSY, Harris PJ. 2009. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. *Molecular Plant* 2: 943–965
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM. 2004. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 325-337.
- Jackson MB, Armstrong W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology* 1: 274–287.
- Jackson MB, Fenning TM, Jenkins W. 1985. Aerenchyma (gas-space) formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.) is not controlled by ethylene or small partial pressures of oxygen. *Journal of Experimental Botany* 36: 1566-1572.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.

- Justin SHFW, Armstrong W. 1991. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 118: 49-62.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11: 526– 534.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. 1998. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204: 277–287.
- Kawase M. 1974. Aerenchyma development is often associated with a radial enlargement of cortical cells. *Physiol Plant* 31: 29-38.
- Kawase M. 1979. Role of cellulase in aerenchyma development in sunflower. *Am J Bot* 66: 183-190.
- Keegstra K. 2010. Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, 154: 483–486.
- Kim JB, Olek AT, Carpita NC. 2000. Cell wall and membrane-associated exo-beta-D-glucanases from developing maize seedlings. *Plant Physiol* 123: 471–86.
- Komatsu S, Yamamoto R, Nanjo Y, Mikami Y, Yunokawa H, Sakata K. 2009. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *J. Proteome Res.* 8: 4766–4778.
- Kong FJ, Oyanagi A, Komatsu S. 2010. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1804: 124- 136.
- Konings H, Verschuren G. 1980. Formation of aerenchyma in roots of *Zea mays* in aerated solutions, and its relation to nutrient supply. *Physiologia Plantarum* 49: 265-270.
- Laan P, Clement J, Blom C. 1991. Growth and development of *Rumex* roots as affected by hypoxic and anoxic conditions. *Plant and Soil* 136:145-151.
- Laan P, Smolders A, Blom C, Armstrong W. 1989. The relative roles of internal aeration radial oxygen losses, iron exclusion and nutrient balance in flood tolerance of *Rumex*. *Acta Botanica Neerlandica species.* 38: 131-145.
- Lam E, Kato N, Lawton M. 2001. Programed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Lashbrook CC, Gonzalez-Bosch C, Bennett AB. 1994. Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers, *Plant Cell* 6: 1485–1493.
- Leite DCC. 2013. Modificações da parede celular durante a formação de aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. Tese de dissertação entregue a Universidade de São Paulo.
- Levy A, Erlanger M, Rosenthal M, Epel BL. 2007. A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in *Arabidopsis*. *The plant Journal*, 49: 669-682.
- Lima DU, Santos, HP, Tiné MA, Molle FD, Buckeridge MS. 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. *Genetics and Molecular Biology* 24: 191-198.
- Lionetti V, Francocci F, Ferrari S, Volpi C, Bellincampi D, Galletti R, D'Ovidio R, De Lorenzo G, Cervone F. 2010. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *PNAS.* 107: 616–621.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

- McDougall GJ, Morrison IM. 1996. Extraction and partial purification of cell wall-associated coniferyl alcohol oxidase from developing xylem of Sitka spruce. *Holzforschung*. 50: 549–553.
- Michel G, Chantalat L, Duee E, Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B, Dideberg O. 2001. The *k*-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases. *Structure* 9: 513–525
- Mittler R, Lam E. 1995. In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiology* 108:489-493.
- Mochizuki T, Takahashi U, Shimamura S, Fukuyama M. 2000. Secondary aerenchyma formation in hypocotyl in summer leguminous crops. *Jpn. J. Crop Sci.* 69: 69–73.
- Montes RAC, Ranocha P, Martinez Y, Minic Z, Jouanin L, Marquis M, Saulnier L, Fulton LM, Cobbett CS, Bitton F, Renou JP, Jauneau A, Goffner D. 2008. Cell Wall Modifications in Arabidopsis Plants with Altered α -L-Arabinofuranosidase Activity. *Plant Physiol* 147: 63–77.
- Morgan PW, Drew, MC. 2004. Plant Cell Death and cell differentiation. In: *Plant Cell Death Processes*, Elsevier, INC. p.19-36.
- Mortimer JC, Miles GP, Brown DM, Zhang Z, Segura MP, Weimar T, Yu X, Seffen KA, Stephens E, Turner SR, Dupree P. 2010. Absence of branches from xylan in Arabidopsis gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *PNAS* 107: 17409–14.
- Nanjo Y, Skultety, L, Ashraf Y, Komatsu S. 2010. Comparative proteomic analysis of early-stage soybean seedlings responses to flooding by using gel and gel-free techniques. *J. Proteome Res.* 9: 3989–4002.
- Nelson CJ, Li L, Millar AH. 2014. Quantitative analysis of protein turnover in plants. *Proteomics* 14: 579–592.
- Nishiuchi S, Yamauchi T, Takahashi H, Kotula L, Nakazono M. 2012. Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice* 5, 2.
- Pauly M, Keegstra K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54(4):559-68.
- Pennell RI, Lamb C. 1997. Programed cell death in plants. *Plant Cell* 9:1157-1168.
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Hallet JP, Leak DJ, Liotta CL, et al. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484–489.
- Rahji I, Yamauchi T, Takahashi H, Nishiuchi S, Shiono K, Watanabe R, Mliki A, Nagamura Y, Tsutsumi N, Nishizawa NK, Nakazono M. 2011. Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *New Phytol* 190: 351–368
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. et al. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6: 427-448.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM & Goffner D. 2002. Laccase Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and Cell Wall Structure in Poplar. *Plant Physiol.* 129: 145–155.
- Reed JC. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J. Pathol.* 157: 1415–1430.

- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43: 1421–1435.
- Rose JKC, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG & Bennett AB. 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol.* 123: 1583-1592.
- Saab IN, Sachs MM. 1996. A flooding-induced xyloglucan endotransglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiol.* 112: 385-391.
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF. 1999. Communication with calcium. *The plant Cell.* 11: 691-706.
- Saraswati R, Matoh T, Sekiya J. 1992. Nitrogen fixation of *Sesbania rostrata*: contribution of stem nodules to nitrogen acquisition. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 775–780.
- Schussler EE, Borkhsenius ON, Longstreth DJ. 1997. Formation of root aerenchyma involves cell death in *Sagittaria lancifolia*. *Plant Physiol* 14: 456-456.
- Seago JL Jr, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubova O, Enstone DE. 2005. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Annals of Botany* 96: 565–579.
- Selvendran RR, O’Neil MA. 1987. Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods Biochem. Anal.* 32:25-153.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols* 6: 2856- 2860.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Silva AM. 2005. Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária). 2005. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas. 105p.
- Simpson C, Thomas C, Findlay K, Bayer E, Maule AJ. 2009. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *The Plant Cell*, 21: 581-594.
- Smith J. Muldoon E. & Lampion D. 1984. Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. *Phytochemistry.* 23:1233–1239.
- Socol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge MS, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 101: 4820-4825.
- Sterjiades R, Dean JFD, Eriksson KEL. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol.* 99: 1162–1168.
- Stone BA, Clarke AE. 1992. Chemistry and biology of (1,3)-beta-glucans, La Trobe University Press, Victoria, Australia.
- Subbaiah CC, Sachs MM. 2003. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Annals of Botany.* 90:119-127.
- Swidzinski, JA, Leaver, CJ, Sweetlove, LJ. 2004. A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 65: 1829-1838.

- Tetsushi H, Karim A. 2007. Flooding Tolerance of Sugarcane in Relation to Growth. *South Pacific Studies* 28, n1.
- Trewavas AJ, Malho R. 1998. Ca²⁺ signalling in plant cells: The big network! *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 428–433.
- Trought MCT, Drew MC. 1980. The development of waterlogging damage in young wheat plants in anaerobic solution cultures. *Journal of Experimental Botany* 31: 1573-1580.
- Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Arruda P. 2001. The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.* vol.24 no.1-4.
- Vidal BC. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: micro espectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22: 45-64.
- Virolainen E, Blokhina O, Fagerstedt KV. 2002. Ca²⁺ induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum*L.) mitochondria under anoxic stress. *Annals of Botany* 90:509–516.
- Visser EJW, Bögemann GM. 2006. Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytologist* 171:305-314.
- Visser EJW, Voeseek LACJ, Vartapetian BB, Jackson MB. 2003. Flooding and plant growth. *Annals of Botany* 91: 107–109.
- Walker BA, Pate JS, Kuo J. 1983. Nitrogen fixation by nodulated roots of *Viminaria juncea* (Schrad, & Wendl.) Hoffmans. (Fabaceae) when submerged in water. *Aust. J. Plant Physiol.* 10, 409–421.
- Webb J, Armstrong W. 1983. The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *J Exp Bot* 34: 579-603.
- Wingren A, Galbe M, Zacchi G. 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress* 19: 1109–1117.
- Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco, *Plant Cell* 4: 759–771.
- Yuki-yoshi K, Karahara I. 2014. Role of ethylene signalling in the formation of constitutive aerenchyma in primary roots of rice. *AoB Plants*. 24;6. pii: plu043. doi: 10.1093/aobpla/plu043.
- Voigt J. 1985. Extraction by lithium chloride of hydroxyproline-rich glycoproteins from intact cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 164:379–389.

ANEXOS

Anexo 1. Oligonucleotídeos específicos das enzimas hidrolíticas de parede celular de raízes de cana de açúcar e suas respectivas especificações para a construção (T_m = temperatura de melting, Esses iniciadores foram selecionados para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real e foram sintetizados pela Invitrogen®).

Sigla do Iniciador	SAS	Enzima correspondente	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	T _m forward	tm reverse
alfa gal1	SCEQRT2025H02.g	alfa galactosidase	TGTACCGGCATTGCATCCTG	AACCGGCGAGGTGGTACAAA	57.9	59.3
alfa gal2	SCQSRT2034G08.g	alfa galactosidase	TCCCCATTACACAGCGAGA	ACACGGACATGCAGCCAAAA	58.6	58
alfa xil1	SCJLRT1020A08.g	alfa xilosidase	GCTCGACGTGTTGACCAGT	GGTGGAACCCGAAGACCAG	59.7	58.1
Arabin	SCQSRT1034D03.g	Arabinosidase	GGAACGCTGCTACCTTGGA	GGCCAAGACGCGAACTGTCT	59.7	60.2
beta xil1	SCCART1002G03.g	beta xilosidase	GCCACGGCATCACAATCAGA	ACGTACCAGCCGCTTCAA	58.1	59.5
beta glc1	SCCART1002A11.g	beta glicosidase	CTCACTTCCAGCCGTGAC	TGTGCTGTGTTGTTGCTTGA	60.1	58.1
beta glc2	SCCART1005G04.g	beta glicosidase	ACGCCATGGGTGTTCTGACA	ACGTTGACCCCTCGTTGACAGC	59.4	59.9
beta glc3	SCCART2004C04.g	beta glicosidase	GAGCGCGTCGAAGAGGTTCT	CAGCTTCTCGCAGGGCTACA	59.6	59.6
beta glc5	SCJLRT1020A08.g	beta glicosidase	CGACCTCCGCTACTCCATCA	CCCTTGCGAAGCGGTAGAAC	58.6	58.3
beta glc6	SCJLRT1023E06.g	beta glicosidase	CGAAGTGCCTCTCCGTCTCA	TCGTGACACCTTCGTCTCC	58.9	58.8
beta glc7	SCVPRT2073A02.g	beta glicosidase	CCTGCTAGCTTGGGGAGAG	AGTACCATTGGAGGCCAAG	60	59.7
B13glc1	SCCART2004A03.g	beta 1 3 glicanase	GGACGCGATCGAGAACTCT	ACCATCGCGTCGAAGAGGTT	59	58.9
B13glc2	SCEQRT1026E05.g	beta 1 3 glicanase	GAATGCCACCGCCAGGTAGT	CAGGGGACGAGACGGAGAAG	60	59.3
B13glc3	SCEQRT2028C06.g	beta 1 3 glicanase	TGGAGTGCATCGCGTAGTC	CCGGCTGGTTGGTAGTTGGT	59.5	60
B13glc4	SCJLRT1020F11.g	beta 1 3 glicanase	CAGGCGTACCCTCCGTCTC	ACACCGACGTCGTACCTTG	59.8	59.8
B13glc5	SCCART1002F03.g	beta 1 3 glicanase	ACCACACGTACGCCATCTG	CGTCGTCCACGAAGAAGGTG	59.8	58
cel1	SCEQRT1024F11.g	Celulase	GAGTTCCGCCACAAGTACCG	GAGGAGCTCGTCGTGGTAGC	58.1	59.7
cel2	SCEQRT2028C06.g	Celulase	GATCAGGCTCCAGCAGCA	CTGGAGCAAGCGTGGACTT	59.6	60.2
cel3	SCJLRT1023A03.g	Celulase	GCCGAAACCAACACGTAGC	TGGTACTGCGGCCAAACTT	59.2	59.7
cel4	SCJFRT1005B11.g	Celulase	GGGAGGAGCGTGTGGGTATG	GCAGCTCTGCCATTGTTGA	60.1	58.4
celsint1	SCQGR1045D11.g	celulose sintase	TCCGCCGATTGCTGTCTAT	GGGGTGGTCCACAGTTGAA	58.7	59.8
celsint2	SCQGR1044A07.g	celulose sintase	GTCCACATGACCAGCGATGC	TCTTGGGCTGGGAGTTGTC	58.9	59.4
exp1	SCJFRT2055E11.b	Expansina	GCCGACGCCACGACTAATA	GGTGCGCAACCAAGTCATCC	60.1	58.7
exp2	SCMCRT2107D08.g	Expansina	GCTGACGGTGACCTTCACA	CGTCGCGTCTCTGACTCC	59.8	60
exp3	SCQSRT1034D12.g	Expansina	GCACGCCGCTCTCAACAAT	GGAGTTTGGCGGGCAGAAAT	59	58.5
exp4	SCQSRT1036C01.g	Expansina	GTTGGCGTACTCCACCAGCA	CGGGGGCTCACTGCACTT	60.1	59.9
exp5	SCVPRT2075H10.g	Expansina	CCGGGGAGGCAGTACTTGAG	GATCTGGGGAGCACGGCTA	59.8	59.3
exp6	SCRURT2011A12.g	Expansina	CTGCGGCCAGTGCTACAAGA	AAGTTGGTGGCGGTGATGGT	60.1	59.7
exp7	SCVPRT2077B02.g	Expansina	CAGCGTCCCTTCTCGTCGAT	CACATCCCTTGCTCCCTTG	59.2	58.3
Fucosil	SCEQRT1031G07.g	Fucosiltransferase	CCTCTTCTGCGGGAACATC	TCTTCTGCGACGAGGACCAG	57.9	58.9
Bgal1	SCCART1002C07.g	Betagalactosidase	CGTTTATCGCCACGACTAC	TCCTCAGGTGACCCATTT	58.5	58.4
Bgal2	SCEPRT2044F09.g	Betagalactosidase	CGGCCCTCGAAGTCGACTG	CCGGCTCCATCCACTATCCA	59.9	58.9
gal1	SCEQRT2025H02.g	Galactosidase	GGCGTCATATGCTGGACCTG	GGTCATGCCACCATTCCTA	58.2	57.8
gal2	SCQSRT2034G08.g	Galactosidase	ATGAGTGCGCCCATAGGTCA	GGCCACTCAGCAACAACAGG	58.8	59.1

Continuação Anexo 1.

número Iniciador	SAS	Enzima	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Tm forward	tm reverse
lich1	SCCART2004C04.g	Lichenase	CGCGTCGAAGAGGTTCTGGT	TCAGCTACGCGCTCTTCACG	59.6	59.8
lich2	SCEQRT1026E05.g	Lichenase	TGGCTGGGAGGATCTTCTGC	AACCTGGACGCGCTCATCTC	59.4	59.8
lich3	SCJLRT1023E06.g	Lichenase	AGCGCGTCGAAGAGGTTCTG	CCGCTGCTCTGCAACGTCTA	59.8	59.9
lich4	SCJLRT1020F11.g	Lichenase	CCGTCTCCTCCGCTACGTG	CCGACGTCGTCACCTTGATG	59.9	58.1
Man	SCJLRT1020C03.g	Mananases	AATCCCGCTCAGGAGTGGAC	AATCCCGCTCAGGAGTGGAC	59.3	59.7
pec ac 1	SCQGAM1045B09.g	pectina acetil esterase	TCCCCAGAACGAGGTGAAA	CTCCTGGCACAAAATGTTCTT	58.4	58
pec ac2	SCJLFL3013D11.g	pectina acetil esterase	CCGTATCCCTGCAACCCAACT	GGCGAGGTGTGATCCCTCATT	59.6	59.4
pec1	SCAGRT2038D08.g	pectina methyl esterase	GCACCAAGCTCCTCCCTGAA	GCCGGGTTACCACTTCCAGA	59.8	59.4
pec2	SCJFRZ2027H04.g	pectina methyl esterase	GCGTCAAGTGGCACCTCAG	CCGTCGAGGCAGGTGTTCT	59	59.7
pec3	SCQSLB1052E07.g	pectina methyl esterase	AACGCGCTCTCCCTCTACGA	ACGAACGAGAACCCCGTGTC	60.5	59.6
poli1	SCEZRT2016H09.g	Poligalacturonase	CAGCAACGATGTGCAGGTCA	CGTCCCGGACTCGATGGATA	58.3	58.3
poli2	SCEPFL3083G08.g	Poligalacturonase	GTTGCCGGTCATCCAGAAC	GCGGCTTTGTGAGGGACATT	57.8	58.4
xth1	SCEQRT3C03E06.g	XTH	GACCCACCAAGGACTTCCA	CTGATCGGCATCTCGTCCAC	59.3	57.8
xth2	SCEQRT2101A02.g	XTH	CAACTCCACGCGCAAGTACC	GACGTCAGGTAGAAAGGAGTGACA	58.9	59.7
xth3	SCQSRT2034B07.g	XTH	CTTCTACCTGTGCTCGCAGAACTC	GTCCGGTTGCCAGGAACT	58.9	60.2
Feruloil	SCCCLB1004H01.g	feruloil esterase	CCGGGGCTACTACGGGAAC	GAGGACGGAAGCCCATCAG	60	57.9
lac1	SCACSB1039F01.g	Lacase	TGGCCATGGCAATCTCTCT	CGTGTCACGTTCCCATTTGT	59.9	58.5
lac2	SCACSB1123H10.g	Lacase	CGGCTGCTCCTTCTCTCTC	CCTCTCACCGGCGTCTCTT	59.7	59.3
lac3	SCCCSD1090D07.g	Lacase	GGTGGAATGCAGACGTGGAG	GGCTGGCCGTTAATGGTGTT	58.3	58.5
Ilaxyl	SCJLRT1020A08.g	Alfa xilosidase	GAGCTCTGCAGTCGCTGGAT	CACCAGCTCCCACAGGTACA	59.6	59.2
Il man	SCJLRT1020C03.g	Mananase	ACAACAGGCAAGGCCCTAA	TGGTGGTGCAGAAGCTTGAAA	59.4	57.4
Ilbglu13a	SCEQRT1026E05.g	Beta glicosidase	GACTCCCCCTCCCTCTCCAT	GCAGAGCTCGACGACAGTGAA	60.4	59.3
Ilb13gluB	SCEQRT2028C06.g	Beta glicosidase	ATGGTGCGCTGCCAGATTTA	GCTTCGCCTTCTCCATTCCA	57,4	57.7
Ilb13gluC	SCJLRT1020F11.g	Beta glicosidase	CTCCTCGGGGCTTTGCATC	TGCCGTTGCAGTTGTGCAT	57.9	57.7
Ilxet	SCBGLR1023F11.g	XTH	CGCTGCACAGAGAGGAGGA	GCCACCACCACCACCATTC	59.3	59.2
Ilcel	SCUTFL1057D12.g	Celulase	GTAGGCGAGCGAGGAGAGGA	AGGACGAAGGCGACGAAGAG	60.6	59.1

Anexo 2. Total de proteínas (1082) encontradas nas raízes de cana. Numeros de peptídeos e de proteínas bem como o peso molecular e o tamanho das sequencias encontradas a partir da busca no banco de dados do Sucest. Montagem realizada pelo software Maxquant.

	Sucest	nome proteina	espécie	N proteínas	Peptídeos	Peso mol.	Tamanho sequencia
1	SCRLB2031B03.g	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase		4	1	15.2	165
2	SCJFRT1058F10.g	(P41345) Ferredoxin-NADP reductase, root isozyme		6	4	15.486	148
3	SCCCLR1C05H04.g	(Q00351) Xyl3 precursor		4	6	34.528	319
4	SCCCTR1002B11.g	(Q40007) Putative 32.7 kDa jasmonate-induced protein		1	4	59.853	517
5	SCRFRL1012E03.g	(Q42553) Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase II		1	2	45.249	408
6	SCCCR2001A01.g	10 kDa chaperonin OS	Arabidopsis thaliana	1	2	11.932	108
7	SCMCLR1125D12.g	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	Gallus gallus	2	2	46.615	434
8	SCRLAM1013H08.g	Elongation factor Tu GTP-binding domain protein 2		2	4	12.793	115
9	SCEPAM2055H02.g	13S globulin seed storage protein 1 OS	Fagopyrum esculentum	1	3	39.045	353
10	SCEQRT1028B06.g	14 kDa proline-rich protein DC2.15 OS	Daucus carota	2	4	27.926	248
11	SCCCL4011G09.g	14-3-3 protein		1	2	23.346	213
12	SCCCLR1022D05.g	14-3-3-like protein GF14-6 OS	Zea mays	3	3	15.676	142
13	SCRUFL1017E10.b	14-3-3-like protein GF14-6 OS	Zea mays	3	13	36.235	334
14	SCCCR21001D02.g	14-3-3-like protein GF14-C OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	5	23.82	219
15	SCCCLR1048F12.g	14-3-3-like protein GF14-D OS	Oryza sativa subsp. japonica	4	5	17.704	166
16	SCCCLR1C01F03.g	14.5 kDa translational inhibitor protein (p14.5)		1	2	24.994	222
17	SCCCL3001G11.b	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase		6	5	11.991	104
18	SCCCLR1065G03.g	26S protease regulatory subunit 7 OS	Oryza sativa subsp. japonica	6	1	16.582	150
19	SCCCL4006C07.g	26S protease regulatory subunit 8 homolog A OS	Arabidopsis thaliana	1	5	19.32	174
20	SCEQRT1025A07.g	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS	Mus musculus GN	1	2	20.429	199
21	SCCCR21004C09.g	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13		1	1	9.3192	88
22	SCCCLR1048F08.g	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	Zea mays	1	3	26.317	251
23	SCEZRT1015F05.g	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS	Rattus norvegicus GN	1	7	30.035	279
24	SCCCLR1072B10.g	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6		1	2	19.858	180
25	SCCCLR1065E09.g	3-dehydroquinate synthase OS		1	1	16.793	169
26	SCCCL3080E11.g	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase-like protein 3 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	27.583	254
27	SCSGLR1045F04.g	3-isopropylmalate dehydrogenase		3	3	18.583	166
28	SCEQLR1007G01.g	3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase OS	Taxus canadensis	3	1	12.487	122
29	SCJFRZ1005C03.g	3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase OS	Taxus canadensis	18	5	15.268	136
30	SCRLAD1101G08.g	4-coumarate-CoA ligase		1	3	38.516	363
31	SCACLR1126F04.g	40S ribosomal protein S10 OS	Oryza sativa subsp. japonica	24	12	11.409	103
32	SCCCLR2C01F11.g	40S ribosomal protein S10 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	1	21.989	204
33	SCAGLR1021C06.g	40S ribosomal protein S11		2	2	34.56	306
34	SCCCLR1C01C07.g	40S ribosomal protein S12		1	8	63.751	582
35	SCCCLR1024D10.g	40S ribosomal protein S13		1	3	21.315	194
36	SCCCLR1C03A02.g	40S ribosomal protein S14 OS	Zea mays	2	28	41.434	364
37	SCCCLR2C02A08.g	40S ribosomal protein S15		2	2	45.146	404
38	SCCCR22C01G03.g	40S ribosomal protein S15a-1 OS	Arabidopsis thaliana	5	6	17.69	159
39	SCCCLR2002A05.g	40S ribosomal protein S16		1	10	46.311	419
40	SCCCR22002C12.g	40S ribosomal protein S18 OS	Arabidopsis thaliana	2	11	36.979	337
41	SCCCLR1001H01.g	40S ribosomal protein S18		1	2	65.428	587
42	SCVPLB1020B05.g	40S ribosomal protein S19 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	7	29.259	274
43	SCCCLR2001F07.g	40S ribosomal protein S20 OS	Oryza sativa subsp. japonica	4	17	68.464	621
44	SCCCL3080D07.g	40S ribosomal protein S20		2	11	55.669	503
45	SCACLR2007B02.g	40S ribosomal protein S23 (S12)		2	30	102.2	906
46	SCAGLR2018G06.g	40S ribosomal protein S24-1 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	18.366	175
47	SCJLLR1054C12.g	40S ribosomal protein S24-1 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	26.48	245
48	SCCCLR2C02E06.g	40S ribosomal protein S26 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	4	79.857	717
49	SCCCLR1C07D10.g	40S ribosomal protein S28 OS	Zea mays	1	4	51.497	493
50	SCCCL3001F09.g	40S ribosomal protein S3-3 OS	Arabidopsis thaliana	2	8	33.047	299
51	SCBGLR1047A12.g	40S ribosomal protein S3a OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	24.173	222
52	SCCCL3080E05.g	40S ribosomal protein S4		7	7	16.832	149
53	SCVPRZ2036B07.g	40S ribosomal protein S4		1	2	16.767	150
54	SCEZLB1009E10.g	40S ribosomal protein S6 OS	Asparagus officinalis	1	2	23.566	203
55	SCCCR22002D10.g	40S ribosomal protein S8		10	6	20.554	180
56	SCSGLR1045A06.g	40S ribosomal protein SA (p40)		3	6	32.379	298
57	SCCST1001H07.g	40S ribosomal protein SA OS	Vitis vinifera	3	1	15.915	141
58	SCAGLR1064H08.g	41 kDa chloroplast nucleoid DNA binding protein (CND41)		1	11	49.394	435
59	SCCCR22C03A09.g	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine	Catharanthus roseus	2	3	41.938	386
60	SCCCL4015F02.g	Vitamin-B12-independent methionine synthase isozyme		4	8	23.863	208
61	SCCCL3140E08.g	5-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase		2	2	18.511	178
62	SCCCT1003G09.g	6-phosphofructokinase		2	4	20.29	184
63	SCQSLR1040E09.g	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS	Synechococcus elongatus	1	4	50.516	463
64	SCJFRZ1005F06.g	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRL synthase)		1	1	19.91	189
65	SCACLR1036B11.g	60S acidic ribosomal protein P0 OS	Zea mays	1	1	15.488	147
66	SCCCHR1003C05.g	60S acidic ribosomal protein P2A OS	Zea mays	1	2	55.37	517
67	SCEQSD2074C06.g	60S acidic ribosomal protein P3 OS	Zea mays	1	4	17.373	157
68	SCEPRZ1010E07.g	60S ribosomal protein L10-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	19.833	189
69	SCCCLR1C05G05.g	60S ribosomal protein L10a-1 OS	Arabidopsis thaliana	2	5	10.77	98
70	SCSGLR1045F12.g	60S ribosomal protein L11 60S ribosomal protein L11		1	11	50.563	447
71	SCCCLR1C01C09.g	60S ribosomal protein L12-1		1	10	56.205	518
72	SCCCL3003G05.b	60S ribosomal protein L13-2 (Cold-induced protein C24B)		1	13	28.968	256
73	SCRFRL1012C07.g	60S ribosomal protein L13a-4		3	8	43.013	384
74	SCBGLR1120F10.g	60S ribosomal protein L17 OS	Zea mays	1	3	107.52	967
75	SCBFLR1046F11.g	60S ribosomal protein L18-3 OS	Arabidopsis thaliana	4	3	17.253	151
76	SCJFLR1013D01.g	60S ribosomal protein L18a		2	2	36.136	331
77	SCQGLR2025D05.g	60S ribosomal protein L18a		2	4	21.254	188
78	SCUTLR1058F06.g	60S ribosomal protein L18a		1	2	61.964	546
79	SCVPLB1019D09.g	60S ribosomal protein L19-1 (Protein EMBRYO DEFECTIVE		1	7	55.66	500
80	SCVPLR2027H04.g	60S ribosomal protein L2 (L8) (Ribosomal protein TL2)		1	3	19.423	175
81	SCCCLR1C02E07.g	60S ribosomal protein L22-2		1	1	33.135	324
82	SCUTLR1037D09.g	60S ribosomal protein L24 OS	Hordeum vulgare	2	2	13.375	122

Continuação Anexo 2.

83	SCCCLR2C01D05.g	60S ribosomal protein L26-1		1	9	48.891	427
84	SCBGLR1023G09.g	60S ribosomal protein L27-3 OS	Arabidopsis thaliana	2	1	41.925	381
85	SCCCLR1C05C08.g	60S ribosomal protein L27-3 OS	Arabidopsis thaliana	5	3	20.648	194
86	SCCCLR2003G02.g	60S ribosomal protein L3		3	4	25.262	224
87	SCUTLR2023C08.g	60S ribosomal protein L30 OS	Zea mays	2	7	67.393	611
88	SCAGLR2033B10.g	60S ribosomal protein L31		2	8	41.154	386
89	SCCCLR1C07F11.g	60S ribosomal protein L32-1		1	2	60.127	547
90	SCCCRZ2004F07.g	60S ribosomal protein L34 OS	Nicotiana tabacum	1	1	32.082	291
91	SCCCRZ2C01A11.g	60S ribosomal protein L34		1	1	20.489	197
92	SCBFLR1039F03.g	60S ribosomal protein L35a-3 OS	Arabidopsis thaliana	4	2	10.737	93
93	SCCCRZ2002C01.g	60S ribosomal protein L37a		1	1	14.54	131
94	SCCCLR2C02C11.g	60S ribosomal protein L38		2	2	13.579	127
95	SCCCRZ1001C08.g	60S ribosomal protein L4-1 (L1)		3	2	9.6229	86
96	SCEQLR1091D05.g	60S ribosomal protein L5-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	20.207	181
97	SCUTLR1037F12.g	60S ribosomal protein L5-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	35.924	321
98	SCCCLR1048A09.g	60S ribosomal protein L5		1	2	17.093	158
99	SCCCCL3080C04.g	60S ribosomal protein L6-3		3	4	24.77	219
100	SCEQLB1063E01.g	60S ribosomal protein L6-3		1	1	34.39	314
101	SCCCLR2004C07.g	60S ribosomal protein L7-4 OS	Arabidopsis thaliana	17	5	15.406	136
102	SCCCRZ2001H04.g	60S ribosomal protein L7A		2	3	20.62	195
103	SCVPLR1028C12.g	60S ribosomal protein L7A		3	1	20.581	182
104	SCCCLR1069A12.g	60S ribosomal protein L9 OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	3	25.583	250
105	SCVPCL6046C02.g	ABC transporter		1	3	23.999	226
106	SCRFLR1012H05.g	Actin-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	5	37.08	339
107	SCEZLR1009B09.g	Actin-1		1	1	13.573	131
108	SCQSLR1018C05.g	Actin-2 Actin-2		1	3	108.84	963
109	SCCCRZ1001E09.g	Actin-7 OS	Arabidopsis thaliana	3	7	44.222	407
110	SCCCLR1069D05.g	Actin-7		2	5	25.885	240
111	SCBGLR1095G03.g	Actin-depolymerizing factor 3 OS	Zea mays	3	2	20.06	179
112	SCACLR1057G08.g	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1		1	3	42.633	381
113	SCQGRZ3013E03.g	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, chloroplastic OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	20.505	196
114	SCAGRT2037F12.g	Acyl-CoA-binding protein OS	Ricinus communis	1	2	66.597	605
115	SCEQRT1031B11.g	Acyl-coenzyme A oxidase 3, peroxisomal OS	Arabidopsis thaliana	1	6	17.52	156
116	SCACLR1057G05.g	Acyl-coenzyme A oxidase 4, peroxisomal OS	Arabidopsis thaliana	1	3	69.168	631
117	SCCCLB1004H08.g	Adenosine kinase 2 OS	Arabidopsis thaliana	4	4	33.719	298
118	SCCCLR1C04E01.g	Adenosylhomocysteinase		1	4	26.377	238
119	SCCCLR1024H08.g	Adenylate kinase B OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	2	19.71	176
120	SCCCCL4007F09.g	adenylosuccinate lyase		4	2	16.91	149
121	SCCCLR1024H05.g	ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial OS	Zea mays	1	6	23.18	211
122	SCQGLR1019A07.g	ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial OS	Zea mays	3	6	14.28	133
123	SCJFFL3C06D10.b	Agmatine deiminase OS	Arabidopsis thaliana	2	4	22.966	211
124	SCCCTR1002C05.g	Alanine aminotransferase 2 OS	Panicum miliaceum	1	1	24.89	240
125	SCCCLR1024G01.g	Alanyl-tRNA synthetase		1	3	42.057	408
126	SCEPRZ1008B12.g	Alba-like protein C9orf23 homolog		4	2	26.825	237
127	SCCCRZ2001F10.g	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B7	Arabidopsis thaliana	1	3	23.211	226
128	SCRUAD1134G06.g	Aldose 1-epimerase; Galactose mutarotase; Type-1		1	1	24.992	248
129	SCCCLR2004B02.g	Aldose reductase OS	Hordeum vulgare	1	1	8.6121	79
130	SCRLLR1038C12.g	Allene oxide cyclase 3, chloroplastic OS	Arabidopsis thaliana	1	2	26.132	251
131	SCAGLR1043E04.g	Allene oxide synthase 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	4	22.504	206
132	SCCCCL6004H11.g	Alpha-amylase type A isozyme OS	Hordeum vulgare	1	1	26.566	230
133	SCEQRT2025H02.g	Alpha-galactosidase		1	3	20.589	205
134	SCQSLR2034G08.g	Alpha-galactosidase		1	5	18.056	173
135	SCUTLR1037C07.g	Alpha-galactosidase		2	3	38.318	346
136	SCQSLR1034D03.g	Alpha-L-arabinofuranosidase		1	3	59.313	516
137	SCACLR1036F01.g	Alpha-L-fucosidase 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	23.795	226
138	SCBFLR1083E01.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)		1	6	77.596	723
139	SCBGLR1003C11.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)		1	3	23.024	216
140	SCJFRZ3C01G05.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)		1	3	92.321	887
141	SCJLRT1020C03.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)		1	9	50.996	467
142	SCMCLL6051E03.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)		1	4	104.56	962
143	SCCCRZ2002F09.g	Alpha-soluble NSF attachment protein OS	Solanum tuberosum	4	5	45.72	427
144	SCRFFL5039E01.g	Alpha-xylosidase OS	Arabidopsis thaliana	2	5	32.855	302
145	SCCCRZ1003D03.g	Aminoacylase-1 (N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase)		2	3	36.806	337
146	SCQGLR2032D01.g	Aminoacylase-1 (N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase)		5	15	120.63	1110
147	SCCCRZ2003A07.g	Aminopeptidase M		1	4	64.22	558
148	SCJFRT2059E04.g	Aminopeptidase M		2	10	103.87	948
149	SCJLLR1054G06.g	Aminopeptidase N; Alpha-aminoacylpeptide hydrolase		3	16	65.994	598
150	SCCCTR1002H01.g	Aminosugars metabolism		2	3	64.121	585
151	SCEZLB1008B10.g	Aminosugars metabolism		8	9	96.119	873
152	SCEZLB1009H05.g	Aminosugars metabolism		7	14	49.687	451
153	SCJFRZ2015D10.g	Aminosugars metabolism		1	4	16.866	177
154	SCCCRZ1C02F12.g	Annexin		3	5	75.297	689
155	SCCCRZ2004A11.g	Annexin		3	7	27.666	245
156	SCSST3098G08.g	Annexin		2	4	67.457	633
157	SCEQLR1007C02.g	AP-1 complex subunit beta-1;		1	1	55.257	499
158	SCAGLR1043B02.g	AP-2 complex subunit mu; Mu2-adaptin;		7	8	32.635	291
159	SCAGLR2033E03.g	aquaporin	Saccharum officinarum	4	32	111.32	980
160	SCQGLR1041H04.g	Aquaporin PIP2-1 OS	Zea mays	1	7	42.167	388
161	SCCCLR1024C03.g	Aquaporin TIP1-1 OS	Zea mays	3	3	21.183	191
162	SCJFRT1010C08.g	Aquaporin TIP2-1 (Tonoplast intrinsic protein 2-1)		1	11	23.729	217
163	SCBGR1052E01.g	Aquaporin TIP2-3; Tonoplast intrinsic protein 2-3;		2	4	29.424	276
164	SCEPCL6023H11.g	ARC (armadillo/beta-catenin repeat family protein)		1	3	85.202	782
165	SCEPRZ1009G01.g	Arf		5	3	30.587	279
166	SCCCCL3004C10.b	Aspartate aminotransferase; AsPAT; Transaminase A		1	7	38.487	372
167	SCRLLR3042B09.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1 OS	Nepenthes gracilis	1	5	39.626	372

Continuação Anexo 2.

168	SCBGLR1120C11.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1; Nepenthesin-I;		3	2	22.206	200
169	SCQGSB1083B11.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1; Nepenthesin-I;		1	1	66.291	595
170	SCVPRZ2038B09.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1; Nepenthesin-I;		1	4	85.913	792
171	SCAGHR1018H09.g	Aspartic proteinase nepenthesin-2 OS	Nepenthes gracilis	1	10	41.73	400
172	SCQSRZ3038G01.g	Aspartic proteinase nepenthesin-2 OS	Nepenthes gracilis	1	2	26.99	252
173	SCRFLR2038B01.g	Aspartic proteinase nepenthesin-2; Nepenthesin-II;		1	10	68.461	629
174	SCVPLR1049D04.g	Aspartic proteinase nepenthesin-2; Nepenthesin-II;		2	4	74.789	684
175	SCCCRZ2002H06.g	Aspartic proteinase oryzasin 1 precursor (EC 3.4.23.-)		1	6	60.508	554
176	SCJFRZ2027C07.g	Aspartic proteinase precursor (EC 3.4.23.-)		1	6	59.769	544
177	SCJFRT2057C03.g	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS	Schizosaccharomyces pombe	13	12	49.276	447
178	SCRLLR1038E12.g	ATP phosphoribosyl transferase 1		2	6	47.578	439
179	SCACSB1038B04.g	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial ATP		5	12	49.768	456
180	SCCCLB1004B02.g	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial		2	4	101.58	908
181	SCCCRZ2001D06.g	ATP synthase subunit beta, mitochondrial;		1	10	25.314	228
182	SCVPRT2077G09.g	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	1	2	23.208	206
183	SCUTLR1015G10.g	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	Solanum lycopersicum	4	8	29.854	264
184	SCVPLR2027A11.g	Auxin-induced in root cultures protein 12;		2	2	41.035	380
185	SCRFLR1012D12.g	auxin		29	6	21.83	191
186	SCCCCL3003D11.b	B2 protein		2	15	49.745	462
187	SCCCCL4015F12.g	Basic 7S globulin; SBg7S		2	3	24.396	214
188	SCQSRZ2031A09.g	benzothiadiazole-induced protein-like	Oryza sativa Japonica Group	2	3	39.696	356
189	SCILRT1022G03.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		3	13	35.498	334
190	SCCCRZ2004A03.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		2	19	45.097	419
191	SCEQRT1025C10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	2	25.549	223
192	SCEQRT1026E05.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		5	4	28.887	266
193	SCEZHR1088G11.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	8	36.915	334
194	SCJFRT1008G05.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	1	54.096	471
195	SCQSRZ2031D12.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		2	5	68.701	621
196	SCRFAM2071E02.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		2	3	33.642	301
197	SCRFLR1055B07.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	7	65.202	581
198	SCRURT2006B10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	2	79.89	734
199	SCVPAM1059E12.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17		1	4	43.409	408
200	SCUTAM2089E05.g	beta-amylase	Zea mays	1	2	41.119	388
201	SCCCST3006A04.g	Beta-fructofuranosidase 1 OS	Zea mays	2	3	29.327	263
202	SCCCCL4001H11.g	Beta-galactosidase		2	16	110.68	1003
203	SCCCCL6004H07.g	Beta-galactosidase		2	3	59.127	535
204	SCEPRT2044F09.g	Beta-galactosidase		1	2	70.254	627
205	SCACLR2007C03.g	Beta-like / RACK (Receptor for activated C-kinase)		1	5	41.314	366
206	SCEZRT2017A05.g	Beta-ureidopropionase OS	Dictyostelium discoideum	2	6	30.965	285
207	SCQSRZ1035F11.g	Beta-ureidopropionase OS	Dictyostelium discoideum	2	8	46.003	437
208	SCCCCL4009F05.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)		1	2	53.886	481
209	SCQSAM1030G04.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)		2	3	23.626	206
210	SCCCRZ1C01F02.g	Bicarbonate (HCO3-) transporter (HCO3_ cotransp)		1	11	72.504	660
211	SCEQRT1028H06.g	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	6	50.767	464
212	SCACSB1035G04.g	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4B OS	Nicotiana tabacum	1	6	56.118	502
213	SCCCLR1075F03.g	Bifunctional purple acid phosphatase 26 OS	Arabidopsis thaliana	1	2	61.814	558
214	SCEQLR1091F02.g	Bifunctional purple acid phosphatase 26 OS	Arabidopsis thaliana	2	3	48.005	442
215	SCCCRT1004C05.g	Blue copper protein OS	Pisum sativum	3	5	47.92	444
216	SCAGLR2018C03.g	Blue copper protein;		1	4	33.476	309
217	SCJFRT2055C03.g	Blue copper protein;		1	3	113.11	1028
218	SCAGLB2046F01.g	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor		1	3	60.4	535
219	SCEPLR1051F11.g	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein		1	2	94.955	840
220	SCRFLR1012F12.g	caffeic acid 3-O-methyltransferase		1	5	35.169	323
221	SCCCLR1069B09.g	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase		3	9	126.2	1150
222	SCJFRZ2010H06.g	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase		1	13	72.85	673
223	SCJFRZ2025A01.g	Calcium-dependent protein kinase 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	35.391	324
224	SCEPRZ1009A12.g	calcium-related		4	7	25.044	224
225	SCRULR1020G01.g	Calcium/calmodulin-dependent serine/threonine-protein	Oryza sativa subsp. japonica	7	10	64.782	601
226	SCILHR1028B09.g	Calmodulin OS	Hordeum vulgare	1	3	52.13	504
227	SCCCCL2001B01.b	calmodulin-binding protein		3	8	29.808	272
228	SCCCCL3001F05.g	calmodulin-binding protein		2	13	68.825	632
229	SCVPLR1049C09.g	calmodulin-binding protein		2	5	39.861	380
230	SCCCLR1070F12.g	calnexin		4	3	29.915	280
231	SCMCST1051F07.g	Calreticulin OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	2	18.938	167
232	SCSGST1072D03.g	Calreticulin OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	13	44.418	400
233	SCSBRZ3125A08.g	Calreticulin-3 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	31.415	285
234	SCACLR1036E03.g	calreticulin		1	1	65.064	600
235	SCEPLR1051D05.g	calreticulin		1	27	92.895	843
236	SCCCLR1C02F11.g	Carbon fixation		3	4	35.155	344
237	SCCCRZ1001B08.g	Carbon fixation		3	21	54.514	485
238	SCCCRZ1002E05.g	Carbon fixation		4	7	50.201	429
239	SCQSLR1090G03.g	Carbon fixation		1	4	8.2513	69
240	SCRLSB1044F02.g	Carbon fixation		1	1	20.504	198
241	SCCCLB1C03G10.g	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase		2	8	47.836	438
242	SCCCLR1001E08.g	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase		1	2	24.532	220
243	SCCCCL4017C03.g	casein kinase		1	7	54.838	510
244	SCCCRZ2002F06.g	Casein kinases		2	4	20.069	183
245	SCEPRZ1009H01.g	Catalase isozyme 1 OS	Zea mays	1	4	40.212	357
246	SCCCLR1048H09.g	Catalase isozyme 3 OS	Zea mays	1	2	27.536	260
247	SCCCLR1023F09.g	Cathepsin B (Fragment)		2	1	21.721	204
248	SCCCRZ2C04F03.g	Cation efflux family (Cation_efflux)		1	1	42.37	393
249	SCCCRZ1003A10.g	Cell division control protein 48 homolog E OS	Arabidopsis thaliana	2	2	25.479	229
250	SCCCLR1076E03.g	Cell elongation protein DIMINUTO OS	Arabidopsis thaliana	2	2	12.365	116
251	SCCCCL5071D07.g	cell wall invertase		1	6	45.622	414
252	SCCCRT2002B02.g	cell wall invertase		1	3	39.87	350

Continuação Anexo 2.

253	SCSGSB1008E01.g	cell wall invertase		1	3	14.492	137
254	SCVPRT3086D06.g	cell wall invertase		2	3	36.301	332
255	SCACAD1035F09.g	Cellulose synthase (CesA)		1	1	23.592	221
256	SCSGHR1071F01.g	Cellulose synthase (CesA)		3	3	14.446	130
257	SCCLLR1C03G09.g	chalcone isomerase A		2	14	61.388	554
258	SCEPAM1053F09.g	Chalcone--flavonone isomerase 2 OS	Chrysanthemum morifolium	6	2	12.235	119
259	SCMCAM2080D01.b	Chalcone--flavonone isomerase OS	Gentiana triflora	1	3	36.362	337
260	SCVPRT2078D02.g	Chaperonin CPN60-1, mitochondrial OS	Zea mays	1	9	39.663	362
261	SCCRZ1003A03.g	chaperonin		2	3	68.171	617
262	SCRFHR1006G03.g	Chemocyanin precursor (Basic blue protein) (Plantacyanin)		3	6	15.392	134
263	SCFRZ3055F03.g	Chemocyanin precursor (Basic blue protein) (Plantacyanin)		3	4	18.07	175
264	SCQGR3044B10.g	Chitinase 2 OS	Tulipa bakeri	2	4	20.969	189
265	SCEQLB1067D10.g	chitinase		1	17	40.502	372
266	SCJLRT1020F06.g	chitinase		1	11	30.79	277
267	SCQSRT1036B10.g	chitinase		3	2	26.191	246
268	SCSBFL4014A04.g	Choline transporter-like protein 2 OS	Dictyostelium discoideum GN	3	2	14.419	135
269	SCFRZ2025G05.g	chorismate mutase		4	10	121.56	1091
270	SCCLLR1C06B07.g	Chorismate synthase 1, chloroplast precursor (EC 4.2.3.5)		1	10	41.809	384
271	SCCCCL5004D04.g	Cinnamoyl CoA reductase (CCR)		1	3	69.455	640
272	SCCCCL2001A05.b	Citrate cycle (TCA cycle)		2	8	37.166	326
273	SCCCCL3001B09.b	Citrate cycle (TCA cycle)		1	12	38.389	351
274	SCCCCL4004G06.g	Citrate cycle (TCA cycle)		1	2	44.493	392
275	SCCCCL7C03F06.g	Citrate cycle (TCA cycle)		2	5	39.348	342
276	SCCLLR1022D04.g	Citrate cycle (TCA cycle)		2	3	52.226	465
277	SCCLLR1024D12.g	Citrate cycle (TCA cycle)		1	9	44.634	416
278	SCCLLR1C06C11.g	Citrate cycle (TCA cycle)		1	1	23.038	212
279	SCEZRZ1012A01.g	Citrate cycle (TCA cycle)		1	23	101.66	893
280	SCJLRZ1024A01.g	Citrate cycle (TCA cycle)		6	3	29.456	270
281	SCUTLR1058B04.g	Citrate cycle (TCA cycle)		1	11	40.634	366
282	SCVPLR2012F11.g	Citrate cycle (TCA cycle)		6	6	16.213	145
283	SCCCCL3001C03.g	Citrate synthase 4, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	20	6	16.288	157
284	SCCCCL3003F11.b	Citrate synthase, glyoxysomal; GCS;		2	5	22.842	204
285	SCCRZ2002F04.g	Clathrin heavy chain		3	8	40.164	368
286	SCFRZ2011F04.g	Coatomer subunit beta-2; Beta-coat protein 2; Beta-COP 2		1	1	38.209	347
287	SCBFLR1026E07.g	Coatomer subunit gamma-2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	14	43.381	401
288	SCQGLR1041H02.g	Copper methylamine oxidase; Primary amine oxidase		1	2	33.149	317
289	SCMCRT2103A12.g	Cortical cell-delineating protein OS	Zea mays	1	1	48.806	449
290	SCAGLB1070B12.g	Crooked neck-like protein 1; Crooked neck homolog; hCrn		1	12	26.396	232
291	SCEQRT1025E03.g	Cystatin-1 precursor (Cystatin I) (Corn kernel cysteine proteinase inhibitor)		1	6	24.535	210
292	SCCLLR1022B11.g	cysteine protease 1 precursor [Zea mays](NCBI)		3	3	17.008	146
293	SCCRZ2001D03.g	Cysteine proteinase 2 OS	Zea mays	2	6	54.373	507
294	SCCRZ3002G10.g	Cysteine proteinase inhibitor 8 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	6	50.331	464
295	SCMCRT2087B02.g	Cysteine proteinase inhibitor 8; Oryzacystatin-8; Oryzacystatin VIII; OC-VIII;		1	1	46.198	435
296	SCCCCL4C01F09.g	Cytochrome b-c1 complex subunit 6;		3	16	43.966	391
297	SCCLLR1001H04.g	Cytochrome b-c1 complex subunit 7;		1	7	61.876	567
298	SCUTST3087D11.g	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;		1	13	48.538	444
299	SCQGLR2025G04.g	Cytochrome b5		1	5	66.459	607
300	SCUTLR2023F06.g	Cytochrome c OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	1	26.214	254
301	SCCCLR1080A05.g	Cytochrome c oxidase subunit 6B OS	Schizosaccharomyces pombe	1	2	66.134	620
302	SCUTLR1058A12.g	Cytochrome c1-1, heme protein, mitochondrial;		3	16	42.299	395
303	SCQSRT1036G12.g	Cytochrome P450 704C1 OS	Pinus taeda	2	1	43.588	383
304	SCEQRT1026G11.g	Cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1) (Leucine aminopeptidase)		2	5	17.187	151
305	SCJFST1011D09.g	DAG protein, chloroplastic;		2	9	48.487	452
306	SCCCLR1024D04.g	DCN1-like protein 2;		1	2	69.223	655
307	SCEZLR1031B12.g	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 27		1	7	56.528	514
308	SCCCCL7C03C05.g	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1,	Arabidopsis thaliana	5	3	19.103	186
309	SCRFRL1012G11.g	development		1	3	47.699	458
310	SCAGRT2041G07.g	dihydropolipoamide S-acetyltransferase		2	5	108.15	988
311	SCCCCL4011F04.g	Dihydropolypoilsine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex		1	1	53.566	475
312	SCJFRZ2013A05.g	Dipeptidyl peptidase family member 6 OS	Caenorhabditis elegans	2	1	16.584	175
313	SCCLLR1003G10.g	dirigent-like protein		2	6	50.31	461
314	SCCCRT3002G10.g	dirigent-like protein		2	9	56.736	509
315	SCEQRT1027C01.g	dirigent-like protein		6	3	21.868	199
316	SCEQRT2028C09.g	dirigent-like protein		1	9	29.622	273
317	SCUTAD1032E08.g	dirigent-like protein		2	8	74.46	680
318	SCJLRT1021D04.g	dirigent-like protein		1	9	42.387	374
319	SCJLRT3078H06.g	dirigent-like protein		2	12	38.467	358
320	SCQGR3045E03.g	dirigent-like protein		3	16	48.708	431
321	SCRURT3064D10.g	dirigent-like protein		1	1	29.433	268
322	SCSGRT2065E10.g	DNA catabolism		1	2	46.455	425
323	SCAGLR1064G04.g	DNA repair		1	1	40.696	375
324	SCCRZ1002B09.g	DnaJ-related protein ZMDJ1		2	23	51.635	475
325	SCEQRT2027H04.g	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit		1	2	34.056	307
326	SCAGLR1043C02.g	drought and cold response		2	8	28.916	263
327	SCCCCL4006G06.g	Drought and cold response		3	9	29.342	266
328	SCJFLR1013A09.g	drought and cold response		1	1	86.018	765
329	SCQGLR1062E12.g	drought and cold response		3	23	60.307	549
330	SCCCRT1002E04.g	Dynamin-2A OS	Arabidopsis thaliana	1	4	59.825	533
331	SCVPLC6064A09.g	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 1		1	8	27.951	253
332	SCRFRL1034C04.g	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1		2	5	56.481	493

Continuação Anexo 2.

333	SCCCCL3003A04.b	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2 OS	Arabidopsis thaliana	1	2	32.386	298
334	SCCCRZ1004D08.g	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2; RING domain ligase 2		1	1	27.532	253
335	SCCCCL3004F01.b	Elongation factor 1-alpha OS	Zea mays	2	4	49.017	457
336	SCEQLR1050G05.g	Elongation factor 1-beta OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	45.76	416
337	SCQSST1040E11.g	Elongation factor 1-beta OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	5	84.91	773
338	SCCCLR1048B12.g	Elongation factor 1-gamma 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	2	22.949	206
339	SCEQLR1050E07.g	Elongation factor 1-gamma 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	50.844	456
340	SCSBFL1107A09.g	Elongation factor 1-gamma 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	5	41.526	385
341	SCCCLR1072F05.g	Elongation factor 2 OS	Beta vulgaris	1	4	28.115	244
342	SCCCLR2C01H02.g	Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase OS	Zea mays	1	5	48.072	437
343	SCVPRT2081E09.g	Endo-1,3(4)-beta-glucanase 1		1	1	35.822	331
344	SCUTLR2030G02.g	endo-1,4-beta-glucanase Glycosyl hydrolase family 9		1	12	20.057	181
345	SCCCCL3005G07.b	Endoplasmin homolog OS	Arabidopsis thaliana	4	11	35.989	347
346	SCCCLR1068D10.g	Endoplasmin homolog; GRP94 homolog;		2	4	39.081	366
347	SCJFLR1073H09.g	enolase 1 [Zea mays](NCBI)		2	2	40.047	377
348	SCCCRZ1002F06.g	Enolase 2 OS	Zea mays	2	12	93.12	810
349	SCCCLR1070G05.g	Enolase-phosphatase E1 (		3	3	28.17	257
350	SCCCCL7C01H04.g	Epoxide hydrolase 2 OS	Homo sapiens	5	4	38.214	348
351	SCCCLR1072D09.g	Epsilon-COP		9	10	46.067	420
352	SCUTLR2023A03.g	Esterase precursor (Early nodule-specific protein homolog)		1	4	37.577	330
353	SCRFLR1055F03.g	ETO1-like protein 1; Ethylene overproducer 1-like protein		2	4	57.237	527
354	SCCCLR1072G07.g	Eukaryotic initiation factor 4A-3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	27.679	248
355	SCRFLR1012B11.g	Eukaryotic initiation factor iso-4F subunit p82-34 OS	Triticum aestivum	2	9	70.283	629
356	SCCCCL4005C02.g	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS	Rattus norvegicus	1	10	61.449	559
357	SCCCCL6005C02.g	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha OS	Schizosaccharomyces pombe	1	4	53.117	501
358	SCQGLR1019B10.g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9		10	14	47.085	436
359	SCSGAD1006A07.g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS	Xenopus tropicalis	2	3	45.655	402
360	SCSFAM1075C08.g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS	Arabidopsis thaliana	1	2	37.435	338
361	SCCCLR1C10C03.g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J		4	12	61.595	568
362	SCCCLR1001G08.g	Eukaryotic translation initiation factor 5 OS	Zea mays	5	35	93.883	843
363	SCSBFL5022C12.g	Eukaryotic translation initiation factor 5A OS	Zea mays	5	16	46.719	411
364	SCCCLR1070E06.g	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1/2 (eIF-5A 1/2)		1	5	21.504	195
365	SCACL1022D02.g	exoglucanase		1	2	72.762	666
366	SCJLRT1018C07.g	Exosome complex exonuclease RRP42		12	4	22.52	203
367	SCCCCL3120E05.g	Expansin		4	11	75.779	659
368	SCCCCL4006H09.g	Expansin		1	2	27.807	250
369	SCCCLR1065A10.g	Expansin		2	9	62.706	582
370	SCEPRT2043B01.g	Expansin		2	3	71.144	619
371	SCSGLV1004F11.g	Expansin		2	3	21.12	195
372	SCJLRZ1019F12.g	Expansin		1	2	45.433	411
373	SCQGAM2029E05.g	Exportin-4; Exp4		1	9	41.327	380
374	SCCCCL4007A08.g	F-box/LRR-repeat protein 15		1	5	36.128	333
375	SCCCLR1072G10.g	F24J8.10 protein		1	1	32.218	303
376	SCVPRZ2036H04.g	Farnesyl pyrophosphate synthetase		1	14	48.104	454
377	SCEPLR1030C10.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein 16;		1	4	23.81	227
378	SCCCCL7001H04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		1	13	46.848	435
379	SCEPLR1051B04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		4	3	10.243	92
380	SCQGR1040D08.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		2	6	34.545	320
381	SCQSLR1040G04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		1	6	59.01	549
382	SCRFLR1034D04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		1	5	68.999	626
383	SCVPRZ2036F10.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein		3	10	51.792	472
384	SCEQRT1028D11.g	Fatty acid oxidation complex subunit alpha;		7	11	45.965	417
385	SCCCRZ2C01H04.g	Ferritin-1, chloroplastic OS	Zea mays	1	3	35.912	327
386	SCSFHR1046G01.g	FK506-binding protein 2-1 precursor (EC 5.2.1.8)		5	4	17.584	165
387	SCVPRT2081D11.g	Flavoprotein wrbA (Trp repressor-binding protein)		1	5	30.533	284
388	SCEZRZ1012E05.g	Formamidase OS	Methylophilus methylotrophus G	1	1	28.275	271
389	SCJLRZ1021E10.g	Fructokinase-2 OS	Zea mays	3	5	58.472	522
390	SCRFLR1012E06.g	Fructokinase		4	4	22.65	210
391	SCCCCL4011H08.g	Fructose and Mannose Metabolism		2	6	32.021	297
392	SCCCLR1048B08.g	Fructose and Mannose Metabolism		1	6	16.837	158
393	SCPRZ1009B12.g	Fructose and Mannose Metabolism		4	8	93.492	843
394	SCJLFL3019C04.g	Fructose and Mannose Metabolism		1	2	50.778	462
395	SCCCCL3120C03.g	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	2	17.434	154
396	SCCCRZ2001F03.g	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme OS	Zea mays	1	2	47.131	444
397	SCSGRT2066A01.g	fumarylacetoacetase		3	1	12.955	128
398	SCVPLC6043F04.g	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein	Dictyostelium discoideum	2	21	61.099	559
399	SCRLLB2031A09.g	FUS-interacting serine-arginine-rich protein 1		2	5	24.333	204
400	SCCCRZ1001D04.g	Galactose metabolism		1	21	46.031	412
401	SCEQRT1026G06.g	Galactose metabolism		1	5	23.475	206
402	SCCCAM2C06F04.g	Galactosyltransferase		2	1	15.728	133
403	SCCCLR1C07B06.g	Gamma-glutamyl hydrolase		2	7	24.564	216
404	SCQGLR2025D03.g	gamma-glutamylcysteine synthetase1		2	18	36.063	336
405	SCJFRT1012G05.g	Gamma-glutamyltranspeptidase 1 OS	Schizosaccharomyces pombe	1	4	12.5	111
406	SCBFRZ2018D11.g	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase OS	Homo sapiens	1	5	41.807	370
407	SCQSRT3055D04.g	GDSL esterase/lipase 5 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	56.595	526
408	SCCCCL7001H09.g	GDSL esterase/lipase At5g45910 OS	Arabidopsis thaliana	1	20	65.953	608
409	SCCCRZ1002D12.g	GDSL esterase/lipase At5g45910 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	42.553	385
410	SCVPRT2083D11.g	Germin-like protein 8-13 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	87.178	801
411	SCCCRT1C01G07.g	Germin-like protein 8-5 OS	Oryza sativa subsp. japonica	5	3	29.727	263
412	SCJFRT1058A06.g	Germin-like protein subfamily T member 1 precursor		1	1	24.741	223
413	SCJLRT2050A02.g	GLABRA2 expression modulator		2	6	35.794	326
414	SCCCLR1024G12.g	Glucosidase 2 subunit beta precursor		6	10	56.837	514
415	SCCCLR2C03C10.g	glucosyltransferase		1	3	39.003	348
416	SCJFRZ2007H09.g	Glutamate decarboxylase 1 OS	Arabidopsis thaliana	2	27	42.603	385
417	SCCCCL3080H03.g	Glutamate dehydrogenase OS	Zea mays	1	1	43.336	381

Continuação Anexo 2.

418	SCJFLR1013F02.g	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1		2	3	41.236	368
419	SCCCRT1004H06.g	Glutaredoxin		1	2	18.487	167
420	SCCCRT1003F01.g	Glutathione reductase, cytosolic; GRase; GR		1	3	29.49	264
421	SCAGFL1089C03.g	Glutathione S-transferase 1 OS	Zea mays	1	4	18.394	172
422	SCCCLR1001A07.g	Glutathione S-transferase 3 OS	Zea mays	2	10	23.394	209
423	SCJLRT1021D09.g	Glutathione S-transferase 4 OS	Zea mays	2	7	134.3	1232
424	SCOSLB1049C04.g	Glutathione S-transferase 6, chloroplast precursor		1	4	22.672	208
425	SCCCCL3002A02.b	Glutathione S-transferase DHAR1, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	2	2	51.264	468
426	SCVPLR2012H12.g	glutathione S-transferase GST 12		2	6	16.72	148
427	SCJLST1027D09.g	Glutathione S-transferase; GST class-phi		1	3	15.09	134
428	SCACLR2014B06.g	glutathione S-transferase		1	8	45.1	405
429	SCCCCL3002C09.b	glutathione S-transferase		3	4	64.073	568
430	SCCCLR1072B04.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	Zea mays	1	9	49.54	435
431	SCBFRZ2050G03.g	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	Flaveria pubescens	1	1	17.609	156
432	SCCCLR1022F10.g	glycine metabolism		3	3	72.373	673
433	SCCCRZ1004F05.g	glycolysis		2	15	33.856	295
434	SCEPRZ3047F05.g	glycolysis		3	7	30.668	286
435	SCCCLR1001E06.g	Glycolysis/Gluconeogenesis		2	3	18.334	171
436	SCCCLR1079B06.g	Glycolysis/Gluconeogenesis		1	3	68.512	606
437	SCCCRZ1001C05.g	Glycolysis/Gluconeogenesis		2	4	20.868	191
438	SCJFLR1013B03.g	Glycolysis/Gluconeogenesis		1	3	20.336	184
439	SCJFRZ3C01H09.g	Glycoside hydrolase family 28 protein (polygalacturonase)		1	3	25.504	239
440	SCJFRZ2029F03.g	Glycoside hydrolase family 31 (alpha-glucosidase or alpha-xylosidase)		3	1	20.813	196
441	SCAGLR1021F11.g	Glycosyl hydrolase family 1		2	3	17.241	153
442	SCCCCL3001B10.b	Glycosyl hydrolase family 1		3	5	19.647	176
443	SCEQHR1082B01.g	Glycosyl hydrolase family 1		1	1	11.198	97
444	SCEQLB1066E08.g	Glycosyl hydrolase family 1		2	4	64.674	612
445	SCJFLR1017E03.g	Glycosyl hydrolase family 1		1	2	20.847	192
446	SCAGRT2037A11.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)		1	6	26.85	239
447	SCCCRT1002G03.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)		1	1	17.127	148
448	SCCCSB1003H06.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)		1	2	56.748	536
449	SCEZRZ3015A12.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)		1	2	15.931	157
450	SCEQLR1093F09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein		2	2	18.29	174
451	SCEZLB1007A09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein		1	52	105.63	940
452	SCRURT2008D11.g	glycosyl hydrolase family 3 protein		3	2	13.027	127
453	SCCCCL2001B11.b	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)		3	13	33.511	324
454	SCCCCL4003F09.g	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)		1	9	24.867	228
455	SCEZLB1007H04.g	Glycosyl transferase family 8 (lipopolysaccharide biosynthesis)		2	4	74.162	679
456	SCQSRT2036H09.g	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS	Arabidopsis thaliana	2	2	56.317	503
457	SCVPCL6041A10.g	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1		1	7	49.099	445
458	SCBFST3133F03.g	GTP-binding protein YPTM1		1	2	112.72	1023
459	SCJFRZ2013H05.g	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3		1	4	64.937	591
460	SCRFLR2038F04.g	Heat shock 70 kDa protein 4L OS	Mus musculus	1	2	33.834	307
461	SCCCLR1080E07.g	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial;		1	3	20.461	190
462	SCCCRZ1002G01.g	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS	Solanum lycopersicum	2	12	60.003	559
463	SCCCLR1075E09.g	Heat shock protein 81-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	44.207	399
464	SCJLLR1011E03.g	Heat shock protein 81-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	4	19.785	203
465	SCCCLR2C02F10.g	Heat shock protein 81-3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	17.673	172
466	SCUTST3084B04.g	Heat stress transcription factor B-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	60.974	567
467	SCSGAM2103F11.g	Heparanase-like protein 1;		2	2	16.063	150
468	SCEQRT2092B03.g	Heparanase-like protein 2;		1	2	20.737	187
469	SCMCAM2084F02.g	Hexokinase-5 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	5	18.747	176
470	SCAGAM2124E02.g	Hexokinase-6 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	71.466	639
471	SCJFRT2059G11.g	histidinol dehydrogenase		1	4	33.904	324
472	SCBFRZ2018H11.g	Histone H1 OS	Solanum pennellii PE	1	14	45.517	422
473	SCACFL8019G10.g	Histone H1 OS	Zea mays	1	3	19.368	180
474	SCJFRZ2010B03.g	Histone H1 OS	Zea mays	1	4	22.86	205
475	SCCCLR1001C03.g	Histone H2A OS	Petroselinum crispum	1	11	34.065	315
476	SCQGLR1062G09.g	Histone H2B.2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	17	46.468	440
477	SCVPLB1017H05.g	Histone H3.2 OS	Triticum aestivum	3	13	39.573	357
478	SCJFRZ2006G04.g	Histone H3.3 OS	Vitis vinifera	1	23	64.166	592
479	SCJLLR2020B06.g	Histone H4 OS	Silene latifolia	1	2	22.694	207
480	SCRFRH1009A01.g	Horcolin OS	Hordeum vulgare	1	2	60.16	545
481	SCRURT3064B04.b	Horcolin OS	Hordeum vulgare	2	3	34.087	321
482	SCEZST3147B03.g	hypothetical protein	Oryza sativa Japonica Group	1	2	55.434	513
483	SCSGRZ3061F11.g	hypothetical protein	Zea mays	3	26	57.676	532
484	SCJLRT1014F08.g	hypothetical protein Osl_12184	Oryza sativa Indica	9	26	74.957	686
485	SCAGRT2041F12.g	hypothetical protein SORBDRAFT_01g027670	Sorghum bicolor	7	31	92.942	816
486	SCQGLB1029D12.g	hypothetical protein SORBDRAFT_02g007160	Sorghum bicolor	1	2	48.036	465
487	SCEQRT1024B11.g	hypothetical protein SORBDRAFT_02g010830	Sorghum bicolor	1	1	29.58	271
488	SCBGAM1092D06.g	hypothetical protein SORBDRAFT_03g013250	Sorghum bicolor	1	14	75.685	705
489	SCCCLR1001G04.g	hypothetical protein SORBDRAFT_03g027650	Sorghum bicolor	1	12	66.528	604
490	SCJLRT1014G09.g	hypothetical protein SORBDRAFT_05g004770	Sorghum bicolor	1	1	22.201	207
491	SCCCRT1003E03.g	hypothetical protein SORBDRAFT_05g004770	Sorghum bicolor	3	2	14.572	133
492	SCJFRT1059C11.g	hypothetical protein SORBDRAFT_06g022840	Sorghum bicolor	1	5	131.58	1187
493	SCCCLR1C04C04.g	hypothetical protein SORBDRAFT_06g028280	Sorghum bicolor	3	3	55.35	490
494	SCBFRZ2046F03.g	hypothetical protein SORBDRAFT_07g009530	Sorghum bicolor	1	1	46.768	426
495	SCQSRT1034A12.g	hypothetical protein SORBDRAFT_07g022290	Sorghum bicolor	1	2	46.034	414
496	SCEZRZ3095D08.g	hypothetical protein SORBDRAFT_08g000440	Sorghum bicolor	3	5	57.402	543
497	SCAGFL1089C05.g	hypothetical protein SORBDRAFT_08g018710	Sorghum bicolor	1	1	58.236	511

Continuação Anexo 2.

498	SCCZR1C01A05.g	Importin alpha 2 subunit (NLS receptor)		1	2	64.009	578
499	SCCCL3003D06.b	Importin subunit alpha-1b		1	8	75.119	683
500	SCQSR1036H06.g	Importin subunit beta-1 (Karyopherin subunit beta-1)		1	6	65.929	602
501	SCUTLR2030A05.g	Importin-beta2		1	2	90.88	820
502	SCCCR21002H11.g	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic OS	Arabidopsis thaliana	1	3	63.607	601
503	SCBFLR1026E02.g	inositol kinase		3	11	52.889	496
504	SCCCL3120F08.b	Inositol phosphatases		2	3	45.279	403
505	SCCCLR1C02F07.g	Inositol-3-phosphate synthase OS	Zea mays	1	4	17.517	161
506	SCCCLR1C02F07.g	Intracellular ribonuclease LX OS	Solanum lycopersicum	2	3	21.972	201
507	SCCCLR1C04G09.g	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	Medicago sativa	1	2	17.813	164
508	SCCCLR1C04G09.g	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	Medicago sativa	2	5	39.642	366
509	SCVPLR1020E05.g	isoflavone reductase/pinoresinol reductase (lignan biosynthesis)		3	12	59.065	553
510	SCCCLR1001A04.g	Jasmonate-induced protein homolog		1	8	45.672	407
511	SCBGR1037F07.g	Jasmonate		4	26	53.332	484
512	SCJLR1024A04.g	Jasmonate		2	6	20.82	182
513	SCCCLR1013D09.g	jasmonic acid		1	9	63.894	587
514	SCCCLR1001E01.g	jasmonic acid		1	14	44.496	398
515	SCJFR1007H07.g	jasmonic acid		19	6	33.13	303
516	SCSBHR1052D02.g	jasmonic acid		1	6	44.545	396
517	SCUTLR2030B03.g	jasmonic acid		1	5	21.064	188
518	SCCCLR1024E10.g	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	15	33.825	311
519	SCCCLR1076C03.g	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic		1	2	71.821	645
520	SCCCLR1078H05.g	Kynurenine formamidase OS		2	7	119.42	1043
521	SCCCLR1072E07.g	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	45.077	408
522	SCEQRT2096D11.g	laccase-like protein		2	2	27.428	246
523	SCMCR10287D02.g	laccase-like protein		1	4	68.037	640
524	SCQSR1056B07.b	laccase-like protein		1	30	98.503	881
525	SCSBAD1050H03.b	laccase-like protein		1	1	20.572	189
526	SCVPT1060D08.g	laccase-like protein		2	8	46.155	417
527	SCCST1002D07.g	Lactoylglutathione lyase OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	7	21.74	204
528	SCQGR1042E05.g	Lactoylglutathione lyase; Methylglyoxalase		2	4	13.705	119
529	SCRUR1076B12.g	lactoylglutathione lyase (glyoxalase I)		1	4	23.881	213
530	SCBGLR1023A04.g	Lamin-like protein OS	Arabidopsis thaliana	3	5	20.949	187
531	SCJLR1024H09.g	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A OS	Gossypium hirsutum	4	6	20.868	185
532	SCSGT1072B08.g	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic		1	2	27.508	245
533	SCCCLR1048G02.g	Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS		5	43	84.452	766
534	SCSBFL1014H12.g	Lipoxygenase 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	6	8	89.097	851
535	SCBFLR1026B05.g	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic		3	9	36.72	343
536	SCACLR1029D05.g	LOC100285305 precursor	Zea mays	1	2	23.627	222
537	SCJLR1054F05.g	Luminal-binding protein 2 OS	Zea mays	1	2	54.909	495
538	SCSFT1037G09.g	Luminal-binding protein 3 OS	Zea mays	2	8	14.547	136
539	SCMCLR1053H06.g	lysyl-tRNA synthetase		1	4	21.957	207
540	SCMCST1055F02.g	lysyl-tRNA synthetase		1	1	28.445	263
541	SCCCLR1072A12.g	Malate dehydrogenase, chloroplastic		2	9	37.527	344
542	SCCCLR1024D03.g	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS	Zea mays	1	4	24.201	222
543	SCCCL4004C11.g	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS	Fragaria ananassa GN	1	5	88.905	860
544	SCCCR21002H10.g	Mavicyanin		1	4	13.488	122
545	SCUTLR2030F05.g	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 32		1	2	43.806	384
546	SCRFLR1055B01.g	Methionine aminopeptidase 2B OS	Arabidopsis thaliana	2	5	16.646	153
547	SCCZR1012F05.g	Methylenetetrahydrofolate reductase 1; ZmMTHFR1		1	2	37.208	360
548	SCVPLR1049C03.g	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]		2	5	61.702	558
549	SCQST1031A07.g	Microtubule-associated protein TORTIFOLIA1 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	27.423	249
550	SCEQLR1092H08.g	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10		2	1	20.166	183
551	SCVPT1074F03.g	Mitochondrial import receptor subunit TOM7-1 OS	Solanum tuberosum	1	4	54.416	477
552	SCCCLR1067D05.g	Voltage-dependent anion-selective channel protein; VDAC; POM 36		1	3	37.268	337
553	SCCCL3002B06.b	Mitochondrial outer membrane protein porin OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	58.029	523
554	SCJLR1074A12.g	Mitochondrial outer membrane protein porin; Voltage-dependent anion-selective channel protein; VDAC		2	8	57.883	529
555	SCCCLR1022A05.g	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS	Solanum tuberosum	2	6	27.58	254
556	SCJLR1021G03.g	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS	Solanum tuberosum	1	3	27.968	254
557	SCCCLR2001H12.g	MND1-interacting protein 1 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	24.013	223
558	SCCCLR1079D10.g	Monodehydroascorbate reductase OS	Solanum lycopersicum	1	2	33.511	321
559	SCQSR1036A12.g	Monodehydroascorbate reductase OS	Solanum lycopersicum	2	2	14.731	140
560	SCQSR1031F03.g	Monodehydroascorbate reductase, chloroplastic OS	Arabidopsis thaliana	1	6	48.892	445
561	SCAGLB1070D03.g	morphogenesis		1	10	40.52	359
562	SCCCR22C04B02.g	N metabolism		1	3	70.132	637
563	SCRLAM1013H01.g	N-carbamoylputrescine amidase OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	46.552	407
564	SCACLR1057E10.g	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7		1	12	36.207	334
565	SCQGLR1085G12.g	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	1	12	59.672	532
566	SCCCL3120A08.b	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase		1	6	111.86	978
567	SCEPCL6019E04.g	NADP-dependent malic enzyme OS	Populus trichocarpa	2	7	18.42	169
568	SCCCLR1048A08.g	NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	2	60.669	570
569	SCCCL3001E04.b	NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic OS	Zea mays	1	10	57.917	510
570	SCJFR1007F04.g	NADPH-ferrihemoprotein reductase		1	3	52.431	487
571	SCBGLR1047D05.g	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1;		2	9	67.152	612
572	SCCCR21001E04.g	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 3		3	18	59.164	528
573	SCUTLR1037C05.g	Nectarin-1; Superoxide dismutase [Mn];		1	2	93.789	839
574	SCVPR22036E02.g	Nectarin-1; Superoxide dismutase [Mn];		1	3	13.163	119

Continuação Anexo 2.

575	SCEQRT1030F10.g	Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 1; NMN adenyltransferase 1		1	7	29.983	277
576	SCCCLB1001H03.g	NIT2 nitrilase		1	3	46.976	431
577	SCQGLR1085E12.g	Nitrile-specifier protein 5 OS	Arabidopsis thaliana	1	2	77.055	687
578	SCQSAM2047D12.g	Nodulation receptor kinase OS	Medicago truncatula	1	10	36.516	347
579	SCQGHR1014E03.g	Nodulin-like protein		1	3	96.738	877
580	SCACLR2029H09.g	Non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	Arabidopsis thaliana	1	3	26.832	247
581	SCCCCL3001E03.b	Non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	Arabidopsis thaliana	1	2	48.366	449
582	SCEQSD1074D10.g	Non-specific lipid-transfer protein-like protein At5g64080	Arabidopsis thaliana	1	2	28.794	265
583	SCCCLR2001E08.g	Non-symbiotic hemoglobin; Hbt; ZEAmpl GLB1		2	4	26.697	237
584	SCAGRT2042G05.g	NPL4-like protein		3	9	41.943	392
585	SCCCCL2001A02.b	Nuclear migration protein nudC OS	Gallus gallus	1	1	56.243	490
586	SCEQLB1065E01.g	Nuclear migration protein nudC		2	10	67.046	618
587	SCCCCL4002F10.g	nuclear mRNA splicing, via spliceosome		1	3	44.318	423
588	SCEPLB1044C02.g	nuclear mRNA splicing, via spliceosome		2	3	47.684	432
589	SCCCLR1070G02.g	Nuclear transport factor 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	10	68.003	615
590	SCJLLR1033D04.g	Nucleolar GTP-binding protein 2		2	10	24.24	219
591	SCQGAM2030C12.g	Nucleoside diphosphate kinase 1 OS	Saccharum officinarum	2	1	13.326	125
592	SCBGHR1061C01.g	Nucleoside diphosphate kinase IV,		2	2	21.723	205
593	SCCCRZ1C01H06.g	Nucleoside-triphosphatase OS	Pisum sativum	1	3	40.372	363
594	SCJFRZ2014F02.g	Nucleoside-triphosphatase OS	Pisum sativum	5	11	52.849	463
595	SCQSLR1018E09.g	Nucleosome assembly protein 1-like 1-A OS	Xenopus laevis	2	2	34.908	336
596	SCEPLR1030F01.g	Nucleosome assembly protein 1-like 1		2	11	38.925	358
597	SCCCLR2004A05.g	nucleosome assembly		1	12	85.163	770
598	SCACLR1127E10.g	Nucleotide metabolism		1	4	103.06	930
599	SCBFLR1083E03.g	Nucleotide metabolism		1	2	46.399	417
600	SCBGLR1120D04.g	Nucleotide metabolism		2	4	65.85	603
601	SCJFRZ2027B03.g	Nucleotide metabolism		1	11	55.16	487
602	SCRLLR1109F10.g	Nucleotide metabolism		2	2	26.393	239
603	SCJFRT1061G09.g	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase		1	5	26.645	250
604	SCQGAM2026C05.g	Nudix hydrolase 3 OS	Arabidopsis thaliana	1	12	34.339	302
605	SCEQRT1029E10.g	O-methyltransferase ZRP4 (OMT)		2	7	66.7	584
606	SCEQRT1027F02.g	O-methyltransferase ZRP4 OS	Zea mays	1	1	15.996	139
607	SCEPLC6020A07.g	Obg-like ATPase 1; GTP-binding protein 9		5	22	83.022	767
608	SCEZRZ1014C04.g	Osmotin-like protein OS	Solanum lycopersicum	2	3	29.933	286
609	SCUTLR1037F02.g	Osmotin-like protein OS	Solanum lycopersicum	2	9	36.424	346
610	SCCCLR1024G02.g	Oxysterol-binding protein		1	14	35.437	326
611	SCVPRT2075D04.g	Patatin-2-Kuras 1 OS	Solanum lycopersicum	2	2	68.771	640
612	SCJFRT1009B01.g	patatin-like protein		2	18	71.417	675
613	SCJFRT1058C05.g	Patellin-5 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	21.786	191
614	SCCCRZ2002C11.g	Patellin-5		1	4	36.532	352
615	SCQSR1036D03.g	Pathogenesis-related protein 1 OS	Asparagus officinalis	1	2	14.761	134
616	SCEZLB1010C02.g	Pathogenesis-related protein PRB1-3 OS	Hordeum vulgare	4	10	37.116	350
617	SCCCRT3003E05.g	Pathogenesis-related protein PRMS OS	Zea mays	1	2	64.211	595
618	SCCCLR1066G06.g	Pentose and Glucuronate interconversions		1	22	66.132	630
619	SCEQRT1030G05.g	Pentose phosphate pathway		1	2	23.671	225
620	SCJFRT1008E10.g	Pentose phosphate pathway		1	2	43.36	390
621	SCUTLR1037G10.g	Pentose phosphate pathway		7	4	16.418	157
622	SCCCLR2001G06.g	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS	Zea mays	1	3	28.499	261
623	SCCCRZ2002A08.g	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS	Zea mays	1	3	24.15	231
624	SCCCLR1C01H02.g	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase TLP20		1	16	44.386	403
625	SCEQLB1067H09.g	Peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8)		1	4	30.323	283
626	SCCCLB1022G03.g	Periodic tryptophan protein 1 homolog		2	21	42.129	400
627	SCAGRT3049F04.g	peroxidase		2	11	67.632	619
628	SCBFLR1083H12.g	peroxidase		2	1	41.363	375
629	SCBFRZ2017C11.g	peroxidase		1	2	28.543	256
630	SCBGHR1058E08.g	peroxidase		3	10	46.818	427
631	SCBGR13013B02.g	peroxidase		1	3	46.121	412
632	SCCCAD1001C08.g	peroxidase		1	11	59.986	546
633	SCCCCL2001D02.b	peroxidase		1	2	35.501	320
634	SCCCCL3002E11.b	peroxidase		1	3	52.656	472
635	SCCCCL3002F08.b	peroxidase		1	2	65.142	592
636	SCCCCL3003B02.b	peroxidase		2	14	83.663	760
637	SCCCCL4008H04.g	peroxidase		2	4	51.295	463
638	SCCCCL4012A01.g	peroxidase		1	2	17.803	171
639	SCCCCL7037A10.g	peroxidase		5	3	28.288	251
640	SCCCCL7C05F08.g	peroxidase		2	1	31.252	298
641	SCCCLB1004B09.g	peroxidase		1	10	22.908	217
642	SCCCLR1C05G08.g	peroxidase		1	2	16.147	153
643	SCCCRT1001G12.g	peroxidase		1	2	28.324	253
644	SCCCST3005E08.g	peroxidase		1	2	37.976	342
645	SCEPAM2056G07.g	peroxidase		1	1	28.3	256
646	SCEPRZ1011A06.g	peroxidase		1	1	23.158	205
647	SCEQRT1024D03.g	peroxidase		2	3	27.702	243
648	SCEQRT1024F02.g	peroxidase		2	1	15.024	133
649	SCEQRT1026F09.g	peroxidase		1	2	42.714	390
650	SCEQRT1028D12.g	peroxidase		1	2	24.032	238
651	SCEQRT1028H09.g	peroxidase		2	2	11.174	113
652	SCEQRT2030A04.g	peroxidase		2	1	11.044	107
653	SCEZRT2019F10.g	peroxidase		2	2	26.41	239
654	SCJFLR1035D02.g	peroxidase		1	6	16.226	152
655	SCJFLR1035D05.g	peroxidase		3	2	32.375	280
656	SCJFRZ2013F04.g	peroxidase		2	7	65.095	600
657	SCFRZ3054A09.g	peroxidase		1	6	41.653	383
658	SCJLLR1107D08.g	peroxidase		1	1	13.819	137

Continuação Anexo 2.

659	SCRLAD1042E05.g	peroxidase		2	7	57.37	512
660	SCRURT3064C05.g	peroxidase		1	2	55.811	488
661	SCSBRZ2021C03.g	peroxidase		1	1	62.129	571
662	SCSFL6068C11.g	peroxidase		1	6	41.092	364
663	SCSGRT2062D07.g	peroxidase		2	4	61.561	532
664	SCSGRT2063H01.g	peroxidase		2	3	38.95	352
665	SCUTHR1063E12.g	peroxidase		1	5	67.884	616
666	SCVPLB1020D03.g	peroxidase		1	1	15.461	147
667	SCVPRZ2035F03.g	peroxidase		2	2	28.437	279
668	SCEPRZ1009H12.g	Peroxioredoxin-2F, mitochondrial; Peroxioredoxin IIF; Thioredoxin reductase 2F;		1	2	31.779	290
669	SCCCLR1048D07.g	phenylalanine ammonia-lyase(PAL)		1	4	51.343	462
670	SCJFLR1017B11.g	phenylalanine ammonia-lyase(PAL)		1	6	49.306	452
671	SCJLRT1013C01.g	phenylalanine ammonia-lyase(PAL)		1	4	76.327	675
672	SCMCRT2105F08.g	Phosphate carrier protein, mitochondrial;		1	3	26.993	244
673	SCSFRT2072C08.g	Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein	Aspergillus oryzae	1	3	33.315	301
674	SCCCCL3001F10.b	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1		1	10	29.51	261
675	SCJLST1025D02.g	Phosphoglycerate kinase, cytosolic OS	Triticum aestivum	1	1	50.56	463
676	SCAGLR1043E06.g	Phospholipase D alpha 1 OS	Zea mays	2	2	33.034	325
677	SCQSLR1040D12.g	Phytochrome		2	2	8.9607	83
678	SCVPRZ2040D09.g	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor or Pectinesterase		2	4	51.58	465
679	SCQSRT1035E09.g	Pleckstrin homology domain-containing family A member		1	7	38.105	355
680	SCBGLR1023H10.g	Polyadenylate-binding protein 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	4	18.521	172
681	SCBFRT1067F03.g	Polyamine oxidase OS	Zea mays	3	4	89.053	790
682	SCQGSB1143H12.g	Polyamine oxidase OS	Zea mays	1	1	48.411	439
683	SCJFRZ1007G02.g	Polyamine oxidase;		1	4	72.728	651
684	SCVPLR2019B03.g	Polygalacturonase inhibitor 1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	4	26.591	252
685	SCCCFL4119D10.g	Polygalacturonase QRT3 OS	Arabidopsis thaliana	2	2	29.515	247
686	SCEPAM1051D07.g	Polyphenol oxidase, chloroplastic OS	Malus domestica	2	6	54.576	480
687	SCEZLB1007D07.g	Polyphenol oxidase, chloroplastic OS	Malus domestica	2	2	20.076	178
688	SCEZRZ1016D05.g	Polyphenol oxidase, chloroplastic OS	Malus domestica	1	2	76.292	713
689	SCVPLB1016F07.g	Polyphenol oxidase, chloroplastic OS	Malus domestica	1	4	41.56	380
690	SCSGLR1045A10.g	Polyphenol oxidase, chloroplastic		2	10	68.376	627
691	SCCCLR1C07C07.g	POT family (PTR2)		1	2	52.677	487
692	SCCCLR1070C10.g	PP2A inhibitor		1	3	54.039	477
693	SCCCLR1080G12.g	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	19.795	199
694	SCCCLR1C07G02.g	PREDICTED: ras-related protein RABH1b-like	Brachypodium distachyon	2	1	21.407	199
695	SCMCRT2102D05.g	Prefoldin subunit 6 (Protein Ke2)		1	3	34.435	306
696	SCUTLR1037C03.g	Proactivator polypeptide; Saposin-A; Protein A		1	2	15.661	144
697	SCCCLR1048G11.g	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3		1	3	48.558	444
698	SCBGLR1114F09.g	Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein		1	11	62.86	581
699	SCJFRZ1006B05.g	Probable aldehyde dehydrogenase		1	10	29.532	256
700	SCMCCL6059G10.g	Probable aldehyde oxidase 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	8	42.443	387
701	SCJLRT1020A08.g	Probable alpha-glucosidase Os06g0675700 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	32.77	294
702	SCSGCL6072E02.g	Probable alpha-glucosidase Os06g0675700 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	8	57.348	523
703	SCEQRT2098D07.g	Probable ATP synthase 24 kDa subunit, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	2	1	24.382	221
704	SCSGLR1045G11.g	Probable calcium-binding protein CML7 (Calmodulin-like protein 7)		1	20	48.496	456
705	SCCART2002H05.g	Probable cytochrome c biosynthesis protein		1	6	39.35	347
706	SCCCSD1002H05.g	Probable disease resistance protein At5g66910 OS	Arabidopsis thaliana	3	7	111.96	1022
707	SCCCCL3005E06.b	Probable fructose-bisphosphate aldolase 3,	Arabidopsis thaliana	2	4	23.749	225
708	SCCCCL4011D07.g	Probable glutathione S-transferase GSTU1		1	3	28.756	274
709	SCCCCL3120D03.g	Probable glutathione S-transferase; Auxin-induced		2	2	52.506	487
710	SCEPLR1051D01.g	Probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1	Arabidopsis thaliana	1	3	25.33	230
711	SCJFRT1010B06.g	Probable inactive purple acid phosphatase 1 OS	Arabidopsis thaliana	1	29	83.405	749
712	SCEZRZ1014E01.g	Probable inactive purple acid phosphatase 27 OS	Arabidopsis thaliana	2	9	34.718	315
713	SCVPCL6044H09.g	Probable methionine aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.18)		1	5	36.029	336
714	SCJLLR1054C07.g	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	Arabidopsis thaliana	1	2	44.653	399
715	SCJFLR1074A06.g	Probable nucleoredoxin 1-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	29	78.519	698
716	SCVPLR1028G12.g	Probable nucleoredoxin 1-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	15	52.672	480
717	SCEZLR1031F07.g	Probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;		2	2	35.001	335
718	SCCCRZ2C01F01.g	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	2	9	45.592	421
719	SCBGLR1023B11.g	Probable polyamine oxidase 4		1	8	52.536	478
720	SCSBSD2029A05.g	Probable prefoldin subunit 3 OS	Arabidopsis thaliana	3	10	66.542	594
721	SCCCLR1C01A02.g	Probable protein disulfide-isomerase A6 OS	Medicago sativa	1	1	27.569	272
722	SCCCLR1077B12.g	Probable protein disulfide-isomerase A6; P5;		1	1	25.026	239
723	SCAGRT2039C06.g	Probable RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	Arabidopsis thaliana	1	2	13.58	126
724	SCEPLB1043F04.g	Probable small nuclear ribonucleoprotein F;		2	2	41.591	397
725	SCCCLR1076F06.g	Probable small nuclear ribonucleoprotein G;		3	4	35.173	317
726	SCSGFL1081H08.g	Probable succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha	Oryza sativa subsp. japonica	1	13	41.49	376
727	SCBFST3136C07.g	Profilin-A		2	2	32.103	305
728	SCEQRT1033H09.g	Prohibitin-2		2	4	23.361	228
729	SCCCCL4009H11.g	prohibitin2	Zea mays	1	21	75.304	678
730	SCCCLB1023A12.g	Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)		1	1	17.421	170
731	SCBFRZ3006A04.g	Protease 2 OS	Escherichia coli	1	4	39.119	350
732	SCJLRT1018H05.g	Protease 2; Protease II; Oligopeptidase B		1	1	18.606	177
733	SCVPRT2080B07.g	Protease inhibitor		1	3	38.057	379
734	SCCCCL3140C10.g	Protease inhibitors		1	2	41.964	390
735	SCJLRT2051G07.g	Protease inhibitors		2	3	12.211	116
736	SCVPRT2073B04.g	Protease inhibitors		2	11	53.511	477
737	SCQSLR1018D04.g	Proteasome component		1	5	57.908	542

Continuação Anexo 2.

738	SCEPLB1041G09.g	Proteasome subunit alpha type-1		1	9	46.048	429
739	SCSBAM1085E11.g	Proteasome subunit alpha type-3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	4	26.555	256
740	SCSGLR1045C03.g	Proteasome subunit alpha type-3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	18.282	167
741	SCVPLR2019H10.g	Proteasome subunit alpha type-3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	7	52.853	483
742	SCEQHR1080E08.g	Proteasome subunit alpha type-4-2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	34.032	306
743	SCAGLR2026H05.g	Proteasome subunit alpha type-5 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	73.126	657
744	SCCCLR1001B04.g	Proteasome subunit alpha type-6		1	11	40.533	355
745	SCJFRZ2010D05.g	Proteasome subunit alpha type-7-A		1	7	29.264	264
746	SCACLR2007D12.g	Proteasome subunit beta type-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	60.845	545
747	SCBGLR1002D03.g	Proteasome subunit beta type-1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	3	63.972	572
748	SCCCLR1048G12.g	Proteasome subunit beta type-2;		1	4	39.275	386
749	SCCCLR1001C09.g	Proteasome subunit beta type-3;		3	3	27.159	249
750	SCCCCL3120F07.g	Proteasome subunit beta type-4		2	3	41.125	380
751	SCCCLR1C02B03.g	Proteasome subunit beta type-5-A OS	Arabidopsis thaliana	1	3	102.74	923
752	SCCCLR1068D08.g	Proteasome subunit beta type-7-A OS	Arabidopsis thaliana	1	3	96.999	880
753	SCCCLR2001A02.g	Protein CutA 1, chloroplastic OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	6	29.521	282
754	SCJFRZ2009A01.g	Protein DEHYDRATION-INDUCED 19 homolog 2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	4	42.6	380
755	SCCCLR1077G10.g	Protein disulfide isomerase A6 precursor (EC 5.3.4.1)		1	2	37.488	347
756	SCCCLR1048G04.g	Protein disulfide-isomerase OS	Zea mays	3	3	21.719	203
757	SCQSST1040D05.g	Protein FAM136A		1	2	48.118	427
758	SCJFRZ3C01D12.g	Protein grpE; HSP-70 cofactor		1	5	28.865	259
759	SCJFLR1013F08.g	Protein IN2-1		2	2	22.579	215
760	SCJLRZ1027G11.g	Protein IN2-1		1	3	33.334	293
761	SCQSAM2100C08.g	Protein mago nashi homolog OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	35.869	321
762	SCCCLR2001B09.g	Protein MEMO1 (Mediator of ErbB2-driven cell motility 1)		2	1	8.49	79
763	SCCCST3006H10.g	Protein RER1A (AtRER1A)		1	9	39.472	376
764	SCCCLR2001H02.g	Protein TOPLESS		2	4	69.631	645
765	SCJFRT2057H05.g	Protein transport protein Sec16B OS	Oryctolagus cuniculus	1	3	39.2	351
766	SCUTLR1058A05.g	Protein transport protein Sec24-like CEF OS	Arabidopsis thaliana	1	2	72.981	667
767	SCCCCL4015D05.g	Protein transport protein sec31		1	2	18.598	174
768	SCCCCL3140C07.g	Protein VERNALIZATION INSENSITIVE 3		1	3	23.783	217
769	SCJFRZ2015A08.g	Protein VERNALIZATION INSENSITIVE 3		1	2	38.724	352
770	SCJFRT2055H11.g	Puromycin-sensitive aminopeptidase; PSA		1	2	27.838	260
771	SCVPRZ2043H01.g	Purple acid phosphatase 2 OS	Ipomoea batatas GN	1	2	52.967	482
772	SCCCLR1066F03.g	Purple acid phosphatase; Zinc(II) purple acid phosphatase		1	2	73.298	645
773	SCEPRZ1010G06.g	Putative 6-phosphogluconolactonase (Fragment)		2	1	19.66	188
774	SCQGLB1038F04.g	Putative acetolactate synthase		3	2	33.174	324
775	SCQSLB1052F09.g	putative acetyl transferase		2	5	37.251	332
776	SCCCCL3001A05.g	Putative aconitate hydratase, cytoplasmic OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	13	80.221	698
777	SCCCLR1065F02.g	Putative aconitate hydratase, cytoplasmic OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	2	27.836	246
778	SCQSRT2031F11.g	Putative aldehyde oxidase-like protein OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	5	30.72	285
779	SCJFST1012D03.g	Putative beta-mannosidase		2	10	66.362	594
780	SCAGLR1064E01.g	putative carboxymethylenebutenolidase		2	3	33.84	310
781	SCCCLR1024F02.g	Putative DNA repair protein RAD23-4		1	12	68.921	625
782	SCBGHR1061E10.g	putative extensin		1	2	19.355	172
783	SCBFLR1026E04.g	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase OS	Cenchrus ciliaris	2	1	18.984	179
784	SCJFRT1058A12.g	Putative peroxisomal-coenzyme A synthetase OS	Schizosaccharomyces pombe	1	32	73.301	664
785	SCCCLR1048C11.g	Putative protein TPRXL		1	32	107.31	956
786	SCCCCL3001E09.b	putative SnRK1-interacting protein 1		2	4	21.341	197
787	SCRFRL2034C11.g	Putative steroid-binding protein 2; AtMP2		1	1	15.847	144
788	SCJFRZ2031H09.g	Putative steroid-binding protein 3; AtMP3		1	1	35.399	338
789	SCCCRT1004D01.g	Putative wall-associated protein kinase		3	27	84.607	782
790	SCCCRZ2C03E07.g	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump		1	2	45.22	408
791	SCCCCL4011D12.g	Pyruvate decarboxylase isozyme 2 OS	Oryza sativa subsp. indica	2	4	72.626	637
792	SCCCCL1002D10.b	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1;	Arabidopsis thaliana	1	4	43.063	399
793	SCCCLR1065E04.g	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta OS	Staurostrum punctulatum	1	3	37.502	334
794	SCJLRT1023A07.g	pyruvate dehydrogenase2	Zea mays	1	2	37.489	350
795	SCEZLB1006G09.g	Pyruvate kinase, cytosolic isozyme OS	Nicotiana tabacum	1	7	84.96	756
796	SCCCLR2C01A06.g	R-gene		1	3	51.932	462
797	SCCCRT2002D03.g	R-genes transduction		1	3	43.079	381
798	SCEPLB1043E09.g	Rab GDP dissociation inhibitor alpha (Rab GDI alpha)		1	2	26.375	239
799	SCCCLR1001G12.g	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Zea mays	1	2	38.344	366
800	SCCCLR1075B02.g	Rab		2	2	25.881	263
801	SCCCRZ2002A07.g	Rab		3	3	21.648	196
802	SCEQLR1007G11.g	RAN GTPase-activating protein 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	1	23.131	213
803	SCEQRT2028E03.g	Ran		2	4	67.562	628
804	SCQSRT2033A11.g	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS	Pongo abelii	1	5	50.97	477
805	SCCCLR1C07D08.g	ras-related protein Rab7	Zea mays	1	2	25.546	243
806	SCSGRZ3062A12.g	Receptor Ser/Thr kinase-unclassified		1	2	29.854	281
807	SCCCLR1072H06.g	receptor Ser/Thr kinase		1	6	38.077	342
808	SCCCRZ1C01H05.g	receptor Ser/Thr kinase		1	2	18.719	179
809	SCVPAM2064B04.g	Receptor-like protein kinase FERONIA OS	Arabidopsis thaliana	1	1	14.138	134
810	SCMCSB1116D02.g	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2; Short		4	3	27.695	257
811	SCRUAD1061B04.g	RecName:Arginine/serine-rich protein 45		2	10	64.88	574
812	SCEPLB1041F10.g	RecName:BAG family molecular chaperone regulator 7		1	32	99.41	890
813	SCJFRT1060F07.g	RecName:Basic proline-rich protein		3	3	44.051	401
814	SCJLAM2093F08.g	RecName:Basic proline-rich protein		1	7	44.755	397
815	SCCCRZ2002D08.g	RecName:DNA ligase 1; AltName:DNA ligase I;		1	2	45.473	412
816	SCAGLR2011D03.g	RecName:Glycoprotein gp2; AltName:Glycoprotein X		1	3	88.801	810
817	SCCCLR2001A08.g	RecName:Glycoprotein gp2; AltName:Glycoprotein X		1	5	19.954	187
818	SCSGLR1084C03.g	RecName:Glycoprotein gp2; AltName:Glycoprotein X		1	3	30.989	280
819	SCUTLR2023H05.g	RecName:Glycoprotein gp2; AltName:Glycoprotein X		3	6	21.672	202
820	SCJFHR1032A01.g	RecName:Mediator of RNA polymerase II transcription		1	1	15.058	139
821	SCCCLR1065D07.g	RecName:Mucin-5AC; Short		1	3	21.571	194

Continuação Anexo 2.

822	SCCCLR1048C07.g	RecName:Outer envelope pore protein 16-3,		1	1	19.121	175
823	SCRURT3061D09.g	RecName:Pre-mRNA-splicing factor cwc-22		1	2	50.151	436
824	SCEQRT1026F05.g	RecName:Probable carboxylesterase 2		1	2	38.303	338
825	SCSGLR1045C09.g	RecName:Probable RNA polymerase II transcription factor		1	2	41.248	370
826	SCJFRT2057H11.g	RecName:Putative lipid-transfer protein DIR1		1	2	14.204	135
827	SCBGLR1118F05.g	RecName:Putative protein TPRXL		1	3	26.309	235
828	SCCCST3001E10.g	RecName:Putative protein TPRXL		1	2	21.056	187
829	SCQSLB1052E10.g	RecName:Putative uncharacterized protein		3	3	24.145	233
830	SCEZLB1007D12.g	RecName:Rapid alkalization factor; Short		1	2	35.443	324
831	SCJFRZ2014G08.g	RecName:Rapid alkalization factor; Short		1	3	22.078	193
832	SCEQAM2038F09.g	RecName:Serine-rich adhesin for platelets;		1	2	22.662	222
833	SCCCCL4014C12.g	RecName:Serine/arginine repetitive matrix protein 1		1	2	32.14	287
834	SCJFLR1074F10.g	RecName:Serine/arginine repetitive matrix protein 2;		1	1	21.912	203
835	SCEZRT3069B05.g	RecName:Serine/arginine repetitive matrix protein 2		2	2	49.024	463
836	SCJFHR1031D08.g	RecName:Serine/arginine repetitive matrix protein 2		1	4	68.384	626
837	SCSGLR1084A12.g	RecName:Serine/arginine repetitive matrix protein 2		1	2	99.913	895
838	SCCCRZ2003B05.g	RecName:Translation initiation factor IF-2		1	1	46.492	429
839	SCSFRT2069A03.g	RecName:Translation initiation factor IF-2		1	2	13.799	130
840	SCCCCL3001H10.b	RecName:Translocon-associated protein subunit beta		1	2	93.965	854
841	SCSBFL4012F03.g	RecName:Uncharacterized protein C10orf95		1	3	51.232	461
842	SCSFST1066G10.g	RecName:Uncharacterized protein C10orf95		1	2	49.818	454
843	SCCCLB1004F12.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		5	3	58.998	546
844	SCEQRT1028B12.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		1	11	82.138	748
845	SCEQRT2090E08.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		1	13	56.155	484
846	SCEQRT2091H09.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		1	4	16.6	160
847	SCEZLR1052E12.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		4	21	57.165	517
848	SCQGLR1019D06.g	RecName:Uncharacterized protein LOC284861		1	3	93.505	834
849	SCCCLR2C01H04.g	RecName:UPF0317 protein KRH_21160		1	3	54.354	478
850	SCCCCL3140C05.g	RecName:Vegetative cell wall protein gp1		7	4	30.4	290
851	SCQST3113G08.g	RecName:Vegetative cell wall protein gp1		2	30	68.064	621
852	SCEQLB1064D04.g	RecName:Zinc finger protein ZAT1		2	9	37.895	341
853	SCCCCL3140F04.g	regulation of DNA replication		23	7	16.257	151
854	SCBGLR1002A12.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	2	37.147	351
855	SCCCCL3001B04.b	regulation of transcription, DNA-dependent		1	2	44.362	400
856	SCCCCL3004H02.b	regulation of transcription, DNA-dependent		1	1	77.153	710
857	SCCCCL5003D05.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	4	40.684	354
858	SCCCLR1048A10.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	8	21.379	178
859	SCCCLR1066B09.g	regulation of transcription, DNA-dependent		2	3	78.636	765
860	SCCCLR2C03A06.g	regulation of transcription, DNA-dependent		4	4	20.231	179
861	SCCCRZ1004G10.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	2	31.382	281
862	SCQGLR1019B02.g	regulation of transcription, DNA-dependent		4	15	64.19	573
863	SCRULB1059F02.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	4	86.462	775
864	SCVPLR2019F03.g	regulation of transcription, DNA-dependent		1	6	32.996	298
865	SCBGST3105H08.g	Regulator of ribonuclease-like protein 2 OS	Arabidopsis thaliana	1	4	20.598	190
866	SCQGLR1041A05.g	response to heat		1	3	20.935	194
867	SCCCLR1004D05.g	response to oxidative stress		1	5	19.461	182
868	SCCCLR1001E03.g	response to oxidative stress		1	7	21.168	197
869	SCEQRT2099G01.g	response to oxidative stress		1	3	75.921	686
870	SCAGRT2039E07.g	Reticuline oxidase-like protein OS	Arabidopsis thaliana	1	1	11.775	109
871	SCAGLR1021B05.g	reversibly glycosylated polypeptide		1	2	19.054	188
872	SCBFL5074C09.g	reversibly glycosylated polypeptide		1	1	33.418	287
873	SCRFLR1012F02.g	reversibly glycosylated polypeptide		2	3	19.425	171
874	SCBGRT1047G10.g	Rhcadhesin receptor; Germin-like protein;		1	1	29.746	272
875	SCEPRZ1009E05.g	Rho GTPase-activating protein 20		1	6	43.488	387
876	SCMCRT2086F08.g	Ribonuclease 2;		2	3	16.546	153
877	SCUTRZ3070D05.g	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3		1	1	38.418	358
878	SCCCLR1C04E09.g	Ribosomal protein L15		1	2	57.676	523
879	SCBGFL5081F09.g	Ribosomal protein L25 (Fragment)		1	3	53.957	508
880	SCAGLR2033D11.g	Ribosomal protein L3		1	10	41.695	377
881	SCILLR1101C01.g	Ribosomal protein S7		3	8	32.509	297
882	SCVPLR2005E09.g	Ribosomal protein S7		1	8	44.414	392
883	SCCCRZ2001F06.g	ribosomal protein		1	1	31.014	281
884	SCCCLR2001B03.g	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog OS	Homo sapiens	1	3	41.1	369
885	SCRLAM1008E06.g	Ribosome-binding protein 1; Ribosome receptor protein		4	19	103.17	936
886	SCEPAM1021C06.g	Ribosome-inactivating protein 9 OS	Zea mays	2	7	27.267	265
887	SCRUFL1112F04.b	RNA stability		2	3	10.313	88
888	SCVPLC6038H06.g	RNA-binding protein Musashi homolog Rbp6 OS	Drosophila melanogaster	1	3	50.334	459
889	SCCCCL4012A11.g	RSTK		2	2	26.263	237
890	SCCCLR2C02D03.g	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	Triticum aestivum	3	7	108.87	996
891	SCCCRZ1004G05.g	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	Pisum sativum	2	7	31.891	287
892	SCUTLR1058B02.g	S-adenosylmethionine synthase 1 OS	Triticum monococcum	1	3	25.367	235
893	SCJFRZ2028D05.g	S-formylglutathione hydrolase; AtSFGH; Esterase D		1	1	30.303	295
894	SCCCLR1079C11.g	Salt stress root protein RS1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	50.245	447
895	SCEQLR1050H09.g	Salt stress root protein RS1 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	27.159	248
896	SCBGRT1053D07.g	Salutaridine reductase OS	Papaver bracteatum	1	1	20.671	193
897	SCVPZR2043E04.g	SBP (squamosa promoter binding protein)		1	3	35.736	337
898	SCCCTR1002E09.g	Serine carboxypeptidase 2 OS	Triticum aestivum	1	6	40.497	362
899	SCEZLB1007G10.g	Serine carboxypeptidase 2 OS	Triticum aestivum	1	3	27.451	253
900	SCJFRT1009C10.g	Serine carboxypeptidase II chains A and B (EC 3.4.16.6)		1	2	52.544	496
901	SCCCLR1024A12.g	Serine carboxypeptidase II-2 precursor (EC 3.4.16.6)		2	9	55.786	506
902	SCEZRZ3016H03.g	Serine carboxypeptidase II-3 OS	Hordeum vulgare	2	10	39.144	364
903	SCCCRZ2C04H09.g	Serine carboxypeptidase-like 19 OS	Arabidopsis thaliana	1	2	22.255	200
904	SCBFRZ2017A10.g	Serine carboxypeptidase-like OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	3	20.497	191
905	SCUTST3092B09.g	Serine/threonine-protein kinase SRPK1 OS	Mus musculus	1	1	20.473	199
906	SCCCLR2003C11.g	Serine/threonine-protein phosphatase PP1 OS	Zea mays	1	1	73.264	671

Continuação Anexo 2.

907	SCJFRZ2005C12.g	Serpin-ZXA (OrysaZxa)		1	3	20.059	176
908	SCACST3160C03.g	Serpin-ZXA OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	6	23.31	219
909	SCJLRT1015H07.g	Serpin		2	3	18.233	183
910	SCBFLR1083D11.g	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.11)		2	2	23.439	223
911	SCCCLR1C01H05.g	Similar to Hordeum vulgare carboxypeptidase D		1	2	19.426	183
912	SCQSLR1061C03.g	Small nuclear ribonucleoprotein E OS		2	2	13.461	128
913	SCACLR1128F12.g	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1		1	5	38.838	371
914	SCQSRT2035C10.g	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS		1	1	18.176	168
915	SCUTLR2015F06.g	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3		1	4	28.344	253
916	SCJFRZ1007C06.g	SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha KIN10	Arabidopsis thaliana	1	4	25.364	227
917	SCRFL4028D02.g	Sodium/hydrogen exchanger family (Na ₊ H ₊ Exchanger)		1	8	97.395	885
918	SCCCLR2002G03.g	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic		2	5	45.602	427
919	SCBGAM1090F06.g	Soluble inorganic pyrophosphatase OS	Zea mays	1	2	30.164	267
920	SCQGLB1029E02.g	Sphingoid long-chain bases kinase 1; LCB kinase 1		1	9	34.644	323
921	SCCCLR1C06A01.g	Splicing factor 3B subunit 3 OS		1	7	63.979	581
922	SCSGAD1007H09.g	Splicing factor 3B subunit 3 OS		5	9	39.564	362
923	SCMCRZ3067E12.g	Splicing factor 3B subunit 3		1	3	23.609	212
924	SCEPRZ1011F02.g	Splicing factor, arginine/serine-rich 2		1	9	42.85	391
925	SCVPLR1028D03.g	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1		1	3	49.089	456
926	SCEQRT1029D09.g	Starch and sucrose metabolism		4	2	35.315	337
927	SCEQRT2027C10.g	Starch and sucrose metabolism		2	3	13.268	119
928	SCJFLR1035A02.g	Starch and sucrose metabolism		1	1	23.975	221
929	SCACSD2018E08.g	Stem 28 kDa glycoprotein precursor		2	2	88.255	787
930	SCBFRZ2016G05.g	Stem-specific protein TSJ1 OS	Nicotiana tabacum	2	5	26.864	245
931	SCCCLR1024C11.g	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	Pisum sativum	2	3	23.918	223
932	SCUTSD2087C05.g	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2B (Fragment) OS	Hordeum vulgare	1	5	14.804	137
933	SCBGSD2049C12.g	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	1	2	42.964	421
934	SCCCCL2001A04.b	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	2	3	103.93	937
935	SCCCST1004B07.g	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	1	2	14.805	141
936	SCJFRT2057F01.g	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	1	3	19.252	184
937	SCQGLR2025F03.g	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	1	3	9.531	84
938	SCRFRH1007E04.g	Subtilisin-like protease OS	Arabidopsis thaliana	1	1	55.337	513
939	SCRUF13064H08.g	Subtilisin-like protease; Cucumis-like serine protease;		2	2	57.103	508
940	SCRURT2009G03.g	Subtilisin-like protease; Cucumis-like serine protease;		1	3	41.712	374
941	SCCCLR1001A05.g	sucrose synthase		1	4	26.199	240
942	SCCCRZ1002G07.g	sucrose synthase		1	2	35.663	316
943	SCEZLR1052C03.g	sucrose synthase		1	1	9.7101	88
944	SCEZSB1093D09.g	Sulfite oxidase OS	Arabidopsis thaliana	1	2	46.759	426
945	SCCCCL3001F06.g	Sulfite oxidase; Moco-containing protein AtMCP		1	1	14.594	124
946	SCCCLR1024E11.g	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 OS	Zea mays	1	4	25.323	229
947	SCCCLR1048A06.g	superoxide dismutase		3	5	26.391	244
948	SCCCLR2C03D05.g	superoxide dismutase		1	2	51.743	478
949	SCCCRZ1C01D04.g	T-complex protein 1 subunit beta; TCP-1-beta;		1	1	35.647	320
950	SCCCCL4002B05.g	T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)		1	5	28.234	274
951	SCCCCL4003F01.g	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5		1	2	30.702	290
952	SCEZLR1009F06.g	TCA		1	2	19.375	176
953	SCEZLB1013G07.g	Thaumatococcus-like protein OS	Arabidopsis thaliana	1	1	44.164	414
954	SCAGLR1021H06.g	Thiol protease SEN102 OS	Hemerocallis sp.	1	4	26.353	241
955	SCCCLR2001H09.g	Thioredoxin H-type OS	Triticum aestivum	10	2	24.397	222
956	SCCCRZ2001C01.g	Thioredoxin H-type OS	Triticum aestivum	1	2	20.018	185
957	SCRFLB1054G11.g	Thioredoxin H2-2 OS	Oryza sativa subsp. japonica	2	4	37.461	340
958	SCCCLR1066H08.g	Thioredoxin		1	3	27.888	245
959	SCRFLB1056D04.g	thioredoxin		1	1	15.744	143
960	SCCCHR1002F08.g	Thymus-specific serine protease; Serine protease 16;		1	3	93.429	848
961	SCJLRT1019E02.g	Thymus-specific serine protease; Serine protease 16;		2	4	21.982	210
962	SCCCLR1076H07.g	TIM21-like protein, mitochondrial OS	Bos taurus	1	1	7.4624	68
963	SCCCLB1025H11.g	TOM1-like protein 2; Target of Myb-like protein 2		1	2	21.278	198
964	SCRLAM1006C11.g	TOM1-like protein 2; Target of Myb-like protein 2		1	2	25.392	241
965	SCCCRZ1004B05.g	Topless-related protein 1 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	40.754	372
966	SCEQRT2099E03.g	TPA: putative threonine aldolase family protein isoform 1	Zea mays	1	2	27.672	263
967	SCCCLR1024A05.g	Transaldolase OS		1	3	18.688	180
968	SCVPLB1018F09.g	Transcription factor BTF3 OS		1	1	19.904	188
969	SCAGLR2011E07.g	Transcription factor BTF3		1	1	22.501	207
970	SCJFLR1073B11.g	Transcription factor BTF3		1	8	37.485	345
971	SCUTRZ3071D08.g	Transcription factor Pur-alpha 1 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	16.723	155
972	SCCCCL3003A08.b	Transketolase, chloroplastic OS	Zea mays	1	1	35.425	336
973	SCEZLR1031E10.g	Translationally-controlled tumor protein homolog OS	Zea mays	1	2	22.504	204
974	SCQGLR2017B05.g	Transmembrane protein 214-A		1	4	20.49	189
975	SCRFLR2034G09.g	Triosephosphate isomerase, cytosolic OS	Zea mays	2	2	11.978	110
976	SCMCST1051A04.g	Tripeptidyl-peptidase 2 OS	Homo sapiens	1	6	37.96	352
977	SCQGR1039H01.g	Tripeptidyl-peptidase 2; Tripeptidyl-peptidase II		1	2	53.173	463
978	SCRLAM1014G04.g	tRNA nucleotidyltransferase, mitochondrial		1	9	35.293	314
979	SCEZLB1010A08.g	tRNA pseudouridine synthase 1 OS		2	2	21.433	192
980	SCEPAM1015B01.g	Tryptophanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.2)		1	11	20.126	192
981	SCCCRZ2002C09.g	Tubulin alpha-1 chain OS	Eleusine indica	1	3	23.604	217
982	SCEQRT2025E08.g	Tubulin alpha-2 chain (Alpha-2-tubulin)		1	2	15.324	153
983	SCCCCL3001C07.b	Tubulin alpha-3 chain OS	Hordeum vulgare	1	2	79.275	725
984	SCCCLR1C07G05.g	Tubulin alpha-6 chain OS	Zea mays	1	3	42.812	400
985	SCVPLR1049D05.g	Tubulin beta-3 chain OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	1	57.899	519
986	SCJLLR1054B02.g	Tubulin beta-5 chain OS	Zea mays	1	2	34.245	329
987	SCEZLB1009D02.g	U2 small nuclear ribonucleoprotein A; U2 snRNP-A		1	1	25.088	239
988	SCEZLR1031H11.g	U2 small nuclear ribonucleoprotein B		1	9	20.895	188
989	SCSGFL1083D09.g	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2 OS		1	3	13.647	130
990	SCCCLR2002D01.g	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3		1	2	36.457	337
991	SCRLAM2051E04.g	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM5 OS		1	3	22.138	202

Continuação Anexo 2.

992	SCVPLR2027B10.g	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6		1	2	32.251	308
993	SCBGR73075H03.g	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	50.318	466
994	SCCCL2001C05.b	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog		1	2	41.545	382
995	SCRLR1131E01.g	Ubiquitin OS	Triticum aestivum	1	9	36.224	327
996	SCEZLB1014D11.g	Ubiquitin thioesterase OTU1		1	1	38.065	335
997	SCCCLB1004H02.g	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 OS	Triticum aestivum	1	4	44.727	424
998	SCCCLR1C07A06.g	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 11 OS	Arabidopsis thaliana	1	6	20.85	182
999	SCCCRZ2C04H01.g	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1C OS	Arabidopsis thaliana	1	3	16.601	148
1000	SCCST2001G12.g	Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase OS	Arabidopsis thaliana	2	2	27.273	258
1001	SCAGRT3050B06.g	Ubiquitin-like protein SMT3 OS	Oryza sativa subsp. japonica	3	25	39.753	355
1002	SCSFRT2068D06.g	Uclacyanin-2 OS	Arabidopsis thaliana	1	2	19.787	193
1003	SCCCRZ2001D09.g	UDP-D-glucuronate decarboxylase		1	10	35.507	343
1004	SCJFLR1013H10.g	UDP-glucose dehydrogenase		1	1	45.05	403
1005	SCQGLR1019G02.g	UDP-glucose dehydrogenase		2	7	59.778	544
1006	SCJLRT2051F02.g	UDP-glucose pyrophosphorylase		1	2	25.771	228
1007	SCQGLR1062D04.g	UDP-glucose pyrophosphorylase		1	1	23.72	227
1008	SCEZAM2031D12.g	UDP-sugar pyrophosphorylase		1	1	39.505	348
1009	SCCCL3002C05.b	Uncharacterized basic helix-loop-helix protein At1g06150	Arabidopsis thaliana	1	2	19.169	175
1010	SCCCLR1048C12.g	Uncharacterized glycosyltransferase At1g55740		1	5	19.679	181
1011	SCBFRZ2017F08.g	Uncharacterized protein At2g17340		6	19	48.016	423
1012	SCQGLR1085C12.g	Uncharacterized protein At2g34160		1	9	66.952	597
1013	SCRLFL8053A03.g	Uncharacterized protein At2g39795, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	1	3	23.285	226
1014	SCCCL4006D02.g	Uncharacterized protein At3g15000, mitochondrial OS	Arabidopsis thaliana	1	4	43.306	402
1015	SCJLRT1021E02.g	Uncharacterized protein At3g48680, mitochondrial		1	1	44.025	399
1016	SCQSLB1052C11.g	Uncharacterized protein At4g06744 OS	Arabidopsis thaliana	3	4	23.163	223
1017	SCMCST1057F02.g	Uncharacterized protein At4g06744;		2	2	56.071	514
1018	SCRULB1059D03.g	Uncharacterized protein At4g28440 OS	Arabidopsis thaliana	4	3	24.734	246
1019	SCAGLR1064D02.g	Uncharacterized protein At5g01610 OS	Arabidopsis thaliana	2	13	34.28	301
1020	SCCCL1001B08.b	Uncharacterized protein At5g01610 OS	Arabidopsis thaliana	1	3	60.5	532
1021	SCCCL1004C12.g	Uncharacterized protein At5g01610 OS	Arabidopsis thaliana	1	4	99.376	894
1022	SCEPAM2057B02.g	Uncharacterized protein At5g22580 OS	Arabidopsis thaliana	1	5	37.592	340
1023	SCJFLR1035G04.g	Uncharacterized protein At5g39570		1	4	42.787	394
1024	SCSGHR1072H03.g	Uncharacterized protein DDB_G0288155 OS	Dictyostelium discoideum	3	6	70.154	637
1025	SCJLLR1054C04.g	Uncharacterized protein DDB_G0288155 OS	Dictyostelium discoideum	2	10	23.764	200
1026	SCJLRT2049D12.g	uncharacterized protein LOC100276726	Zea mays	1	3	19.49	180
1027	SCBGLF4048C01.g	Uncharacterized protein Os08g0359500 OS	Oryza sativa subsp. japonica	1	5	43.977	401
1028	SCVPLR2012D11.g	Uncharacterized protein YML050W OS	Saccharomyces cerevisiae	2	4	18.861	173
1029	SCQGLB1038H08.g	Uncharacterized RNA-binding protein C23E6.01c		3	15	44.576	402
1030	SCQSST1038C02.g	undefined		2	6	80.454	737
1031	SCCCRZ2001C11.g	Universal stress protein A-like protein		4	15	104.45	929
1032	SCCCLR1066F11.g	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial OS	Bos taurus	1	2	21.415	206
1033	SCRFRL1055F07.g	UPF0424 protein OS	Dictyostelium discoideum	1	5	77.211	690
1034	SCJLST1019C10.g	UPF0555 protein KIAA0776		1	2	32.493	293
1035	SCSGLR1045A02.g	Urease (EC 3.5.1.5) (Urea amidohydrolase)		1	2	25.037	231
1036	SCAGLR1043D04.g	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS	Daucus carota	4	3	27.961	251
1037	SCQGR1039F06.g	V-type proton ATPase subunit B 1; V-ATPase subunit B 1		1	2	24.137	222
1038	SCVPRZ2039D07.g	V-type proton ATPase subunit C; V-ATPase subunit C		1	2	41.685	389
1039	SCCCLB1025B04.g	V-type proton ATPase subunit E OS	Citrus limon	1	2	17.965	174
1040	SCEQLR1091F08.g	V-type proton ATPase subunit F OS	Arabidopsis thaliana	4	3	38.952	395
1041	SCBGLR1082H03.g	V-type proton ATPase subunit G 1 OS	Nicotiana tabacum	1	1	4.4131	39
1042	SCQSLR1018F01.g	Vacuolar protein sorting-associated protein 29		2	4	52.97	475
1043	SCQGLR1086C02.g	Vacuolar-processing enzyme OS	Citrus sinensis	2	3	33.736	305
1044	SCSFRT2072D01.g	Vacuolar-sorting receptor 1 precursor (AtVSR1)		1	2	48.951	431
1045	SCCCL4008F12.g	Valyl-tRNA synthetase OS	Arabidopsis thaliana	1	7	56.041	511
1046	SCBFLR1039G10.g	VAMP-like protein YKT61 OS	Arabidopsis thaliana	3	4	45.327	416
1047	SCEQRT1033D01.g	vegetative storage protein (acid phosphatase)		1	5	23.852	225
1048	SCEQLB1067F01.g	vegetative storage protein		4	3	69.501	645
1049	SCJLRT1017E07.g	Vesicle-associated membrane protein 711		1	13	39.285	345
1050	SCSGSB1009F10.g	Vesicle-associated membrane protein 725 OS	Arabidopsis thaliana	1	18	121.03	1102
1051	SCJLST1022F12.g	Vesicle-fusing ATPase		1	10	71.176	648
1052	SCCCL4009B07.g	Villin-2		1	8	64.042	597
1053	SCCCL4004D02.g	Villin-4		2	13	94.441	851
1054	SCCCL4005G09.g	Villin-4		1	3	54.074	517
1055	SCCCLR1024E02.g	Water stress		1	10	84.244	762
1056	SCCCLR1067B04.g	Water stress		2	4	31.561	276
1057	SCCCLR1C01B10.g	Water stress		1	2	51.47	469
1058	SCCCLRT1002F07.g	Water stress		5	9	50.366	457
1059	SCCCRZ2002D07.g	Water stress		2	4	31.669	277
1060	SCEPRZ1010F04.g	Water stress		2	7	40.802	381
1061	SCJFRT1009F06.g	Water stress		2	6	37.215	335
1062	SCEZLB1010A03.g	Water stress		1	10	35.487	330
1063	SCJFRZ1007A10.g	Water stress		1	5	30.614	305
1064	SCJLLR1033F07.g	Water stress		1	4	18.269	179
1065	SCSFRT2069E03.g	Water stress		1	5	44.774	409
1066	SCSGAD1143E07.g	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS	Bos taurus	4	21	71.017	666

Continuação Anexo 2.

1067	SCCCAM1002E08.g	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS	Rattus norvegicus	1	1	22.864	215
1068	SCCCFL1001E01.g	Xylem cysteine proteinase 2 OS	Arabidopsis thaliana	2	15	77.514	716
1069	SCCCCL3140B03.g	Xylose isomerase		1	1	18.92	181
1070	SCRURT2012C09.g	Zeamatin OS	Zea mays	1	3	24.084	216
1071	SCCCLB1002C04.g	zinc finger protein/alfin-like		1	5	21.335	201
1072	SCCCCL3003B06.b			2	11	39.421	364
1073	SCCCST2001A03.g			1	6	29.801	263
1074	SCEPAM1021H07.g			7	9	22.95	218
1075	SCEPAM2055E11.g			1	7	32.151	299
1076	SCEQAM2039A03.g			1	2	46.776	414
1077	SCEQRT2096H01.g			1	2	19.539	188
1078	SCEZLR1052D03.g			4	7	51.075	449
1079	SCQSFL3033G08.g			3	4	23.084	222
1080	SCRULB1060E05.g			1	3	65.041	577
1081	SCSF5B1103F04.g			2	3	48.752	436
1082	SCVPRT2084B02.g			2	3	64.07	592

Anexo 3. A distribuição quantitativa relativa dessas 525 proteínas entre os segmentos é apresentado, na qual observa-se que a razão entre os segmentos 1 e 2 (1/2) foi distinta em relação aos demais segmentos, com muitas proteínas que aumentam em abundância relativa do segmento 1 para o 2. É possível visualizar a separação em 2 *clusters* do *heatmap* que distinguem 1/2 do restante das razões entre os segmentos, em vermelho as proteínas que estão mais expressas na razão entre 1/2 e em verde as que estão menos expressas nesta transição. Grandes diferenças ocorrem entre os segmentos 1/2, principalmente pelo aumento de expressão de proteínas no segmento 2 que mantém-se em altos níveis na transição 2/3 bem como nas transições posteriores (observado pela área inferior do *heatmap* dominada pela cor verde).

Anexo 3. *Heatmap* com 525 proteínas identificadas nas raízes de cana – razões normalizadas (Z-score) entre os segmentos 1/2, 2/3, 3/4 e 4/5 (n=5). Agrupamento hierárquico seguindo a média euclidiana das razões entre os segmentos. Linhas indicam proteínas individuais que são coloridas de acordo com a densidade das proteínas e suas razões.

Anexo 4. Valores absolutos das razões entre as proteínas de parede celular encontradas nos diferentes segmentos das raízes de cana de açúcar. Valores representam a mediana entre 5 réplicas amostrais e valores de P significativos são apresentados em negrito (P>0.05) obtidos pelo software de montagem e quantificação Maxquant e de estatística Perseus. Termos GO (processo biológico, componente celular e função molecular) foram obtidos com as ferramentas do software Blast2GO.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5						
1	SCCCCL6004H11.g	Alpha-amylase type A isozyme OS=Hordeum vulgare GN=AMY1.1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	0.325	0.466	0.695	0.899	0.006	response to abscisic acid stimulus ;response to gibberellin stimulus;starch catabolic process	apoplast;chloroplast stroma	alpha-amylase activity;cation binding	alpha-amylase [EC:3.2.1.1];E3.2.1.1
2	SCQSRT2034G08.g	Alpha-galactosidase(UNIPROT)	0.757	0.671	0.728	1.432	0.353	fintra-Golgi vesicle-mediated transport; root hair elongation; starch biosynthetic process	apoplast;plant-type cell wall;vacuole	alpha-galactosidase activity	alpha-galactosidase [EC:3.2.1.22];E3.2.1.22B
3	SCQSRT1034D03.g	Alpha-L-arabinofuranosidase(UNIPROT)	0.292	0.561	0.802	1.101	0.000	glucuronoxylan metabolic process; L-arabinose metabolic process; xylan biosynthetic process; xylan catabolic process	apoplast;plant-type cell wall;vacuole	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	alpha-N-arabinofuranosidase [EC:3.2.1.55];E3.2.1.55
4	SCBFLR1083E01.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)(UNIPROT)	0.445	0.810	1.124	1.020	0.001	cell adhesion;cell wall organization; cysteine biosynthetic process; mannose metabolic process; root hair cell differentiation; trichome morphogenesis	apoplast;chloroplast;cytosol;plant-type cell wall;vacuolar membrane	alpha-mannosidase activity;carbohydrate binding	alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24];E3.2.1.24
5	SCBGLR1003C11.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)(UNIPROT)	0.255	0.507	1.247	1.139	0.000	mannose metabolic process		carbohydrate binding;mannosidase activity	alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24];E3.2.1.24
6	SCMCCL6051E03.g	Alpha-mannosidase (GH family 38)(UNIPROT)	0.316	1.126	0.663	0.913	0.026	cell adhesion; cell wall organization; cysteine biosynthetic process; mannose metabolic process; root hair cell differentiation; trichome morphogenesis	apoplast;chloroplast;cytosol;plant-type cell wall;vacuolar membrane	alpha-mannosidase activity;carbohydrate binding;zinc ion binding	
7	SCEQRT1025C10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.218	0.718	0.948	0.917	0.000	anatomical structure form. involved in morphogenesis;carbohydrate metabolic processorgan development;organelle organization;post-embryonic development;	anchored to plasma membrane;plant-type cell wall	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	
8	SCEZHR1088G11.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.468	1.111	1.107	1.157	0.004	asymmetric cell division; auxin polar transport; carbohydrate metabolic process; cellular response to organic substance; cellular response to oxygen-containing compound; regulation of cell size; regulation of meristem growth; root morphogenesis	anchored to plasma membrane;endoplasmic reticulum;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity	
9	SCJFRT1008G05.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.966	0.502	0.712	0.900	0.020	carbohydrate metabolic process; regulation of innate immune response; regulation of programmed cell death;response to bacterium; response to cold	anchored to plasma membrane;apoplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	beta-glucosidase activity;cellulase activity;protein binding	
10	SCRFAM2071E02.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.856	0.833	0.957	0.766	0.241	carbohydrate metabolic process; cell communication; regulation of cellular process; regulation of gene expression, epigenetic; response to organic substance; response to oxygen-containing compound	anchored to plasma membrane;cell wall;cytoplasmic part;nucleus;plasmodesma	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	
11	SCRFLR1055B07.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	1.431	0.978	1.160	1.157	0.278	cytokinin mediated signaling pathway	plasma membrane		
12	SCRURT2006B10.g	beta-1,3-glucanase Glycosyl hydrolases family 17(UNIPROT)	0.963	0.921	0.826	0.805	0.605	carbohydrate metabolic process;gene silencing; multicellular organismal development; organelle organization	anchored to membrane;cell wall;plasma membrane;plasmodesma	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	
13	SCCCCL4001H11.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.293	0.742	0.770	1.047	0.000	alcohol biosynthetic process; carbohydrate metabolic process;catabolic process; cell wall biogenesis; developmental cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; hydrogen peroxide metabolic process; plant-type cell wall modification; regulation of biological process	apoplast;cytosol;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity;carbohydrate binding	
14	SCCCCL6004H07.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.821	1.674	0.322	0.982	0.000	biological regulation; carbohydrate metabolic process; cellular biosynthetic process ;cellular process involved in reproduction; plant-type cell wall organization	apoplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity	
15	SCEPRT2044F09.g	Beta-galactosidase(UNIPROT)	0.899	1.457	0.350	1.160	0.000	carbohydrate metabolic process; cellular cation homeostasis; cellular modified amino acid biosynthetic process; divalent metal ion transport; hydrogen peroxide catabolic process; plant-type cell wall biogenesis; plant-type cell wall modification; polyamine catabolic process; regulation of meristem growth; response to karrikin; root hair elongation	apoplast;cytosol;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	beta-galactosidase activity	
16	SCCCCL4009F05.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)(UNIPROT)	0.464	1.011	1.043	1.044	0.000	arabinan catabolic process; response to arsenic-containing substance;seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	beta-D-xylosidase 4 [EC:3.2.1.37];XYL4
17	SCQSAM1030G04.g	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase (GH family 3)(UNIPROT)	0.580	0.892	0.961	0.905	0.279	arabinan catabolic process; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	
18	SCVPRT3086D06.g	cell wall invertase(UNIPROT)	1.709	1.037	0.923	1.441	0.024	biological regulation;cellular response to gibberellin stimulus;defense response;immune system process; plant-type cell wall modification; response to bacterium; starch metabolic process;sucrose catabolic process	cell wall;extracellular region;plant-type vacuole;plasma membrane	inulinase activity;levanase activity;sucrose alpha-glucosidase activity	beta-fructofuranosidase [EC:3.2.1.26];E3.2.1.26

Continuação Anexo 4.

	SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
			seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
19	SCCCLR2C01H02.g	Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase OS=Zea mays PE=1 SV=1 (UNIPROT)	1.208	1.001	1.328	0.696	0.083	glycolysis;Golgi organization;hyperosmotic response;response to cadmium ion;response to salt stress;response to temperature stimulus;water transport	apoplast;cytosol;nucleus;plasma membrane	hydrolase activity	carboxymethylenebutenolide dase [EC:3.1.1.45];E3.1.1.45
20	SCVPRT2081E09.g	Endo-1,3(4)-beta-glucanase 1;Endo-1,4-beta-glucanase 1;Endo-1,3-beta-glucanase 1;Laminarinase-1;(UNIPROT)	0.591	0.757	0.814	1.118	0.052	amino acid import;cell wall macromolecule catabolic process;endoplasmic reticulum unfolded protein response;ER to Golgi vesicle-mediated transport;N-terminal protein myristoylation		glucan endo-1,3-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group;glucan endo-1,4-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group	
21	SCCCCL4006H09.g	Expansin(UNIPROT)	1.387	0.923	1.251	1.163	0.746	cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; plant-type cell wall modification; sexual reproduction; trichoblast differentiation	extracellular region; Golgi apparatus; plant-type cell wall; plasmodesma		
22	SCSGLV1004F11.g	Expansin(UNIPROT)	0.943	1.243	0.981	0.797	0.195	organelle organization; plant-type cell wall loosening; plant-type cell wall modification involved in multidimensional cell growth; regulation of stomatal movement; response to gibberellin stimulus; response to red light; syncytium formation; unidimensional cell growth	chloroplast;cytosol;extracellular region;plant-type cell wall;plasmodesma	structural constituent of cell wall	
23	SCEPLR1051B04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.828	1.034	0.845	1.046	0.265	alcohol biosynthetic process; cell growth; cellular component organization; plant-type cell wall organization or biogenesis; regulation of hormone levels;shoot system development; single-organism transport; steroid biosynthetic process; trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane;cell wall;vacuolar membrane		
24	SCQGRT1040D08.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	2.209	1.195	2.255	0.733	0.471	alcohol biosynthetic process;biological regulation;secondary cell wall biogenesis;steroid biosynthetic process;trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane; Golgi apparatus; plant-type cell wall; plasmodesma		
25	SCQSLR1040G04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.490	1.365	1.159	1.138	0.007	acetyl-CoA metabolic process; brassinosteroid biosynthetic process; cell growth; plant-type cell wall organization; regulation of meristem growth; root development; secondary cell wall biogenesis; sterol biosynthetic process	anchored to plasma membrane; cell wall; cytoplasmic part; intracellular membrane-bounded organelle		
26	SCRFLR1034D04.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.486	1.074	1.472	1.133	0.002	brassinosteroid biosynthetic process;cell growth;secondary cell wall biogenesis;trichoblast differentiation	anchored to plasma membrane;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma		
27	SCVPRZ2036F10.g	Fasciclin-like arabinogalactan protein(UNIPROT)	0.598	0.955	1.158	0.973	0.198	acetyl-CoA metabolic process;brassinosteroid biosynthetic process;cell growth; plant-type cell wall organization; regulation of meristem growth; root development; secondary cell wall biogenesis; sterol biosynthetic process	anchored to plasma membrane;cell wall;cytoplasmic part;intracellular membrane-bounded organelle		
28	SCCCCL4011H08.g	Fructose and Mannose Metabolism(UNIPROT)	2.331	1.276	2.448	0.509	0.000	acetyl-CoA biosynthetic process; cellular response to phosphate starvation;chromatin silencing; embryo development ending in seed dormancy; fructose 6-phosphate metabolic process;galactolipid biosynthetic process; glycolysis; histone H3-K9 methylation;photosynthesis; response to cadmium ion;response to fructose stimulus; response to glucose stimulus; response to sucrose stimulus	cell wall;cytosol;membrane;pyrophosphate-dependent phosphofructokinase complex, beta-subunit complex	6-phosphofructokinase activity;ATP binding;diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity	E2.7.1.90;pyrophosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase [EC:2.7.1.90]
29	SCCCLR1048B08.g	Fructose and Mannose Metabolism(UNIPROT)	1.422	0.939	0.873	1.059	0.754	aerobic respiration; calcium ion transport; cysteine biosynthetic process; gluconeogenesis; Golgi organization; hyperosmotic response; pentose-phosphate shunt; photorespiration ;primary root development; regulation of protein localization; response to cadmium ion; response to misfolded protein; response to salt stress ;response to temperature stimulus; water transport	apoplast; cell wall; chloroplast envelope; chloroplast stroma; cytosol; Golgi apparatus; mitochondrion; plasma membrane; plasmodesma; thylakoid; vacuolar membrane	copper ion binding;triose-phosphate isomerase activity	TPI;triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1]
30	SCEPRZ1009B12.g	Fructose and Mannose Metabolism(UNIPROT)	1.785	0.831	0.977	0.878	0.002	aerobic respiration; calcium ion transport; cysteine biosynthetic process; gluconeogenesis; Golgi organization; hyperosmotic response; pentose-phosphate shunt; photorespiration ;primary root development; regulation of protein localization; response to cadmium ion; response to misfolded protein; response to salt stress ;response to temperature stimulus; water transport	apoplast; cell wall; chloroplast envelope; chloroplast stroma; cytosol; Golgi apparatus; mitochondrion; plasma membrane; plasmodesma; thylakoid; vacuolar membrane	copper ion binding;triose-phosphate isomerase activity	TPI;triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1]

Continuação Anexo 4.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5						
31	SCCCRZ1001D04.g	Galactose metabolism(UNIPROT)	1.127	1.283	1.449	0.701	0.022	cellular calcium ion homeostasis; defense response to bacterium; detection of gravity; galactose catabolic process; plant-type cell wall organization; polysaccharide catabolic process; positive regulation of catalytic activity; response to cadmium ion;response to cold; response to nitrate; response to salt stress; starch biosynthetic process; trehalose biosynthetic process	apoplast; chloroplast envelope; chloroplast stroma ;cytosol; mitochondrion; nucleus; plasma membrane	magnesium ion binding;phosphoglucomutase activity	pgm;phosphoglucomutase [EC:5.4.2.2]
32	SCAGLR1021F11.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.416	0.526	0.718	0.823	0.000	carbohydrate metabolics ;cellular response to cold; defense response by callose deposition in cell wall; defense response to fungus; induced systemic resistance; negative regulation of defense response; response to salt stress; response to symbiotic fungus	apoplast ;chloroplast envelope; cytosolic ribosome; endoplasmic reticulum; ER body; Golgi apparatus; membrane ;nucleus; peroxisome; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;copper ion binding;fucosidase activity;phosphatidic acid binding;protease binding	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];E3.2.1.21
33	SCCCCL3001B10.b	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.508	0.923	0.968	1.276	0.000	carbohydrate metabolic process; cellular response to ethylene stimulus; cellular response to iron ion;cellular response to nitric oxide; lignin biosynthetic process; pollen tube growth; regulation of cellular process; response to carbohydrate stimulus; response to other organism; response to salt stress	apoplast;chloroplast;cytosolic ribosome;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;coniferin beta-glucosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIB
34	SCEQHR1082B01.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	1.681	0.537	0.659	0.833	0.000	carbohydrate metabolic process; glucosinolate metabolic process; pollen tube growth; response to other organism; response to salt stress	apoplast ;chloroplast; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;esculin beta-glucosidase activity;thioglucoisidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];E3.2.1.21
35	SCEQLB1066E08.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.663	1.035	1.125	0.869	0.192	carbohydrate metabolic process; cellular component organization; cellular response to ethylene stimulus; lignin biosynthetic process; response to carbohydrate stimulus	apoplast;chloroplast;cytosolic ribosome;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIB
36	SCJFLR1017E03.g	Glycosyl hydrolase family 1(UNIPROT)	0.700	1.093	1.129	1.083	0.168	carbohydrate metabolic process; cellular response to ethylene stimulus; lignin biosynthetic process	apoplast ;chloroplast; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	beta-mannosidase activity;cellobiose glucosidase activity;coniferin beta-glucosidase activity;esculin beta-glucosidase activity	
37	SCAGRT2037A11.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.295	0.760	1.133	0.872	0.038	arabinan catabolic process; regulation of meristem growth; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	
38	SCCCRT1002G03.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.525	0.748	1.179	1.136	0.009	arabinan catabolic process; response to chemical stimulus ;seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	beta-D-xylosidase 4 [EC:3.2.1.37];XYL4
39	SCCCSB1003H06.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.395	1.276	0.995	1.138	0.001	arabinan catabolic process; regulation of meristem growth; response to arsenic-containing substance; seed coat development; xylan catabolic process	apoplast;chloroplast;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity	
40	SCEZRZ3015A12.g	Glycosyl hydrolase family 3 protein (Xylosidase)(UNIPROT)	0.410	1.249	0.945	1.091	0.001	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	beta-D-xylosidase 4 [EC:3.2.1.37];XYL4
41	SCEQLR1093F09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein(UNIPROT)	0.780	0.877	1.013	1.432	0.001	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIX
42	SCEZLB1007A09.g	glycosyl hydrolase family 3 protein(UNIPROT)	0.728	1.014	0.765	0.892	0.500	carbohydrate metabolic process;cell wall organization or biogenesis;cellular	anchored to membrane; cytosol; extracellular region; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuole	xylan 1,4-beta-xylosidase activity	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21];bgIX
43	SCCCCL2001B11.b	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)(UNIPROT)	0.689	1.021	0.725	1.039	0.019	carbohydrate metabolic process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	chitinase [EC:3.2.1.14];E3.2.1.14
44	SCCCCL4003F09.g	Glycosyl hydrolases family 18 (probable chitinase or xylanase inhibitor)(UNIPROT)	0.765	1.004	0.836	1.231	0.662	carbohydrate metabolic process;cellular process;response to abiotic stimulus;response to stress;single-organism process		hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	chitinase [EC:3.2.1.14];E3.2.1.14
45	SCJLRT1020A08.g	Probable alpha-glucosidase Os06g0675700 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os06g0675700 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	0.669	1.098	0.690	1.259	0.613	plant-type cell wall biogenesis; plant-type cell wall organization; xylan catabolic process; xyloglucan metabolic process	apoplast; chloroplast; cytosol; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	alpha-N-arabinofuranosidase activity;xylan 1,4-beta-xylosidase activity;xyloglucan 1,6-alpha-xylosidase activity	alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20];malZ

Anexo 5. Razões entre as proteínas relacionadas a morte celular programada (PCD) encontradas nos diferentes segmentos das raízes de cana de açúcar. Valores representam a mediana entre 5 réplicas amostrais e valores de P significativos são apresentados em **negrito** (P>0.05). Termos GO (processo biológico, componente celular e função molecular) foram obtidos com as ferramentas do software Blast2GO.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	seg 1/2	Mediana das razões seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
1	SCACLR1057G08.g	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1;AHA1(UNIPROT)	1.448	0.777	1.707	0.613	0.012	protein folding; response to endoplasmic reticulum stress; response to heat;response to high light intensity; response to hydrogen peroxide	cytosol; nucleus	ATPase activator activity;chaperone binding	
2	SCRLRZ3042B09.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1 OS=Nepenthes gracilis GN=nep1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	1.977	0.969	0.920	1.307	0.006	cell wall modification; cellular metabolic process;defense response ;plant-type cell wall organization;proteolysis; regulation of cellular process; response to abscisic acid stimulus; response to karrikin; response to other organism; response to water deprivation	endoplasmic reticulum; extracellular region; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	aspartic-type endopeptidase activity	
3	SCCCLB1004B02.g	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial(UNIPROT)	0.383	0.887	1.351	1.386	0.002	ATP hydrolysis coupled proton transport; cell growth; cellulose metabolic process; dATP biosynthetic process from ADP; defense response to bacterium; DNA-dependent transcription, elongation; plant-type cell wall biogenesis; response to cold; response to oxidative stress	cell wall; chloroplast ATP synthase complex; Golgi apparatus; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; nucleolus; plasma membrane; ATPase complex, catalytic domain vacuolar membrane	ATP binding; cobalt ion binding; copper ion binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATPeF1A;F-type H+-transporting ATPase subunit alpha
4	SCCCRZ2001D06.g	ATP synthase subunit beta, mitochondrial;(UNIPROT)	0.840	0.968	0.982	0.892	0.161	ATP catabolic process; ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; carbohydrate metabolic process;defense response to fungus, incompatible interaction; DNA-dependent transcription, elongation; generation of precursor metabolites and energy; organelle organization; response to cold; response to oxidative stress	cell wall; chloroplast ATP synthase complex; cytosol;Golgi apparatus; mitochondrial respiratory chain complex I; nucleolus; plasma membrane; vacuolar membrane	ATP binding; cobalt ion binding;copper ion binding; poly(U) RNA binding;proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; zinc ion binding	ATPeF1B;F-type H+-transporting ATPase subunit beta [EC:3.6.3.14]
5	SCCCCL4015F12.g	Basic 7S globulin;S8g7S;Bg;Basic 7S globulin high kDa subunit;Basic 7S globulin low kDa subunit;(UNIPROT)	0.567	0.698	0.841	0.967	0.765	proteolysis	cell periphery	aspartic-type endopeptidase activity	
6	SCAGLB2046F01.g	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor (Protein RBBI3-3) (RBTI) (OSE727A)(UNIPROT)	0.239	0.637	1.248	1.406	0.000		extracellular region	serine-type endopeptidase inhibitor activity	
7	SCCCCL2001B01.b	calmodulin-binding protein(UNIPROT)	0.465	0.978	0.791	1.062	0.000	cellular component organization or biogenesis;D-xylose metabolic process;pollen germination;single-organism cellular process	endosome; extracellular space; Golgi apparatus; integral to membrane ;plasma membrane; trans-Golgi network	ATPase activity;calmodulin binding;guanosine-diphosphatase activity;inosine-diphosphatase activity;uridine-diphosphatase activity	APY1_2;apyrase [EC:3.6.1.5]
8	SCVPLR1049C09.g	calmodulin-binding protein(UNIPROT)	3.217	0.969	1.575	0.767	0.000	cell cycle process; cell division; cell wall organization; cytoplasmic transport; defense response to bacterium; Golgi vesicle transport; lateral root formation; maintenance of root meristem identity; meristem growth; meristem structural organization; organic substance transport; phosphorylation; phototropism; plant-type cell wall organization or biogenesis; pollen development; polysaccharide biosynthetic process; proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; proteasome core complex assembly; protein glycosylation; regulation of cellular component organization; regulation of gene silencing; response to cadmium ion ;response to heat; response to misfolded protein; RNA processing;root cap development; abscisic acid mediated signaling pathway; auxin mediated signaling pathway; defense response to fungus; jasmonic acid mediated signaling pathway; MAPK cascade; negative regulation of defense response; negative regulation of programmed cell death; regulation of plant-type hypersensitive response; response to bacterium; response to cold; response to heat; response to hydrogen peroxide; systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway	apoplast; cell wall; chloroplast thylakoid membrane; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; nuclear envelope; nucleolus; plasmodesma; proteasome regulatory particle, base subcomplex ;spindle	ATP binding;ATPase activity;calmodulin binding;identical protein binding	transitional endoplasmic reticulum ATPase;VCP
9	SCCCLR1070F12.g	calnexin(UNIPROT)	1.254	0.989	1.084	0.979	0.902	auxin mediated signaling pathway; calcium ion homeostasis ;cellular response to nitrogen starvation; defense response signaling pathway, resistance gene-independent; defense response to bacterium; plant-type hypersensitive response; response to cadmium ion; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to salt stress; salicylic acid mediated signaling pathway	chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	calnexin;CANX
10	SCSGST1072D03.g	Calreticulin OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os07g0246200 PE=1 SV=2 (UNIPROT)	3.429	1.193	1.144	0.797	0.000	auxin mediated signaling pathway; calcium ion homeostasis ;cellular response to nitrogen starvation; defense response signaling pathway, resistance gene-independent; defense response to bacterium; plant-type hypersensitive response; response to cadmium ion; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to salt stress; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	apoplast; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	CALR;calreticulin
11	SCEPLR1051D05.g	calreticulin(UNIPROT)	2.957	1.008	1.395	0.865	0.000	auxin mediated signaling pathway; calcium ion homeostasis ;cellular response to nitrogen starvation; defense response signaling pathway, resistance gene-independent; defense response to bacterium; plant-type hypersensitive response; response to cadmium ion; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to salt stress; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	apoplast; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	CALR;calreticulin
12	SCCCLR1048H09.g	Catalase isozyme 3 OS=Zea mays GN=CAT3 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	1.094	0.539	0.747	0.653	0.191	ammonium transport; cell redox homeostasis; cellular cation homeostasis; cellular response to nitrogen starvation; cellular response to phosphate starvation; cellular response to sulfate starvation; divalent metal ion transport; ER to Golgi vesicle-mediated transport; fatty acid beta-oxidation; hydrogen peroxide catabolic process ; negative regulation of programmed cell death; nucleotide transport; photoperiodism, photorespiration; protein import into peroxisome matrix; regulation of ion transport; regulation of plant-type hypersensitive response; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to cyclopentenone; starch metabolic process; systemic acquired resistance; toxin catabolic process; tryptophan catabolic process	apoplast; cell wall; cytosolic ribosome; mitochondrion; nucleus; peroxisome; plant-type vacuole membrane; plasma membrane; plasmodesma	arginine transmembrane transporter activity;catalase activity;cationic amino acid transmembrane transporter activity;cobalt ion binding;heme binding;L-glutamate transmembrane transporter activity;L-lysine transmembrane transporter activity;protein binding	catalase [EC:1.11.1.6];katE

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value					
13	SCCCLB1023F09.g	Cathepsin B (Fragment)(UNIPROT)	0.372	0.983	0.780	0.874	0.000	cell growth; cell morphogenesis ;fatty acid beta-oxidation; Golgi vesicle transport; proteolysis; regulation of catalytic activity; response to abiotic stimulus; response to inorganic substance; response to oxygen-containing compound ;response to stress	cytosol; extracellular region; vacuole	cysteine-type endopeptidase activity	cathepsin B [EC:3.4.22.1];CTSB
14	SCEQRT1025E03.g	Cystatin-1 precursor (Cystatin I) (Corn kernel cysteine proteinase inhibitor)(UNIPROT)	0.730	1.534	1.226	0.763	0.546	cellular response to cold; cellular response to heat; cellular response to water deprivation; hyperosmotic response; response to cadmium ion; response to oxidative stress; response to wounding	cell wall; cytosol; endoplasmic reticulum; extracellular region; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	cobalt ion binding;cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	
15	SCCCLR1022B11.g	cysteine protease 1 precursor [Zea mays](NCBI)	0.442	0.952	0.810	0.936	0.083	cell wall pectin metabolic process; cysteine biosynthetic process; defense response to fungus, incompatible interaction; developmental programmed cell death; gibberellic acid mediated signaling pathway; gibberellin biosynthetic process ;glucuronoxylan metabolic process; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response ;leaf senescence; plant-type cell wall cellulose metabolic process; proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to water deprivation; root hair elongation; water transport; xylan biosynthetic process	anchored to membrane; apoplast; cell wall; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; nucleus; plasmodesma; senescence-associated vacuole	calcium ion binding; cysteine-type peptidase activity; protein binding	
16	SCCCRZ2001D03.g	Cysteine proteinase 2 OS=Zea mays GN=CCP2 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0.405	0.933	0.865	1.031	0.075	calcium ion transport; cell wall polysaccharide metabolic process; cellular biosynthetic process; defense response to fungus; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response;organ development; organic substance biosynthetic process; proteolysis; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to fructose stimulus; response to gibberellin stimulus; water transport	apoplast; cell wall; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; plant-type vacuole; plasmodesma	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity; protein binding	cathepsin H [EC:3.4.22.16];CTSH
17	SCCCRZ3002G10.g	Cysteine proteinase inhibitor 8 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0429000 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0.783	0.491	0.739	0.889	0.000	cellular response to stress; response to inorganic substance; response to temperature stimulus	cell wall; cytosol; membrane; plasmodesma; vacuole	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	
18	SCCCLR1001H04.g	Cytochrome b-c1 complex subunit 7;Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein;Complex III subunit 7;Complex III subunit VII;CR14(UNIPROT)	0.403	1.200	1.389	1.252	0.007	aerobic respiration; glycolysis; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; photorespiration; proteasome core complex assembly; response to cadmium ion; response to misfolded protein; ubiquitin-dependent protein catabolic process	mitochondrial respiratory chain complex III; plastid; vacuolar membrane	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	QCR7;ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7
19	SCQGLR2025G04.g	Cytochrome b5(UNIPROT)	1.046	1.360	1.224	0.909	0.534	alkane biosynthetic process; cellular lipid catabolic process; defense response to bacterium; glucosinolate biosynthetic process; indoleacetic acid biosynthetic process; lateral root formation; nitrate assimilation; nitric oxide biosynthetic process; response to symbiotic fungus; root hair elongation; sterol biosynthetic process	chloroplast outer membrane; chloroplast thylakoid membrane; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; mitochondrion; plasma membrane ; vacuolar membrane	heme binding;nitrate reductase (NADH) activity;protein binding;sphingolipid delta-8 desaturase activity	
20	SCUTLR2023F06.g	Cytochrome c OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=CC-1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	2.783	1.101	0.644	0.812	0.072	cell proliferation; glucose catabolic process	cytosol; Golgi apparatus; mitochondrion; vacuolar membrane	copper ion binding; electron carrier activity; heme binding; iron ion binding	CYC;cytochrome c
21	SCCCLR1080A05.g	Cytochrome c oxidase subunit 6B OS=Schizosaccharomyces pombe GN=cox12 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	1.748	0.000	0.000	0.000	0.184	oxidation-reduction process; phosphatidylinositol biosynthetic process; photorespiration; response to salt stress	chloroplast thylakoid membrane; mitochondrion	copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	
22	SCUTLR1058A12.g	Cytochrome c1-1, heme protein, mitochondrial;Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit 1;Cytochrome c-1-1;Cytochrome b-c1 complex subunit 4-1;Complex III subunit 4-1;Complex III subunit IV-1;(UNIPROT)	0.260	0.993	0.959	1.304	0.001	aerobic respiration; pentose-phosphate shunt ;photorespiration; proteasome core complex assembly; response to cadmium ion; response to misfolded protein; response to salt stress; ubiquitin-dependent protein catabolic process	mitochondrial respiratory chain complex III; plasma membrane; vacuolar membrane	electron transporter, transferring electrons within CoQH2-cytochrome c reductase complex activity; heme binding; iron ion binding; protein binding	CYC1;ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit
23	SCJFLR1013A09.g	drought and cold response(UNIPROT)	1.683	0.529	0.962	1.139	0.211	cell development; cell wall organization or biogenesis; defense response to bacterium; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response; organ development; organic substance biosynthetic process; polysaccharide metabolic process; proteolysis; response to cadmium ion; response to desiccation; response to hormone stimulussing; water transport	apoplast; cell wall; cytosol; endoplasmic reticulum; nucleus; vacuole	calcium ion binding;cysteine-type endopeptidase activity; protein binding	cathepsin F [EC:3.4.22.41];CTSF
24	SCJFLR1073H09.g	enolase 1 [Zea mays](NCBI)	0.901	0.977	1.217	0.901	0.074	gluconeogenesis; glycolysis; pentose-phosphate shunt; photorespiration; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to light stimulus; response to salt stress; trichome morphogenesis	apoplast; chloroplast stroma ;mitochondrial envelope; nucleus; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane; plasmodesma	copper ion binding;DNA binding;magnesium ion binding;phosphopyruvate hydratase activity	ENO;enolase [EC:4.2.1.11]

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest		Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
25	SCCCRZ1002F06.g	Enolase 2 OS=Zea mays GN=ENO2 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	1.009	0.939	1.067	0.947	0.424	gluconeogenesis; glycolysis; pentose-phosphate shunt; photorespiration; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to light stimulus; response to salt stress; trichome morphogenesis	apoplast; chloroplast stroma; mitochondrial envelope; nucleus; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane; plasmodesma	copper ion binding;DNA binding;magnesium ion binding;phosphopyruvate hydratase activity	ENO;enolase [EC:4.2.1.11]
26	SCCCLR1070G05.g	Enolase-phosphatase E1 (2,3-diketo-5-methylthio-1-phosphopentane phosphatase) (MASA homolog)(UNIPROT)	0.852	0.898	0.978	1.020	0.087	L-methionine salvage from methylthioadenosine	chloroplast stroma; cytosol	acireductone synthase activity; magnesium ion binding	DEP1;methylthioribulose 1-phosphate dehydratase / enolase-phosphatase E1 [EC:4.2.1.109 3.1.3.77]
27	SCCCRT1C01G07.g	Germin-like protein 8-5 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os08g0189400 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0.215	0.471	0.661	1.019	0.015	amino acid import; ER to Golgi vesicle-mediated transport; GDP-L-fucose biosynthetic process; glucuronoxylan metabolic process; nitrate transport; regulation of root development; response to cold; response to endoplasmic reticulum stress; response to nitrate ;response to salt stres; xylan biosynthetic process	apoplast;extracellular matrix;nucleus;plant-type cell wall;plant-type vacuole;plasma membrane;plasmodesma	manganese ion binding;nutrient reservoir activity;oxalate oxidase activity	
28	SCCCRZ1002G01.g	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=Solenum lycopersicum GN=HSC-2 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	1.332	0.834	1.386	0.868	0.260	autophagy; defense response to bacterium; defense response to fungus; endoplasmic reticulum unfolded protein response; ER-associated protein catabolic process; gluconeogenesis; heat acclimation ;hyperosmotic salinity response ;negative regulation of seed germination; protein retention in ER lumen; protein targeting to chloroplast; response to cadmium ion; response to cold; response to high light intensity; response to hydrogen peroxide; response to virus; response to water deprivation; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	apoplast; cell wall; chloroplast envelope; cis-Golgi network; cytosolic ribosome; endoplasmic reticulum lumen; Golgi apparatus ;integral to membrane; mediator complex; mitochondrial matrix; nuclear matrix; nucleolus; plasma membrane; plasmodesma; thylakoid;vacuolar membrane	ATP binding;KDEL sequence binding;protease binding;receptor activity;ubiquitin protein ligase binding;zinc ion binding	heat shock 70kDa protein 1/8;HSPA1_8
29	SCJLLR1011E03.g	Heat shock protein 81-1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=HSP81-1 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	1.229	0.939	1.253	1.009	0.856	calcium-mediated signaling; cellular response to calcium ion; de-etiolation; defense response to bacterium, incompatible interaction; heat acclimation; organic substance biosynthetic process; protein secretion; protein stabilization; regulation of meristem growth; regulation of meristem structural organization; response to cadmium ion; response to chlorate;response to cold; response to hydrogen peroxide; response to mechanical stimulus; response to salt stress; response to water deprivation	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast stroma;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;mitochondrion;nucleolus;plasma membrane;plasmodesma;vacuolar membrane	ATP binding;ATPase activity;unfolded protein binding	htpG;molecular chaperone HtpG
30	SCCCLR2C02F10.g	Heat shock protein 81-3 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=HSP81-3 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	4.972	0.839	1.613	0.694	0.003	calcium-mediated signaling; cellular response to calcium ion; de-etiolation; defense response to bacterium, incompatible interaction; heat acclimation; organic substance biosynthetic process; protein secretion; protein stabilization; regulation of meristem growth; regulation of meristem structural organization; response to cadmium ion; response to chlorate;response to cold; response to hydrogen peroxide; response to mechanical stimulus; response to salt stress; response to water deprivation	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast stroma;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;mitochondrion;nucleolus;plasma membrane;plasmodesma;vacuolar membrane	ATP binding;ATPase activity;unfolded protein binding	htpG;molecular chaperone HtpG
31	SCBGRT3075F07.g	Jasmonate(UNIPROT)	0.923	1.056	0.950	0.716	0.042	jasmonic acid biosynthetic process; leaf senescence; oxidation-reduction process; oxylipin metabolic process ;response to cadmium ion; response to fungus;response to hormone stimulus; response to ozone; response to salicylic acid stimulus; response to wounding; signal transduction	cytosol;peroxisome	12-oxophytodienoate reductase activity;FMN binding	12-oxophytodienoic acid reductase [EC:1.3.1.42];E1.3.1.42
32	SCJLRZ1024A04.g	Jasmonate(UNIPROT)	0.372	0.841	1.099	1.106	0.000	anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane;plasma membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5
33	SCCCCL4013D09.g	jasmonic acid(UNIPROT)	0.937	1.080	1.210	0.939	0.579	abscisic acid mediated signaling pathway; hyperosmotic salinity response ;indoleacetic acid biosynthetic process; jasmonic acid biosynthetic process ;jasmonic acid mediated signaling pathway; leaf senescence; oxidation-reduction process; oxylipin metabolic process; response to auxin stimulus; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to fungus;response to ozone; response to salicylic acid stimulus;response to water deprivation; response to wounding; tryptophan catabolic process	cytosol;peroxisome	12-oxophytodienoate reductase activity;FMN binding	12-oxophytodienoic acid reductase [EC:1.3.1.42];E1.3.1.42
34	SCCCRT1001E01.g	jasmonic acid(UNIPROT)	0.756	1.107	1.413	1.246	0.000	anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
35	SCJFRT1007H07.g						anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process; cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process; lateral root formation; lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus; response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation; response to wounding	chloroplast envelope; chloroplast stroma; chloroplast thylakoid membrane; plasma membrane	iron ion binding; linoleate 13S-lipoxygenase activity; linoleate 9S-lipoxygenase activity; protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58]; LOX1_5
36	SCUTLR2030B03.g						anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process; cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process; lateral root formation; lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus; response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation; response to wounding	chloroplast envelope; chloroplast stroma; chloroplast thylakoid membrane; plasma membrane	iron ion binding; linoleate 13S-lipoxygenase activity; linoleate 9S-lipoxygenase activity; protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58]; LOX1_5
37	SCCCLR1072E07.g	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=APX1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)					cellular modified amino acid biosynthetic process; cold acclimation; embryo development ending in seed dormancy; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hydrogen peroxide mediated signaling pathway; hyperosmotic response; phenylpropanoid metabolic process; photorespiration; polyamine catabolic process; response to cadmium ion; response to endoplasmic reticulum stress; response to heat; response to salt stress; ubiquitin-dependent protein catabolic process; water transport	cell wall; chloroplast envelope; chloroplast stroma; chloroplast thylakoid membrane; cytosol; Golgi apparatus; mitochondrion; peroxisomal membrane; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	heme binding; L-ascorbate peroxidase activity	
38	SCBFRZ2017C11.g						cell communication; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to stimulus; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to organic substance; response to oxidative stress	apoplast; Golgi apparatus; nucleus; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuolar membrane	heme binding; peroxidase activity	E1.11.1.7; peroxidase [EC:1.11.1.7]
39	SCCCAD1001C08.g						anion transport; cell communication; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; nitrogen compound transport; organic substance transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of programmed cell death; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrogen compound; response to organic substance; response to oxidative stress; transition metal ion transport	apoplast; cytosol; Golgi apparatus; nucleus; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuolar membrane	heme binding; peroxidase activity; protein binding	E1.11.1.7; peroxidase [EC:1.11.1.7]
40	SCCCCL3002E11.b						cell communication; cellular component organization or biogenesis; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; organ development; oxidation-reduction process; primary metabolic process; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to organic substance; response to oxidative stress; single-organism developmental process; tissue development	apoplast; cytosol; Golgi apparatus; membrane; nucleus; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	heme binding; peroxidase activity; protein binding	E1.11.1.7; peroxidase [EC:1.11.1.7]
41	SCCCCL3003B02.b						aromatic compound biosynthetic process; catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response; flower development; ion transport; organ development; organic cyclic compound biosynthetic process; oxidation-reduction process; phenylpropanoid metabolic process; primary metabolic process; regulation of growth; response to nematode; response to oxidative stress; single-organism biosynthetic process; tissue development	apoplast; cytosol; Golgi apparatus; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	heme binding; peroxidase activity; protein binding	E1.11.1.7; peroxidase [EC:1.11.1.7]
42	SCCCCL4012A01.g						biological regulation; cellular metabolic process; cellular response to hypoxia; hyperosmotic salinity response; ion transport; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; primary metabolic process; response to cold; response to desiccation; response to other organism; response to oxidative stress; root development; tissue development	apoplast; cytosol; Golgi apparatus; membrane; nucleus; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	heme binding; peroxidase activity; protein binding	E1.11.1.7; peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value				
43	SCCCCL7C05F08.g	peroxidase(UNIPROT)	0.000	0.000	0.513	0.619	0.001 anion transport; cell communication; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin metabolic process; nitrogen compound transport; organonitrogen compound metabolic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to endogenous stimulus; response to nitrogen compound; response to organic substance; response to oxidative stress; response to oxygen-containing compound; transition metal ion transport; trichoblast differentiation	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
44	SCCCLB1004B09.g	peroxidase(UNIPROT)	0.534	0.881	0.901	1.423	0.000 brassinosteroid biosynthetic process; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; defense response to fungus; defense response to nematode; developmental growth; flower development; hyperosmotic salinity response; iron ion transport; lignin biosynthetic process ;mucilage extrusion from seed coat; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to oxidative stress; root hair cell differentiation	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;membrane;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
45	SCCCLR1C05G08.g	peroxidase(UNIPROT)	0.597	0.896	1.051	1.490	0.018 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; negative regulation of growth; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; response to salt stress; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
46	SCCCRT1001G12.g	peroxidase(UNIPROT)	0.546	0.980	1.008	1.095	0.000 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
47	SCEPRZ1011A06.g	peroxidase(UNIPROT)	0.926	1.461	1.071	1.052	0.195 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode ;flower development; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; negative regulation of growth;oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; response to salt stress; response to zinc ion; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
48	SCEQRT1024D03.g	peroxidase(UNIPROT)	0.714	0.991	1.091	1.182	0.340 cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress; trichoblast differentiation	apoplast;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
49	SCEQRT1024F02.g	peroxidase(UNIPROT)	0.577	0.899	1.132	1.423	0.000 brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to iron ion starvation; defense response to fungus; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport; lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; post-embryonic development; post-embryonic organ development; regulation of cellular process;respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to oxidative stress; root hair cell differentiation	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
50	SCEQRT1026F09.g	peroxidase(UNIPROT)	0.227	0.678	0.896	0.967	0.000 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; flower development; hyperosmotic salinity response; ion transport ;lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
51	SCEQRT1028D12.g	peroxidase(UNIPROT)	1.134	1.074	1.025	1.509	0.201 cell wall organization or biogenesis; cellular response to stress; organ development; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; phenylpropanoid metabolic process; primary metabolic process; response to abiotic stimulus;response to inorganic substance; response to oxidative stress	cell wall;extracellular region;membrane;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
52	SCEQRT1028H09.g	peroxidase(UNIPROT)	1.279	1.187	1.241	1.442	0.086 oxidation-reduction process; response to oxidative stress		heme binding; peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
53	SCEQRT2030A04.g	peroxidase(UNIPROT)	0.435	0.862	0.974	1.468	0.002 brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport;lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to other organism; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; xylan metabolic process	apoplast;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;membrane;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity;protein binding;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
54	SCEZRT2019F10.g	peroxidase(UNIPROT)	2.210726	0	0	0	0.099 brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport;lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to other organism; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; xylan metabolic process	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;protein binding;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
55	SCJFLR1035D05.g	peroxidase(UNIPROT)	0.1745353	0.537461	0.89681	1.1348	0.000 oxidation-reduction process; response to oxidative stress		heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
56	SCJFRZ2013F04.g	peroxidase(UNIPROT)	0.6049607	1.351096	0.86691	0.83831	0.780 cell communication; cellular response to stimulus; defense response to fungus; defense response to nematode; developmental growth; hyperosmotic salinity response; inorganic anion transport; lignin metabolic process; nitrogen compound transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; primary metabolic process; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation ;response to nitrogen compound; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; transition metal ion transport	apoplast;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
57	SCRFRZ3054A09.g	peroxidase(UNIPROT)	1.421403	0.947508	0.88698	1.4715	0.282			
58	SCRLAD1042E05.g	peroxidase(UNIPROT)	0.3969987	0.5287927	0.75238	1.1848	0.008 cell wall organization; cellular macromolecule metabolic process; immune response	anchored to plasma membrane;plasmodesma	chitin binding;peptidoglycan binding	
59	SCSBRZ2021C03.g	peroxidase(UNIPROT)	1.244447	1.346729	0.86173	1.3393	0.027 defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; primary metabolic process; reactive oxygen species metabolic process; response to cold; response to desiccation; response to light stimulus; response to oxidative stress; root development; tissue development; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
60	SCSFCL6068C11.g	peroxidase(UNIPROT)	1.07272	1.369544	1.0077	1.3085	0.492 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response;ion transport; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process;regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;membrane;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
61	SCSGRT2063H01.g	peroxidase(UNIPROT)	1.789549	0.9190332	0.82343	0.78835	0.007 aromatic compound biosynthetic process; catabolic process;cell wall organization or biogenesis; cellular response to stress; defense response; flower development;ion transport; lignin metabolic process; organ development; organic cyclic compound biosynthetic process; oxidation-reduction process;primary metabolic process; regulation of growth;response to chemical stimulus; response to nematode; response to oxidative stress; single-organism biosynthetic process; tissue development	membrane;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
62	SCUTHR1063E12.g	peroxidase(UNIPROT)	0.3937163	1.479859	0.9119	1.1751	0.001 cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response;ion transport; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process;regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
63	SCVPLB1020D03.g	peroxidase(UNIPROT)	0.5978715	0.8979079	0.8878	1.1197	0.024 anther development; cell wall organization or biogenesis;defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode;hyperosmotic salinity response; ion transport;negative regulation of growth; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; primary metabolic process; reactive oxygen species metabolic process; regulation of meristem growth;response to cold;response to desiccation; response to light stimulus; response to oxidative stress; unidimensional cell growth	apoplast;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
64	SCVPRZ2035F03.g	peroxidase(UNIPROT)	0.6488872	0.8270615	0.75067	1.1845	0.011 cellular metabolic process; organ development; organic substance metabolic process;oxidation-reduction process; primary metabolic process; response to abiotic stimulus; response to inorganic substance;response to other organism; response to oxidative stress;response to oxygen-containing compound; tissue development	cell wall;cytoplasmic part;extracellular region;intracellular membrane-bounded organelle	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value							
65	SCSGLR1045G11.g	Probable calcium-binding protein CML7 (Calmodulin-like protein 7)(UNIPROT)	0.6347594	1.328868	1.0029	0.62837	0.637	calcium-mediated signaling; cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; intracellular transport; membrane organization; organelle localization;response to cold; response to endogenous stimulus; response to mechanical stimulus; response to organic substance; response to water deprivation; root epidermal cell differentiation; starch metabolic process	cytosol;nucleus;plasma membrane;vacuolar membrane	calcium ion binding;protein binding;signal transducer activity	calcium-binding protein CML;CML
66	SCCCTR2002H05.g	Probable cytochrome c biosynthesis protein(UNIPROT)	0.6026275	0.966931	0.80907	1.0376	0.908				
67	SCVPRT2080B07.g	Protease inhibitor(UNIPROT)	0.269266	0.7713074	0.57397	1.0858	0.000	cellular component organization; cellular metabolic process; defense response; immune system process; organic substance metabolic process; response to chemical stimulus; response to other organism	cell part		
68	SCJLRT2051G07.g	Protease inhibitors(UNIPROT)	0.2314065	0.2357934	0.93793	0.68384	0.000	cellular component organization; defense response to bacterium, incompatible interaction; defense response to fungus, incompatible interaction; organ development; regulation of anthocyanin biosynthetic process; regulation of cellular metabolic process; regulation of defense response; regulation of macromolecule metabolic process; response to cadmium ion; response to organic substance; response to oxygen-containing compound; response to salt stress; response to UV-B; response to virus; signal transduction; systemic acquired resistance	apoplast;cell wall;membrane;vacuole		
69	SCVPRT2073B04.g	Protease inhibitors(UNIPROT)	0.4721213	0.3156566	0.79304	0.58405	0.008	cell wall organization or biogenesis; cellular component organization; defense response to fungus; induced systemic resistance; organ development; regulation of anthocyanin biosynthetic process; regulation of cellular metabolic process; regulation of defense response; regulation of macromolecule metabolic process; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to oxygen-containing compound; response to UV-B; response to virus; signal transduction; systemic acquired resistance	apoplast;cell wall;membrane;plasmodesma;vacuole		
70	SCEZLB1007G10.g	Serine carboxypeptidase 2 OS=Triticum aestivum GN=CBP2 PE=1 SV=2 (UNIPROT)	1.445818	0.8525149	1.2838	1.1874	0.838	brassinosteroid mediated signaling pathway; microtubule nucleation; proteolysis; second-messenger-mediated signaling	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
71	SCEZRZ3016H03.g	Serine carboxypeptidase II-3 OS=Hordeum vulgare GN=CXP;2-3 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0	0	0	0.80211	0.648	brassinosteroid mediated signaling pathway; cellular component organization; proteolysis	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
72	SCBFRZ2017A10.g	Serine carboxypeptidase-like OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=CBP31 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	1.904327	0.6492242	0.91579	1.1006	0.036	proteolysis	cytosol;extracellular region;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-IV;serine carboxypeptidase-like clade IV [EC:3.4.16.-]
73	SCCCLR1C01H05.g	Similar to Hordeum vulgare carboxypeptidase D (Putative carboxypeptidase D)(UNIPROT)	1.105131	1.208912	1.3226	1.1792	0.307	brassinosteroid mediated signaling pathway; microtubule nucleation; proteolysis; second-messenger-mediated signaling	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
74	SCJFRT2057F01.g	Subtilisin-like protease OS=Arabidopsis thaliana GN=ARA12 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	1.010601	0.8883361	0.93762	1.2203	0.134	alpha-amino acid metabolic process; carbohydrate derivative biosynthetic process;cellular amino acid biosynthetic process;cellular macromolecule metabolic process; lateral root morphogenesis; mucilage extrusion from seed coat; plant-type cell wall modification; proteolysis; regulation of cell proliferation; response to auxin stimulus	apoplast;cytosol;external side of plasma membrane;extracellular matrix;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	serine-type endopeptidase activity	
75	SCRFHR1007E04.g	Subtilisin-like protease OS=Arabidopsis thaliana GN=ARA12 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	0.9053051	0.9413537	1.032	1.0294	0.321	anther development; ion transport; lateral root morphogenesis; mucilage extrusion from seed coat; plant-type cell wall biogenesis and modification; polysaccharide metabolic process; proteolysis; regulation of cell proliferation; regulation of meristem growth; response to auxin stimulus; RNA splicing, via endonucleolytic cleavage and ligation	apoplast;cytosol;external side of plasma membrane;extracellular matrix;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	serine-type endopeptidase activity	
76	SCCCLR1024E11.g	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 OS=Zea mays GN=SODCC.1 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	1.124391	0.8681309	0.90466	0.7816	0.436	cellular response to copper ion; cellular response to ozone; cellular response to salt stress; cellular response to sucrose stimulus; cellular response to UV-B; defense response to bacterium; gene silencing by miRNA; oxidation-reduction process; removal of superoxide radicals; response to cadmium ion;response to iron ion; toxin catabolic process	apoplast;chloroplast stroma;cytosol;nucleus;peroxisome;thylakoid;vacuole	copper ion binding;protein binding;superoxide dismutase activity;zinc ion binding	SOD1;superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]
77	SCCCLR1048A06.g	Superoxide dismutase(UNIPROT)	1.047548	0.8683571	1.111	0.89888	0.043	aerobic respiration; defense response to bacterium; embryo development ending in seed dormancy; floral organ abscission; gibberellin acid mediated signaling pathway; gibberellin biosynthetic process; Golgi organization; hyperosmotic response; photorespiration; removal of superoxide radicals ;response to cadmium ion; response to salt stress; response to temperature stimulus; response to zinc ion; ubiquitin-dependent protein catabolic process; water transport	chloroplast stroma; mitochondrion;plastid nucleoid	copper ion binding;superoxide dismutase activity	SOD2;superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]
78	SCCCLR2C03D05.g	Superoxide dismutase(UNIPROT)	0.9465216	0.8791981	0.91927	0.74657	0.508	cellular response to copper ion; cellular response to ozone; cellular response to salt stress; cellular response to sucrose stimulus; cellular response to UV-B; defense response to bacterium; gene silencing by miRNA; oxidation-reduction process;removal of superoxide radicals; response to cadmium ion; response to iron ion; toxin catabolic process	apoplast; chloroplast stroma; cytosol;nucleus; peroxisome; thylakoid; vacuole	copper ion binding;protein binding;superoxide dismutase activity;zinc ion binding	SOD1;superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]

Continuação Anexo 5.

SAS - Sucest		Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
			seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5					
79	SCAGLR1021H06.g	Thiol protease SEN102 OS=Hemerocallis sp. GN=SEN102 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0.1775348	0.4066859	0.75073	0.97806	0.000	carboxylic acid biosynthetic process; cellular polysaccharide metabolic process; defense response to fungus, incompatible interaction; developmental programmed cell death;;Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response; leaf senescence; plant-type cell wall organization; proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to red light; response to temperature stimulus; response to water deprivation; water transport; xylan metabolic process	apoplast;cell wall; chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	CEP;KDEL-tailed cysteine endopeptidase [EC:3.4.22.-]
80	SCAGLR1043D04.g	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Daucus carota PE=2 SV=1 (UNIPROT)	1.581203	0.9007386	1.1196	1.0767	0.485	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP metabolic process; calcium ion transport; cell growth; cell morphogenesis; cytoskeleton organization; Golgi organization; Golgi vesicle transport;hyperosmotic response; pentose-phosphate shunt; proteasomal protein catabolic process; regulation of biological quality; regulation of cellular process; response to cadmium ion; response to salt stress; response to temperature stimulus; vacuole organization; water transport	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast thylakoid;cytosol;Golgi apparatus;mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex;plant-type vacuole;plasma membrane;plasmodesma;proton-transporting V-type ATPase, V1 domain;thylakoid part;vacuolar membrane	ATP binding;protease binding;proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism;proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism;transition metal ion binding	ATPeV1A;V-type H+-transporting ATPase subunit A [EC:3.6.3.14]
81	SCCCLB1025B04.g	V-type proton ATPase subunit E OS=Citrus limon GN=VATE PE=2 SV=1 (UNIPROT)	1.977027	0.784683	1.2554	0.82382	0.003	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport;calcium ion transport; defense response to bacterium; embryo development ending in seed dormancy;glycolysis; Golgi organization; hyperosmotic response; plant-type cell wall biogenesis; response to cadmium ion;response to cold; response to salt stress; vacuole organization; water transport	cytosolic ribosome;Golgi apparatus;mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex;nucleus;plant-type vacuole membrane;proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism;proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	ATPeV1E;V-type H+-transporting ATPase subunit E
82	SCSFRT2069E03.g	Water stress(UNIPROT)	0.266184	0.8668516	1.0525	1.1041	0.064	cell wall polysaccharide metabolic process; cellular biosynthetic process; cellular component organization;d efense response to fungus, incompatible interaction ;developmental programmed cell death; hyperosmotic salinity response ;leaf senescence; organic substance biosynthetic process; proteolysis; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to inorganic substance carboxylic acid biosynthetic process; defense response to fungus; developmental programmed cell death; glucuronoxylan metabolic process; glycolysis; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process;hyperosmotic salinity response;leaf senescence; plant-type cell wall organization ;proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to temperature stimulus; response to water deprivation; water transport; xylan biosynthetic process	apoplast;cell wall;chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	
83	SCCCFL1001E01.g	Xylem cysteine proteinase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=XCP2 PE=1 SV=2 (UNIPROT)	0.3214917	0.7256367	1.0783	1.2954	0.198		apoplast;cell wall;chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	XCP;xylem cysteine proteinase [EC:3.4.22.-]

Anexo 6. Razões normalizadas entre as proteínas possivelmente relacionadas à morte celular programada (PCD) encontradas nos diferentes segmentos das raízes de cana de açúcar. Valores representam a mediana entre 5 réplicas amostrais e valores de P significativos são apresentados em negrito (P>0.05). Termos GO foram obtidos com as ferramentas do software Blast2GO. Valores negativos representam diminuiu a concentração ao longo do segmento de a para o b (a/b) valores positivos representam que aumentou a concentração ao longo dos segmentos de a para b.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	seg 1/2	Mediana das razões seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	ANOVA P-value	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
1 SCACLR1057G08.g	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1;AHA1(UNIPROT)	-0.448	0.223	-0.707	0.387	0.012	protein folding; response to endoplasmic reticulum stress; response to heat;response to high light intensity; response to hydrogen peroxide	cytosol; nucleus	ATPase activator activity;chaperone binding	
2 SCRLRZ3042B09.g	Aspartic proteinase nepenthesin-1 OS=Nepenthes gracilis GN=nep1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	-0.977	0.031	0.080	-0.307	0.006	cell wall modification; cellular metabolic process;defense response ;plant-type cell wall organization;proteolysis; regulation of cellular process; response to abscisic acid stimulus; response to karrikin; response to other organism; response to water deprivation	endoplasmic reticulum; extracellular region; membrane; plant-type cell wall; plasmodesma	aspartic-type endopeptidase activity	
3 SCCCL1004B02.g	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial(UNIPROT)	0.617	0.113	-0.351	-0.386	0.002	ATP hydrolysis coupled proton transport; cell growth; cellulose metabolic process; dATP biosynthetic process from ADP; defense response to bacterium; DNA-dependent transcription, elongation; plant-type cell wall biogenesis; response to cold; response to oxidative stress	cell wall; chloroplast ATP synthase complex; Golgi apparatus; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; nucleolus; plasma membrane; ATPase complex, catalytic domain vacuolar membrane	ATP binding; cobalt ion binding; copper ion binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATPeF1A;F-type H+-transporting ATPase subunit alpha
4 SCCCRZ2001D06.g	ATP synthase subunit beta, mitochondrial;(UNIPROT)	-0.160	-0.032	-0.018	-0.108	0.161	ATP catabolic process; ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; carbohydrate metabolic process;defense response to fungus, incompatible interaction; DNA-dependent transcription, elongation; generation of precursor metabolites and energy; organelle organization; response to cold; response to oxidative stress	cell wall; chloroplast ATP synthase complex; cytosol;Golgi apparatus; mitochondrial respiratory chain complex I; nucleolus; plasma membrane; vacuolar membrane	ATP binding; cobalt ion binding;copper ion binding; poly(U) RNA binding;proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; zinc ion binding	ATPeF1B;F-type H+-transporting ATPase subunit beta [EC:3.6.3.14]
5 SCCCC4015F12.g	Basic 7S globulin;SBg7S;Bg;Basic 7S globulin high kDa subunit;Basic 7S globulin low kDa subunit;(UNIPROT)	-0.433	-0.302	-0.159	-0.033	0.765	proteolysis	cell periphery	aspartic-type endopeptidase activity	
6 SCAGLB2046F01.g	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor (Protein RBBI3-3) (RBTI) (OSE727A)(UNIPROT)	0.761	0.363	-0.248	-0.406	0.000		extracellular region	serine-type endopeptidase inhibitor activity	
7 SCCCL2001B01.b	calmodulin-binding protein(UNIPROT)	0.535	0.022	0.209	-0.062	0.000	cellular component organization or biogenesis;D-xylose metabolic process;pollen germination;single-organism cellular process	endosome; extracellular space; Golgi apparatus; integral to membrane ;plasma membrane; trans-Golgi network	ATPase activity;calmodulin binding;guanosine diphosphatase activity;inosine-diphosphatase activity;uridine-diphosphatase activity	APY1_2;apyrase [EC:3.6.1.5]
8 SCVPLR1049C09.g	calmodulin-binding protein(UNIPROT)	-2.217	0.031	-0.575	0.233	0.000	cell cycle process; cell division; cell wall organization; cytoplasmic transport; defense response to bacterium; Golgi vesicle transport; lateral root formation; maintenance of root meristem identity; meristem growth; meristem structural organization; organic substance transport; phosphorylation; phototropism; plant-type cell wall organization or biogenesis; pollen development; polysaccharide biosynthetic process; proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; proteasome core complex assembly; protein glycosylation; regulation of cellular component organization; regulation of gene silencing; response to cadmium ion ;response to heat; response to misfolded protein; RNA processing;root cap development; abscisic acid mediated signaling pathway; auxin mediated signaling pathway; defense response to fungus; jasmonic acid mediated signaling pathway; MAPK cascade; negative regulation of defense response; negative regulation of programmed cell death; regulation of plant-type hypersensitive response; response to bacterium; response to cold; response to heat; response to hydrogen peroxide; systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway	apoplast; cell wall; chloroplast thylakoid membrane; cytosolic ribosome; Golgi apparatus; nuclear envelope; nucleolus; plasmodesma; proteasome regulatory particle, base subcomplex ;spindle	ATP binding;ATPase activity;calmodulin binding;identical protein binding	transitional endoplasmic reticulum ATPase;VCP
9 SCCCLR1070F12.g	calnexin(UNIPROT)	-0.254	0.011	-0.083	0.021	0.902	auxin mediated signaling pathway; calcium ion homeostasis ;cellular response to nitrogen starvation; defense response signaling pathway, resistance gene-independent; defense response to bacterium; plant-type hypersensitive response; response to cadmium ion; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to salt stress; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	calnexin;CANX
10 SCSGST1072D03.g	Calreticulin OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os07g0246200 PE=1 SV=2 (UNIPROT)	-2.429	-0.193	-0.144	0.203	0.000		apoplast; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	CALR;calreticulin

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value					
11	SCEPLR1051D05.g	calreticulin(UNIPROT)	-1.957	-0.008	-0.395	0.135	0.000	auxin mediated signaling pathway; calcium ion homeostasis ;cellular response to nitrogen starvation; defense response signaling pathway, resistance gene-independent; defense response to bacterium; plant-type hypersensitive response; response to cadmium ion; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to salt stress; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	apoplast; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; Golgi apparatus; mitochondrion; plant-type cell wall; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	calcium ion binding;molybdenum ion binding;unfolded protein binding	CALR;calreticulin
12	SCCCLR1048H09.g	Catalase isozyme 3 OS=Zea mays GN=CAT3 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	-0.094	0.461	0.253	0.347	0.191	ammonium transport; cell redox homeostasis; cellular cation homeostasis; cellular response to nitrogen starvation; cellular response to phosphate starvation; cellular response to sulfate starvation; divalent metal ion transport; ER to Golgi vesicle-mediated transport; fatty acid beta-oxidation; hydrogen peroxide catabolic process ; negative regulation of programmed cell death; nucleotide transport; photoperiodism, photorespiration; protein import into peroxisome matrix; regulation of ion transport; regulation of plant-type hypersensitive response; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to cyclopentenone; starch metabolic process; systemic acquired resistance; toxin catabolic process; tryptophan catabolic process	apoplast; cell wall; cytosolic ribosome; mitochondrion; nucleus; peroxisome; plant-type vacuole membrane; plasma membrane; plasmodesma	arginine transmembrane transporter activity;catalase activity;cationic amino acid transmembrane transporter activity;cobalt ion binding;heme binding;L-glutamate transmembrane transporter activity;L-lysine transmembrane transporter activity;protein binding	catalase [EC:1.11.1.6];katE
13	SCCCLB1023F09.g	Cathepsin B (Fragment)(UNIPROT)	-0.094	0.461	0.253	0.347	0.000	cell growth; cell morphogenesis ;fatty acid beta-oxidation; Golgi vesicle transport; proteolysis; regulation of catalytic activity; response to abiotic stimulus; response to inorganic substance; response to oxygen-containing compound ;response to stress	cytosol; extracellular region; vacuole	cysteine-type endopeptidase activity	cathepsin B [EC:3.4.22.1];CTSB
14	SCEQRT1025E03.g	Cystatin-1 precursor (Cystatin I) (Corn kernel cysteine proteinase inhibitor)(UNIPROT)	0.270	-0.534	-0.226	0.237	0.546	cellular response to cold; cellular response to heat; cellular response to water deprivation; hyperosmotic response; response to cadmium ion; response to oxidative stress; response to wounding	cell wall; cytosol; endoplasmic reticulum; extracellular region; plasma membrane; plasmodesma; vacuolar membrane	cobalt ion binding;cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	
15	SCCCLR1022B11.g	cysteine protease 1 precursor [Zea mays](NCBI)	-0.094	0.461	0.253	0.347	0.083	cell wall pectin metabolic process; cysteine biosynthetic process; defense response to fungus, incompatible interaction; developmental programmed cell death; gibberellic acid mediated signaling pathway; gibberellin biosynthetic process ;glucuronoxylan metabolic process; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response ;leaf senescence; plant-type cell wall cellulose metabolic process; proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to water deprivation; root hair elongation; water transport; xylan biosynthetic process	anchored to membrane; apoplast; cell wall; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; nucleus; plasmodesma; senescence-associated vacuole	calcium ion binding; cysteine-type peptidase activity; protein binding	
16	SCCCRZ2001D03.g	Cysteine proteinase 2 OS=Zea mays GN=CCP2 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	0.595	0.067	0.135	-0.031	0.075	calcium ion transport; cell wall polysaccharide metabolic process; cellular biosynthetic process; defense response to fungus; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response;organ development; organic substance biosynthetic process; proteolysis; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to fructose stimulus; response to gibberellin stimulus; water transport	apoplast; cell wall; chloroplast; cytosol; endoplasmic reticulum; plant-type vacuole; plasmodesma	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity; protein binding	cathepsin H [EC:3.4.22.16];CTSH
17	SCCCRZ3002G10.g	Cysteine proteinase inhibitor 8 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0429000 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	-0.094	0.461	0.253	0.347	0.000	cellular response to stress; response to inorganic substance; response to temperature stimulus	cell wall; cytosol; membrane; plasmodesma; vacuole	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	
18	SCCCLR1001H04.g	Cytochrome b-c1 complex subunit 7;Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein;Complex III subunit 7;Complex III subunit VII;CR14(UNIPROT)	0.597	-0.200	-0.389	-0.252	0.007	aerobic respiration; glycolysis; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; photorespiration; proteasome core complex assembly; response to cadmium ion; response to misfolded protein; ubiquitin-dependent protein catabolic process	mitochondrial respiratory chain complex III; plastid; vacuolar membrane	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	QCR7;ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7
19	SCQGLR2025G04.g	Cytochrome b5(UNIPROT)	-0.046	-0.360	-0.224	0.091	0.534	alkane biosynthetic process; cellular lipid catabolic process; defense response to bacterium; glucosinolate biosynthetic process; indoleacetic acid biosynthetic process; lateral root formation; nitrate assimilation; nitric oxide biosynthetic process; response to symbiotic fungus; root hair elongation; sterol biosynthetic process	chloroplast outer membrane; chloroplast thylakoid membrane; cytosol; endoplasmic reticulum membrane; mitochondrion; plasma membrane ; vacuolar membrane	heme binding;nitrate reductase (NADH) activity;protein binding;sphingolipid delta-8 desaturase activity	
20	SCUTLR2023F06.g	Cytochrome c OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=CC-1 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	-1.783	-0.101	0.356	0.188	0.072	cell proliferation; glucose catabolic process	cytosol; Golgi apparatus; mitochondrion; vacuolar membrane	copper ion binding; electron carrier activity; heme binding; iron ion binding	CYC;cytochrome c
21	SCCCLR1080A05.g	Cytochrome c oxidase subunit 6B OS=Schizosaccharomyces pombe GN=cox12 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	-0.748	-	-	-	0.184	oxidation-reduction process; phosphatidylinositol biosynthetic process; photorespiration; response to salt stress	chloroplast thylakoid membrane; mitochondrion	copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	
22	SCUTLR1058A12.g	Cytochrome c1-1, heme protein, mitochondrial;Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit 1;Cytochrome c-1-1;Cytochrome b-c1 complex subunit 4-1;Complex III subunit 4-1;Complex III subunit IV-1;(UNIPROT)	0.740	0.007	0.041	-0.304	0.001	aerobic respiration; pentose-phosphate shunt ;photorespiration; proteasome core complex assembly; response to cadmium ion; response to misfolded protein; response to salt stress; ubiquitin-dependent protein catabolic process	mitochondrial respiratory chain complex III; plasma membrane; vacuolar membrane	electron transporter, transferring electrons within CoQH2-cytochrome c reductase complex activity; heme binding; iron ion binding; protein binding	CYC1;ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value				
23	SCJFLR1013A09.g						cell development; cell wall organization or biogenesis; defense response to bacterium; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hypersmotic salinity response; organ development; organic substance biosynthetic process; polysaccharide metabolic process; proteolysis; response to cadmium ion; response to desiccation; response to hormone stimullusing; water transport	apoplast; cell wall; cytosol; endoplasmic reticulum; nucleus; vacuole	calcium ion binding;cysteine-type endopeptidase activity; protein binding	cathepsin F [EC:3.4.22.41];CTSF
24	SCJFLR1073H09.g						gluconeogenesis; glycolysis; pentose-phosphate shunt; photorespiration; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to light stimulus; response to salt stress; trichome morphogenesis	apoplast; chloroplast stroma ;mitochondrial envelope; nucleus; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane; plasmodesma	copper ion binding;DNA binding;magnesium ion binding;phosphopyruvate hydratase activity	ENO;enolase [EC:4.2.1.11]
25	SCCCRZ1002F06.g						gluconeogenesis; glycolysis; pentose-phosphate shunt; photorespiration; response to abscisic acid stimulus; response to cadmium ion; response to cold; response to light stimulus; response to salt stress; trichome morphogenesis	apoplast; chloroplast stroma; mitochondrial envelope; nucleus; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane; plasmodesma	copper ion binding;DNA binding;magnesium ion binding;phosphopyruvate hydratase activity	ENO;enolase [EC:4.2.1.11]
26	SCCCLR1070G05.g						L-methionine salvage from methylthioadenosine	chloroplast stroma; cytosol	acireductone synthase activity; magnesium ion binding	DEP1;methylthioribulose 1-phosphate dehydratase / enolase-phosphatase E1 [EC:4.2.1.109 3.1.3.77]
27	SCCART1C01G07.g						amino acid import; ER to Golgi vesicle-mediated transport; GDP-L-fucose biosynthetic process; glucuronoxylan metabolic process; nitrate transport; regulation of root development; response to cold; response to endoplasmic reticulum stress; response to nitrate ;response to salt stres; xylan biosynthetic process	apoplast;extracellular matrix;nucleus;plant-type cell wall;plant-type vacuole;plasma membrane;plasmodesma	manganese ion binding;nutrient reservoir activity;oxalate oxidase activity	
28	SCCCRZ1002G01.g						autophagy; defense response to bacterium; defense response to fungus; endoplasmic reticulum unfolded protein response; ER-associated protein catabolic process; gluconeogenesis; heat acclimation ;hypersmotic salinity response ;negative regulation of seed germination; protein retention in ER lumen; protein targeting to chloroplast; response to cadmium ion; response to cold; response to high light intensity; response to hydrogen peroxide; response to virus; response to water deprivation; salicylic acid biosynthetic process; systemic acquired resistance	apoplast; cell wall; chloroplast envelope; cis-Golgi network; cytosolic ribosome; endoplasmic reticulum lumen; Golgi apparatus ;integral to membrane; mediator complex; mitochondrial matrix; nuclear matrix; nucleolus; plasma membrane; plasmodesma; thylakoid;vacuolar membrane	ATP binding;KDEL sequence binding;protease binding;receptor activity;ubiquitin protein ligase binding;zinc ion binding	heat shock 70kDa protein 1/8;HSPA1_8
29	SCJLLR1011E03.g						calcium-mediated signaling; cellular response to calcium ion; de-etiolation; defense response to bacterium, incompatible interaction; heat acclimation; organic substance biosynthetic process; protein secretion; protein stabilization; regulation of meristem growth; regulation of meristem structural organization; response to cadmium ion; response to chlorate;response to cold; response to hydrogen peroxide; response to mechanical stimulus; response to salt stress; response to water deprivation	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast stroma;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;mitochondrion;nucleolus;plasma membrane;plasmodesma;vacuolar membrane	ATP binding;ATPase activity;unfolded protein binding	htpG;molecular chaperone HtpG
30	SCCCLR2C02F10.g						calcium-mediated signaling; cellular response to calcium ion; de-etiolation; defense response to bacterium, incompatible interaction; heat acclimation; organic substance biosynthetic process; protein secretion; protein stabilization; regulation of meristem growth; regulation of meristem structural organization; response to cadmium ion; response to chlorate;response to cold; response to hydrogen peroxide; response to mechanical stimulus; response to salt stress; response to water deprivation	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast stroma;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;mitochondrion;nucleolus;plasma membrane;plasmodesma;vacuolar membrane	ATP binding;ATPase activity;unfolded protein binding	htpG;molecular chaperone HtpG
31	SCBGRT3075F07.g						jasmonic acid biosynthetic process; leaf senescence; oxidation-reduction process; oxylipin metabolic process ;response to cadmium ion; response to fungus;response to hormone stimulus; response to ozone; response to salicylic acid stimulus; response to wounding; signal transduction	cytosol;peroxisome	12-oxophytodienoate reductase activity;FMN binding	12-oxophytodienoic acid reductase [EC:1.3.1.42];E1.3.1.42
32	SCJLRZ1024A04.g						anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane;plasma membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value				
33	SCCCCL4013D09.g						abscisic acid mediated signaling pathway; hyperosmotic salinity response ;indoleacetic acid biosynthetic process; jasmonic acid biosynthetic process ;jasmonic acid mediated signaling pathway; leaf senescence; oxidation-reduction process; oxylipin metabolic process; response to auxin stimulus; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to fungus;response to ozone; response to salicylic acid stimulus;response to water deprivation; response to wounding; tryptophan catabolic process	cytosol;peroxisome	12-oxophytodienoate reductase activity;FMN binding	12-oxophytodienoic acid reductase [EC:1.3.1.42];E1.3.1.42
34	SCCCRT1001E01.g					0.000	anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5
35	SCJFRT1007H07.g					0.000	anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane;plasma membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5
36	SCUTLR2030B03.g					0.062	anther dehiscence; cellular amino acid metabolic process ;cellular aromatic compound metabolic process; coenzyme metabolic process; defense response to bacterium, incompatible interaction; growth; jasmonic acid biosynthetic process ;lateral root formation ;lipid biosynthetic process; lipid oxidation; localization; membrane disassembly; negative regulation of defense response to insect; organic cyclic compound metabolic process; response to abscisic acid stimulus; response to fungus;response to herbivore; response to jasmonic acid stimulus; response to ozone; response to water deprivation ;response to wounding	chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane;plasma membrane	iron ion binding;linoleate 13S-lipoxygenase activity;linoleate 9S-lipoxygenase activity;protein binding	linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58];LOX1_5
37	SCCCLR1072E07.g					0.191	cellular modified amino acid biosynthetic process; cold acclimation; embryo development ending in seed dormancy; Golgi organization ;hydrogen peroxide catabolic process ;hydrogen peroxide mediated signaling pathway; hyperosmotic response; phenylpropanoid metabolic process; photorespiration; polyamine catabolic process; response to cadmium ion; response to endoplasmic reticulum stress; response to heat; response to salt stress;ubiquitin-dependent protein catabolic process; water transport	cell wall;chloroplast envelope;chloroplast stroma;chloroplast thylakoid membrane;cytosol;Golgi apparatus;mitochondrion;peroxisomal membrane;plasma membrane;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;L-ascorbate peroxidase activity	
38	SCBFRZ2017C11.g					0.000	cell communication; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to stimulus ;defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to organic substance; response to oxidative stress	apoplast;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
39	SCCCAD1001C08.g					0.000	anion transport; cell communication; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; nitrogen compound transport; organic substance transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of programmed cell death; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrogen compound; response to organic substance; response to oxidative stress; transition metal ion transport	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
40	SCCCCL3002E11.b					0.000	cell communication; cellular component organization or biogenesis; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response;ion transport; lignin biosynthetic process; organ development; oxidation-reduction process; primary metabolic process; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to organic substance; response to oxidative stress; single-organism developmental process; tissue development	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;membrane;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value					
41	SCCCCL3003B02.b	peroxidase(UNIPROT)	-0.004	-0.211	-0.317	-0.441	0.936	aromatic compound biosynthetic process; catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response; flower development; ion transport; organ development; organic cyclic compound biosynthetic process; oxidation-reduction process; phenylpropanoid metabolic process; primary metabolic process; regulation of growth; response to nematode; response to oxidative stress; single-organism biosynthetic process; tissue development	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;membrane;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
42	SCCCCL4012A01.g	peroxidase(UNIPROT)	-1.058	0.090	0.304	0.354	0.002	biological regulation; cellular metabolic process; cellular response to hypoxia; hyperosmotic salinity response; ion transport; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; primary metabolic process; response to cold; response to desiccation; response to other organism; response to oxidative stress;root development; tissue development	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;membrane;nucleus; plant-type cell wall; plasmodesma; vacuole	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
43	SCCCCL7C05F08.g	peroxidase(UNIPROT)	-	-	-0.487	-0.381	0.001	anion transport; cell communication; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin metabolic process; nitrogen compound transport; organonitrogen compound metabolic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to endogenous stimulus; response to nitrogen compound; response to organic substance; response to oxidative stress; response to oxygen-containing compound; transition metal ion transport; trichoblast differentiation	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
44	SCCCLB1004B09.g	peroxidase(UNIPROT)	0.466	0.119	0.099	-0.423	0.000	brassinosteroid biosynthetic process; cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; defense response to fungus; defense response to nematode; developmental growth; flower development; hyperosmotic salinity response; iron ion transport; lignin biosynthetic process ;mucilage extrusion from seed coat; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to oxidative stress; root hair cell differentiation	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;membrane;nucleus;plan t-type cell wall;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
45	SCCCLR1C05G08.g	peroxidase(UNIPROT)	0.403	0.104	-0.051	-0.490	0.018	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; negative regulation of growth; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; response to salt stress; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
46	SCCCRT1001G12.g	peroxidase(UNIPROT)	0.454	0.020	-0.008	-0.095	0.000	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
47	SCEPRZ1011A06.g	peroxidase(UNIPROT)	0.074	-0.461	-0.071	-0.052	0.195	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode ;flower development; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; negative regulation of growth;oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; reactive oxygen species metabolic process; response to light stimulus; response to oxidative stress; response to salt stress; response to zinc ion; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
48	SCEQRT1024D03.g	peroxidase(UNIPROT)	0.286	0.009	-0.091	-0.182	0.340	cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress; trichoblast differentiation	apoplast;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
49	SCEQRT1024F02.g	peroxidase(UNIPROT)	0.423	0.101	-0.132	-0.423	0.000	brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to iron ion starvation; defense response to fungus; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport; lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; post-embryonic development; post-embryonic organ development; regulation of cellular process;respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to oxidative stress; root hair cell differentiation	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
50	SCEQRT1026F09.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.773	-0.322	-0.104	-0.033	0.000	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; defense response to nematode; flower development; hyperosmotic salinity response; ion transport ;lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value					
51	SCEQRT1028D12.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.134	-0.074	-0.025	-0.509	0.201	cell wall organization or biogenesis; cellular response to stress; organ development; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; phenylpropanoid metabolic process; primary metabolic process; response to abiotic stimulus;response to inorganic substance; response to oxidative stress	cell wall;extracellular region;membrane;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
52	SCEQRT1028H09.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.279	-0.187	-0.241	-0.442	0.086	oxidation-reduction process; response to oxidative stress		heme binding; peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
53	SCEQRT2030A04.g	peroxidase(UNIPROT)	0.565	0.138	0.026	-0.468	0.002	brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport;lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to other organism; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; xylan metabolic process	apoplast;cytosol;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;membrane;nucleus;plant-t-type cell wall;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity;protein binding;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
54	SCEZRT2019F10.g	peroxidase(UNIPROT)	-1.211	-	-	-	0.099	brassinosteroid biosynthetic process; cellular response to hypoxia; cellular response to iron ion starvation; developmental growth; hyperosmotic salinity response; iron ion transport;lignin biosynthetic process; nitrate transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; response to cold; response to desiccation; response to nitrate; response to other organism; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; xylan metabolic process	apoplast;endoplasmic reticulum;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity;protein binding;transferase activity, transferring glycosyl groups	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
55	SCJFLR1035D05.g	peroxidase(UNIPROT)	0.825	0.463	0.103	-0.135	0.000	oxidation-reduction process; response to oxidative stress		heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
56	SCJFRZ2013F04.g	peroxidase(UNIPROT)	0.395	-0.351	0.133	0.162	0.780	cell communication; cellular response to stimulus; defense response to fungus; defense response to nematode; developmental growth; hyperosmotic salinity response; inorganic anion transport; lignin metabolic process; nitrogen compound transport; oxidation-reduction process; plant-type cell wall organization; primary metabolic process; regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation ;response to nitrogen compound; response to oxidative stress; root hair cell differentiation; transition metal ion transport	apoplast;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasma membrane;plasmodesma	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
57	SCRFRZ3054A09.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.421	0.052	0.113	-0.472	0.282				
58	SCRLAD1042E05.g	peroxidase(UNIPROT)	0.603	0.471	0.248	-0.185	0.008	cell wall organization; cellular macromolecule metabolic process; immune response	anchored to plasma membrane;plasmodesma	chitin binding;peptidoglycan binding	
59	SCSBRZ2021C03.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.244	-0.347	0.138	-0.339	0.027	defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode; hyperosmotic salinity response; ion transport; lignin biosynthetic process; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; primary metabolic process; reactive oxygen species metabolic process; response to cold; response to desiccation; response to light stimulus; response to oxidative stress; root development; tissue development; unidimensional cell growth	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
60	SCSFCL6068C11.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.073	-0.370	-0.008	-0.309	0.492	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response;ion transport; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process;regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;membrane;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
61	SCSGRT2063H01.g	peroxidase(UNIPROT)	-0.790	0.081	0.177	0.212	0.007	aromatic compound biosynthetic process; catabolic process;cell wall organization or biogenesis; cellular response to stress; defense response; flower development;ion transport; lignin metabolic process; organ development; organic cyclic compound biosynthetic process; oxidation-reduction process;primary metabolic process; regulation of growth;response to chemical stimulus; response to nematode; response to oxidative stress; single-organism biosynthetic process; tissue development	membrane;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuole	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
62	SCUTHR1063E12.g	peroxidase(UNIPROT)	0.606	-0.480	0.088	-0.175	0.001	cell wall polysaccharide catabolic process; cellular response to hypoxia; defense response to fungus; hyperosmotic salinity response;ion transport; lignin biosynthetic process; mucilage extrusion from seed coat; oxidation-reduction process;regulation of cellular process; respiratory burst; response to cold; response to desiccation; response to oxidative stress	apoplast;cytosol;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value				
63	SCVPLB1020D03.g						anther development; cell wall organization or biogenesis;defense response to bacterium; defense response to fungus; defense response to nematode;hyperosmotic salinity response; ion transport;negative regulation of growth; organic substance biosynthetic process; oxidation-reduction process; pathogen-associated molecular pattern dependent induction by symbiont of host innate immune response; primary metabolic process; reactive oxygen species metabolic process; regulation of meristem growth;response to cold;response to desiccation; response to light stimulus; response to oxidative stress; unidimensional cell growth	apoplast;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	heme binding;peroxidase activity;protein binding	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
64	SCVPRZ2035F03.g						cellular metabolic process; organ development; organic substance metabolic process;oxidation-reduction process; primary metabolic process; response to abiotic stimulus; response to inorganic substance;response to other organism; response to oxidative stress;response to oxygen-containing compound; tissue development calcium-mediated signaling; cell growth; developmental growth involved in morphogenesis; intracellular transport; membrane organization; organelle localizatio;nresponse to cold; response to endogenous stimulus; response to mechanical stimulus; response to organic substance; response to water deprivation; root epidermal cell differentiation; starch metabolic process	cell wall;cytoplasmic part;extracellular region;intracellular membrane-bounded organelle	heme binding;peroxidase activity	E1.11.1.7;peroxidase [EC:1.11.1.7]
65	SCSGLR1045G11.g						Probable calcium-binding protein CML7 (Calmodulin-like protein 7)(UNIPROT)	cytosol;nucleus;plasma membrane;vacuolar membrane	calcium ion binding;protein binding;signal transducer activity	calcium-binding protein CML;CML
66	SCCCRT2002H05.g						Probable cytochrome c biosynthesis protein(UNIPROT)			
67	SCVPRT2080B07.g						cellular component organization; cellular metabolic process; defense response; immune system process; organic substance metabolic process; response to chemical stimulus; response to other organism	cell part		
68	SCILRT2051G07.g						cellular component organization; defense response to bacterium, incompatible interaction; defense response to fungus, incompatible interaction; organ development; regulation of anthocyanin biosynthetic process; regulation of cellular metabolic process; regulation of defense response; regulation of macromolecule metabolic process; response to cadmium ion; response to organic substance; response to oxygen-containing compound; response to salt stress; response to UV-B; response to virus; signal transduction; systemic acquired resistance	apoplast;cell wall;membrane;vacuole		
69	SCVPRT2073B04.g						cell wall organization or biogenesis; cellular component organization; defense response to fungus; induced systemic resistance; organ development; regulation of anthocyanin biosynthetic process; regulation of cellular metabolic process; regulation of defense response; regulation of macromolecule metabolic process; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to oxygen-containing compound; response to UV-B; response to virus; signal transduction; systemic acquired resistance	apoplast;cell wall;membrane;plasmodesma;vacuole		
70	SCEZLB1007G10.g						brassinosteroid mediated signaling pathway; microtubule nucleation; proteolysis; second-messenger-mediated signaling	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
71	SCEZRZ3016H03.g						brassinosteroid mediated signaling pathway; cellular component organization; proteolysis	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
72	SCBFRZ2017A10.g						proteolysis	cytosol;extracellular region;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-IV;serine carboxypeptidase-like clade IV [EC:3.4.16.-]
73	SCCCLR1C01H05.g						brassinosteroid mediated signaling pathway; microtubule nucleation; proteolysis; second-messenger-mediated signaling	extracellular space;plant-type cell wall;vacuole	serine-type carboxypeptidase activity	SCPL-II;serine carboxypeptidase-like clade II [EC:3.4.16.-]
74	SCJFRT2057F01.g						alpha-amino acid metabolic process; carbohydrate derivative biosynthetic process;cellular amino acid biosynthetic process;cellular macromolecule metabolic process; lateral root morphogenesis; mucilage extrusion from seed coat; plant-type cell wall modification; proteolysis; regulation of cell proliferation; response to auxin stimulus	apoplast;cytosol;external side of plasma membrane;extracellular matrix;Golgi apparatus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	serine-type endopeptidase activity	

Continuação Anexo 6.

SAS - Sucest	Nome da proteína, espécie (banco de dados)	Mediana da Razão dos segmentos				ANOVA	GO processo biológico	GO componente celular	GO função molecular	informações do kegg	
		seg 1/2	seg 2/3	seg 3/4	seg 4/5	P-value					
75	SCRFHR1007E04.g	Subtilisin-like protease OS=Arabidopsis thaliana GN=ARA12 PE=1 SV=1 (UNIPROT)	0.095	0.059	-0.032	-0.029	0.321	anther development; ion transport; lateral root morphogenesis; mucilage extrusion from seed coat; plant-type cell wall biogenesis and modification; polysaccharide metabolic process; proteolysis; regulation of cell proliferation; regulation of meristem growth; response to auxin stimulus; RNA splicing, via endonucleolytic cleavage and ligation	apoplast;cytosol;external side of plasma membrane;extracellular matrix;Golgi apparatus;nucleus;plant-type cell wall;plasmodesma;vacuolar membrane	serine-type endopeptidase activity	
76	SCCCLR1024E11.g	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 OS=Zea mays GN=SODCC.1 PE=2 SV=2 (UNIPROT)	-0.124	0.132	0.095	0.218	0.436	cellular response to copper ion; cellular response to ozone; cellular response to salt stress; cellular response to sucrose stimulus; cellular response to UV-B; defense response to bacterium; gene silencing by miRNA; oxidation-reduction process; removal of superoxide radicals; response to cadmium ion;response to iron ion; toxin catabolic process	apoplast;chloroplast stroma;cytosol;nucleus;peroxisome;thylakoid;vacuole	copper ion binding;protein binding;superoxide dismutase activity;zinc ion binding	SOD1;superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]
77	SCCCLR1048A06.g	Superoxide dismutase(UNIPROT)	-0.048	0.132	-0.111	0.101	0.043	aerobic respiration; defense response to bacterium; embryo development ending in seed dormancy; floral organ abscission; gibberellic acid mediated signaling pathway; gibberellin biosynthetic process; Golgi organization; hyperosmotic response; photorespiration; removal of superoxide radicals ;response to cadmium ion; response to salt stress; response to temperature stimulus; response to zinc ion; ubiquitin-dependent protein catabolic process; water transport	chloroplast stroma; mitochondrion;plastid nucleoid	copper ion binding;superoxide dismutase activity	SOD2;superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]
78	SCCCLR2C03D05.g	Superoxide dismutase(UNIPROT)	-0.053	-0.121	-0.081	-0.253	0.508	cellular response to copper ion; cellular response to ozone; cellular response to salt stress; cellular response to sucrose stimulus; cellular response to UV-B; defense response to bacterium; gene silencing by miRNA; oxidation-reduction process;removal of superoxide radicals; response to cadmium ion; response to iron ion; toxin catabolic process	apoplast; chloroplast stroma; cytosol;nucleus; peroxisome; thylakoid; vacuole	copper ion binding;protein binding;superoxide dismutase activity;zinc ion binding	SOD1;superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]
79	SCAGLR1021H06.g	Thiol protease SEN102 OS=Hemerocallis sp. GN=SEN102 PE=2 SV=1 (UNIPROT)	-0.822	-0.593	-0.249	-0.022	0.000	carboxylic acid biosynthetic process; cellular polysaccharide metabolic process; defense response to fungus, incompatible interaction; developmental programmed cell death;;Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process; hyperosmotic salinity response; leaf senescence; plant-type cell wall organization; proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to red light; response to temperature stimulus; response to water deprivation; water transport; xylan metabolic process	apoplast;cell wall; chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	CEP;KDEL-tailed cysteine endopeptidase [EC:3.4.22.-]
80	SCAGLR1043D04.g	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Daucus carota PE=2 SV=1 (UNIPROT)	-0.581	0.099	-0.120	-0.077	0.485	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP metabolic process; calcium ion transport; cell growth; cell morphogenesis; cytoskeleton organization; Golgi organization; Golgi vesicle transport;hyperosmotic response; pentose-phosphate shunt; proteasomal protein catabolic process; regulation of biological quality; regulation of cellular process; response to cadmium ion; response to salt stress; response to temperature stimulus; vacuole organization; water transport	apoplast;cell wall;chloroplast envelope;chloroplast thylakoid;cytosol;Golgi apparatus;mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex;plant-type vacuole;plasma membrane;plasmodesma;proton-transporting V-type ATPase, V1 domain;thylakoid part;vacuolar membrane	ATP binding;protease binding;proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism;proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism;transition metal ion binding	ATPeV1A;V-type H+-transporting ATPase subunit A [EC:3.6.3.14]
81	SCCCLB1025B04.g	V-type proton ATPase subunit E OS=Citrus limon GN=VATE PE=2 SV=1 (UNIPROT)	-0.977	0.215	-0.255	0.176	0.003	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport;calcium ion transport; defense response to bacterium; embryo development ending in seed dormancy;glycolysis; Golgi organization; hyperosmotic response; plant-type cell wall biogenesis; response to cadmium ion;response to cold; response to salt stress; vacuole organization; water transport	cytosolic ribosome;Golgi apparatus;mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex;nucleus;plant-type vacuole membrane;proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism;proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	ATPeV1E;V-type H+-transporting ATPase subunit E
82	SCSFRT2069E03.g	Water stress(UNIPROT)	0.734	0.133	-0.053	-0.104	0.064	cell wall polysaccharide metabolic process; cellular biosynthetic process; cellular component organization;d efense response to fungus, incompatible interaction ;developmental programmed cell death; hyperosmotic salinity response ;leaf senescence; organic substance biosynthetic process; proteolysis; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to inorganic substance	apoplast;cell wall;chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	
83	SCCCFL1001E01.g	Xylem cysteine proteinase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=XCP2 PE=1 SV=2 (UNIPROT)	0.679	0.274	-0.078	-0.295	0.198	carboxylic acid biosynthetic process; defense response to fungus; developmental programmed cell death; glucuronoxylan metabolic process; glycolysis; Golgi organization; hydrogen peroxide catabolic process;hyperosmotic salinity response;leaf senescence; plant-type cell wall organization ;proteolysis; regulation of meristem growth; response to cadmium ion; response to ethylene stimulus; response to gibberellin stimulus; response to temperature stimulus; response to water deprivation; water transport; xylan biosynthetic process	apoplast;cell wall;chloroplast;cytosol;endoplasmic reticulum;nucleus;plasmodesma;senescence-associated vacuole	calcium ion binding;cysteine-type peptidase activity;protein binding	XCP;xylem cysteine proteinase [EC:3.4.22.-]

Chapter 13

Using Natural Plant Cell Wall Degradation Mechanisms to Improve Second Generation Bioethanol

Adriana Grandis, Amanda P. de Souza, Eveline Q. P. Tavares
and Marcos S. Buckeridge

Abstract Cell wall hydrolysis is one of the key processes needed for development of the technology for second-generation (2G) bioethanol production. Thus, finding and characterizing enzymes that can deal with the complexity of the walls has been the main focus of research. As a result, data on pretreatments of many kinds and performances of enzyme cocktails containing glycosyl hydrolases from microorganisms are becoming quickly available. Here we propose that the efficiency of the 2G process could be increased even further by acquiring control of mechanisms that plants themselves use to degrade their own walls, so that wall loosening provoked by such processes would decrease the energy demand for pretreatments and facilitate hydrolysis. The examined in this chapter are plant-micro-organism interaction, cell wall storage mobilization, fruit ripening, abscission, and aerenchyma formation. These systems are seen as having in common the use of *modules* that are coupled sequentially in order to lead to cell wall modification, including hydrolysis, for performance of different biological functions. These modules are (1) target cells perception of a message from the hormonal balance, (2) cell separation, (3) cell expansion, (4) programmed cell death, (5) hemicellulose-cellulose relaxation/hydrolysis and (6) cellulose hydrolysis. We propose that the use of synthetic biology to transform bioenergy feedstocks could be a route to increase the efficiency of 2G processes.

13.1 Introduction

The main bioethanol producers in the world are the US and Brazil, the former producing it from maize starch and the second from sucrose from sugarcane culms. In order to increase bioethanol production without increasing acreage, second

A. Grandis · A. P. de Souza · E. Q. P. Tavares · M. S. Buckeridge (✉)
Laboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil
e-mail: msbuck@usp.br

generation (2G) bioethanol technologies could be used. These technologies consist in the production of free fermentable sugars from cell walls. To access these sugars it is of great importance the production of basic scientific information about what the cell walls are like and how enzymes attack each polymer as well as the entire composite.

The production of bioethanol by means of 2G technologies involves the use of strategies that should modify the organization of cell wall architecture. The so-called 2G route involves biomass pretreatments in which polysaccharides would become available for enzymatic hydrolysis by application of physical and/or chemical treatments (Soccol et al. 2010; Dos Santos et al. 2011).

Moreover, due to the complex nature of the plant cell wall, degradation of lignocellulosic biomass requires the use of different classes of enzymes that have to be used in high proportions in order to produce enough free sugars for efficient fermentation (Verma et al. 2010). The production of 2G bioethanol requires ca. 11 millions of filter paper units (FPU) (i.e. 19 kg) to produce 84 L of bioethanol (Himmel et al. 1997, 1999) or 15–25 kg of cellulase per ton of biomass (Carroll and Somerville 2009; Taylor et al. 2008). Furthermore, due to the different compositions of the cell wall polymers, it would still be necessary to prospect for individually different classes of enzymes for characterization and subsequently combine them into cocktails that should be specific for every type of biomass, including the pretreated ones. Thus, one of the first challenges to be faced in order to turn 2G bioethanol viable commercially is to develop efficient systems of enzymes for biomass degradation (Verma et al. 2010). Due to the high costs and limited capacity for enzyme production, new ways to make biomass available for fermentation could be helpful, since they could hopefully lead to the use of lower proportions of enzymes in the process.

The proposed way to couple pretreatment and hydrolysis has been the use of enzyme cocktails on cell walls of pretreated materials (Fig. 13.1). Such enzyme cocktails are usually artificial assemblies of extracellular proteins produced by microorganisms (Balat 2011). In fact, many initiatives exist to use microorganisms as producers of heterologous glycosyl hydrolases so that enzyme engineering could be used to improve their action.

The sources of enzymes chosen by the scientific community varies, but with the advent of metagenomic techniques, microorganisms and animal genes that encode for glycosyl hydrolases became the main focus for enzyme search in the hope to find new targets that could be somehow more efficient to hydrolyze plant cell walls. This strategy relies mainly on the idea that microorganisms that perform composting of plant residues in the environment and some animal digestive systems are capable to hydrolyze the plant cell walls (Gómez et al. 2008).

Some initiatives exist in which enzymes coding genes from microorganisms have been cloned into plants in order to try to loosen walls and turn them more amenable to hydrolysis (Kaida et al. 2009; Xin et al. 2011). Although expression of the enzymes *in vivo* have been demonstrated, there is no evidence that these biomasses would be more easily hydrolysed and/or pretreated than biomass derived from untransformed plants.

Fig. 13.1 Schematic representation of the second-generation process of bioethanol production, highlighting the different types of pretreatments and hydrolysis

Thus, even with the large effort of the scientific community world wide to improve pretreatment and hydrolysis processes, cell wall recalcitrance to hydrolysis continues to be a barrier to turn the 2G processes economically viable (Himmel et al. 2007). A common mistake has been to attribute recalcitrance solely to the presence of lignin. However, this recalcitrance is also due to the enormous complexity of the architecture of the cell wall with its several polymers integrated in a composite that has been selected in a way to avoid enzyme attack and degradation.

One additional strategy to be used to improve the knowledge about 2G processes that has not been consistently thought of, or experimented with the same intensity, is the use of hydrolytic systems that plants themselves possess. Some of them can be quite efficient to degrade and/or change the architecture of cell walls and might lead to important additions to 2G processes, especially with the advent of the synthetic biology era, in which the capacity of changing biological systems (e.g. turning on/off entire biochemical pathways) is expect to be developed.

Similarly to the strategies currently being designed in which biological engineering is going to be used within microorganisms to produce more efficient enzymes, plant biotechnology could help not only by the introduction of genes of animals and/or microorganisms, but also by finding mechanisms of cell wall hydrolysis that already exist in nature. The main mechanisms of this kind known are: (1) plant-microorganism interaction; (2) seed cell wall storage mobilization; (3) fruit ripening, (4) abscission and (5) aerenchyma formation.

In this chapter, we will provide a review of aspects of some representative mechanisms that could be relevant to improve plants so that they would be better

prepared for pretreatment and hydrolysis. Here, this process will be named *biological pretreatment*. The idea is that in the future, plants could have some of their hydrolytic processes redesigned to alter some features of the cell walls in the way of turning them more suitable for use in industry, without however losing the perspective of the technologies current under development for 2G bioethanol production.

In order to understand how walls can be hydrolysed, some aspects of cell wall composition, structure and architecture will be introduced in the following section. The understanding of the cell wall complexity will allow the reader to appreciate how some natural systems in which walls are modified could be used for biotechnology applications in bioethanol production.

13.2 Composition, Structure and Architecture of the Plant Cell Wall

The cell walls are composed of a mixture of polymers, mainly carbohydrates, proteins and secondary metabolites. These polymers interact through a mixture of covalent and non-covalent linkages to form a “supramolecular complex” that is thought to be a multifunctional structure responsible for controlling the mechanical properties of the cell.

In order to elucidate plant cell wall structure and functions, wall scientists have followed some key steps mainly during the second half of the 20th Century. The first step was to set up methods for extraction, determination of composition and structure of wall components. This step was followed by the development of methods to determine the structure (linkage types) and physico-chemical properties of these polymers. All this work culminated in the proposition of a succession of models that pictured a general assembly for the polymers in the wall (Keegstra et al. 1973; McCann and Roberts 1991; Carpita and Gibeaut 1993). Likewise, many aspects of the biochemistry of the wall were developed, culminating in the characterization of several glycosyl hydrolases (e.g. Fry 2004) that correlate with physiological events in plants, which are controlled by plant hormones and environmental cues. With the advance of cellular and molecular biological techniques, part of the wall research community invested in finding and correlating wall structure with genes associated with its metabolism (e.g. Holland et al. 2000; Lima et al. 2001) and also succeeded to find probes (enzymes and monoclonal antibodies) capable to localise wall components in the cell (e.g. Willats et al. 2001; Pattathil et al. 2010).

McCann and Roberts (1991) coined the term “architecture” of the cell wall in a reference to the existence of three different independent domains in the wall: pectin, cellulose-hemicellulose and proteins. This view implies that the three domains might interact and this sole interaction would have emergent properties. Carpita and Gibeaut (1993) showed that at the level of higher plants, the wall structure has different polysaccharides (e.g. arabinoxylan, β -glucan, xyloglucan and mannan)

that may play similar functions. Thus, the “architectural” model of the wall points out that cell wall structure is degenerated and that the domains are changing during evolution, i.e. monocots and ferns changed their main hemicelluloses from xyloglucan to arabinoxylan and mannans respectively, with a concomitant decreased pectin domain (Buckeridge 2006; Sarkar et al. 2009).

In higher plants, cellulose, (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan, is the most abundant biological material on earth and in dry wood correspond around of 40–50 % of dry mass. Hemicellulose is the second polysaccharide representing 25–35 % of dry mass and their composition is a mixture of various polymerised monosaccharides, such as xylose and arabinose or glucose, mannose and galactose whose proportions change according to the plant tissue and the species.

The principal hemicelluloses found in nature are xyloglucan, galactomannan or galactoglucomannan, β -glucan and glucuronoarabinoxylan (GAX). Xyloglucan is a major hemicellulose in the primary walls of flowering plants, all non-monocots and about one-half of monocot species. Some seeds store this polysaccharide in large amounts as a resource for the embryo after germination (Buckeridge et al. 2000a). Xyloglucans typically comprise (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan backbones, with three of every four glucose residues substituted with (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-xylopyranosides, and some of the xylose residues are further substituted with (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopyranosides. The most widespread technique used for studies on xyloglucan has been the digestion with a *Trichoderma* endo- β -glucanase (Anderson and Stone 1975; Tiné et al. 2006). This enzyme hydrolyses xyloglucan polymers only on unbranched glucosyl residues.

The cell walls from grasses (Poales), which are the main plants used in bio-energy, have a distinct architecture when compared with non-monocots and non-Commelinid monocots (Carpita and Gibeaut 1993). Besides the fact that low levels of pectin are present in their walls, grasses contain as their main hemicelluloses the mixed-linked (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan (β -glucan) and glucuronoarabinoxylan (GAX).

β -Glucan interlaced by GAX of low degree of substitution and glucomannans, is thought to be tightly associated with the cellulose microfibrils. GAX of higher degree of arabinosyl substitution and some glucomannan constitutes the major pore-determining interstitial material between the microfibrils (see below).

One of the principal enzymes involved in the depolymerization of the endosperm β -glucan is the (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan endohydrolase, whose activity parallels that of the *B. subtilis* enzyme in that hydrolysis is restricted to (1 $\rightarrow$ 4)- β -linked glucosyl residues adjacent to (1 $\rightarrow$ 3)- β -linked residues on the non-reducing side (Parrish et al. 1960). Like the *B. subtilis* endohydrolase, hydrolysis of β -glucan with these enzymes yields mostly cellobiosyl- and cello-triosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-glucosyl oligosaccharides and smaller amounts of larger cello-dextrin-(1 $\rightarrow$ 3)-glucose oligomers (Anderson and Stone 1975).

In GAX, the arabinose residues are attached at the *O*-3 positions along the (1 $\rightarrow$ 4)- β -linked xylan backbone, and the glucuronic acids are attached to the *O*-2 positions (Carpita 1996). Arabinoxylans are widespread in the walls of all flowering plants, but in nongramineous species the polymer is of much lower abundance,

and the arabinose residues are attached mostly at the *O*-2 rather than the *O*-3 of the xylosyl units.

A highly substituted GAX (HS-GAX), with six of seven xylosyl branched units is associated with the maximum growth rate of coleoptiles of the grass species *Lolium multiflorum* and a sequence-dependent xylanase was found that requires branching with GlcA to cleave the neighboring (1 → 4)- α -D-xylosyl linkage (Nishitani and Nevins 1991). When maize GAXs are depleted of arabinosyl units by mild-acid hydrolysis, this endo- β -D-xylanase releases a homogeneous group of deca- or undecamers of glucuronoxylan. The xylosyl units are also substituted with acetyl groups at the positions *O*-2 and *O*-3 and some methyl groups have been detected (Carpita 1996).

Porosity of the GAX domain could be determined by the extent of removal of the appendant units. Some highly substituted GAX remain intercalated in the small amount of pectins that are also found in the primary wall. Because β -glucans are thought to be tightly associated with individual cellulose microfibrils (Carpita et al. 2001), GAX might be the main molecule in the interstitial space. However, Buckeridge and Crivellari (unpublished) have recently performed experiments with sugarcane walls that did not support this hypothesis. When isolated walls (alcohol insoluble residues) of leaves and culms of sugarcane were treated with lichenase (a glycosyl hydrolase that attacks specifically β -glucan), most of the polymer present in the walls was hydrolyzed and, at the same time, its retrieval did not interfere in the action of endo β -xylanase on the wall. Also, De Souza et al. (2013) observed that β -glucans in sugarcane walls are lightly associated with cellulose and/or the cellulose-hemicellulose matrix in the wall. These data suggests that in sugarcane, although β -glucan is present in some association with other polymers in the wall, they seem to be free for enzyme hydrolysis whereas GAXs are likely to be strongly bound to other polymers, probably cellulose.

Another distinctive feature of Poales and their relatives is the enrichment of aromatic substances in nonlignified walls (Carpita 1996). A large portion of the aromatic substances is esters of hydroxycinnamates (Harris and Hartley 1980). The GAXs are cross-linked in walls by both esterified and etherified hydroxycinnamates and by other phenolic substances, as ferulic acid (Iiyama et al. 1994).

On the basis of the knowledge of the structure of the cell wall polysaccharides, the mode of action of the glycosyl hydrolases and also the genes that encode for these enzymes, it is now possible to design routes that can deal with the complex hydrolysis mechanisms of either the less complex seed polysaccharide degrading systems or even to access more complex wall systems such as the ones from grasses. The latter is not an easy task as relatively little knowledge exists about the composition, structure and architecture of the wall of most bioenergy feedstocks.

The cell walls of one of the most important bioethanol feedstocks, sugarcane, has been recently analysed by De Souza et al. (2013), who demonstrated that hemicelluloses are quantitatively the main components of the cell walls. Regarding carbohydrates alone, whereas hemicelluloses account for ca. 60 % of the walls, cellulose makes around 30 %, and pectins about 10 %. Hemicelluloses are of three types: arabinoxylan, β -glucan and xyloglucan, the former being about

50 % of the hemicelluloses with the other two types sharing the rest in equal proportion. These authors highlighted the elevated complexity of cell walls and proposed a model for enzyme hydrolysis in which phenylpropanoids in the wall would have to be retrieved first in order to open the way for carbohydrate specific enzymes, pectins being the first to be attacked, followed by the members of the cellulose-hemicellulose matrix.

In summary, cell wall hydrolysis for bioenergy production purposes can be thought of as a procedure capable to disassemble cell wall architecture so that individual polysaccharides would be available to hydrolases. The goal of the process is the production of fermentable monosaccharides. On the other hand, even if the cell wall architecture can be dismantled, the polysaccharides released would still offer the challenge related to their branching patterns, which are different for every polysaccharide, resulting in a rather large diversity of combinations that are named fine structures.

Although the structure of cell wall polymers have been studied for several species, less attention is given to fine structure studies. Since the fine structure of polysaccharides could involve a formation of a glycomic code and interfere in hydrolysis efficiency (De Souza and Buckeridge, unpublished), the understanding of branching patterns and its combinations could be an important issue for 2nd generation processes (see topic 13.4).

In order to illustrate how natural systems could be helpful in bioenergy sector, in the following sections we will discuss five major systems existent in nature, which include cell walls modifications by enzymes produced for specific situations. It must be highlighted here that these items do not intend to review every biological process exhaustively, but only give key information that are relevant for the mechanisms of cell wall modifications (including hydrolysis) that could be used to transform plants and make them more suitable as bioenergy crops.

13.3 Cell Wall Degradation During Plant-Microorganism Interaction

When a pathogen invades a plant tissue, a biochemical conflict takes place, in which host and invader will produce a series of substances, the former to defend itself and the latter to penetrate in the cells (Garcia-Brugger et al. 2006). Among the strategies used by both organisms there are cell wall hydrolases (Walton 1994). In this way, the process of plant-microorganism interaction offers an opportunity to find ways to efficiently disassemble the plant cell wall. Both, saprophytic and pathogenic microorganisms produce extracellular enzymes that can degrade plant polysaccharides. These microorganisms, including bacteria and fungi, and also invertebrates as nematodes can digest cell wall polymers in order to obtain sugars and energy for their growth as well as to penetrate and colonize the cells in a plant tissue (Walton 1994; Annis and Goodwin 1997). In most cases, plants will respond with a reaction named hypersensitivity, which includes programmed cell

death and with that can restrict the infectious region to a small area surrounding the infection. However, in these cases, pathogens can use this opportunity to feed on dead cells and gain nutrients and with that they may become even more invasive (Greenberg and Yao 2004).

The first class of cell wall hydrolases produced by the pathogen is the pectinases (Tomassini et al. 2009). They are thought to loosen the tissue through digestion of the middle lamella and consequently kill the plant cells that they attack (Cooper 1983). The pectinases known to be involved in fungal and bacterial invasion are endo- and exo-polygalacturonases, pectate-lyases, and pectin methylesterases (Walton 1994; Lagaert et al. 2009). It is also believed that even saprophytes need to use cell wall degradation strategies in order to establish interaction with the plant and for that they also produce pectinases (e.g. Marques et al. 2006).

Pectins are polysaccharides that control cell wall porosity. Some studies demonstrated that the porosity of the substrate walls is the main limiting factor in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass (Chandra et al. 2007). Thus, the knowledge about how microorganisms use the pectinases to invade the plant could be a way to improve the biomass hydrolysis to 2G bioethanol.

Futhermore, several other enzymes that are able to hydrolyse cell walls can be produced by microorganisms. Recently, the need for enzymes to be used in the production of bioethanol from biomass led many groups to produce a large amount of scientific information about glycosyl hydrolases from microorganisms. The isolation and characterization of enzymes as well as cloning their genes, open a way to engineering those derived from microorganisms, i.e. modify them to perform hydrolysis more efficiently (Serpa and Polikarpov 2011; Ward 2011). Then, new cocktails of enzymes could be designed that would efficiently produce free fermentable sugars for bioethanol production. A review of the enzymes from microorganisms used for bioenergy has been recently published (Polizeli et al. 2011).

13.4 Seed Cell Wall Storage Mobilization

Cell Wall Storage Polysaccharides (CWSP) are found as the principal storage compound in seeds of many taxonomically important groups of plants. These groups developed extremely efficient biochemical mechanisms to disassemble cell walls and use the products of hydrolysis for growth. During evolution, several different groups of polymers have been selected as reserves (e.g. mannans, galactomannans, galactoglucomannans, arabinogalactans and xyloglucans) (Buckeridge et al. 2000a, 2000b; Buckeridge 2010). The selective pressures that ended up producing CWSP were directed towards an increase their proportion by introducing a storage cell wall between already existent primary walls (Tin, Braga, Pattathil, Hahn and Buckeridge, unpublished).

The CWSP have different chemical structures that are related with different biological functions. Mannans and galacto- and glucomannans that are present in palm and coffee seeds and lettuce and tomato respectively are insoluble in water

and display strong intermolecular interaction. Because of these characteristics, their biological function is usually associated with conferring hardness to plant tissues. Endo- β -mannanase is the principal enzyme involved in mannan hydrolysis in all species studied and several genes have been cloned whose expression is specific to the seed (Bewley et al. 1997; Lisboa et al. 2006; Gong and Bewley 2007).

In legumes, the main function of the endospermic cell walls appear to be storage, with the yield of galactomannan reaching more than 30 % of the seed dry weight in many species (Buckeridge et al. 2000a). These walls are thickened with galactomannan and in certain cases (e.g. *Trigonella foenum-graecum* and *Schyzolobium parayba*) the protoplasm disappears, giving place to the storage wall. In these cases, the endosperm is non-living and degradation is performed by three enzymes (α -galactosidase, endo- β -mannanase and exo- β -mannosidase) made in the aleurone layer (Reid 1971; Buckeridge and Dietrich 1996).

Differently from being stored in the endosperm, arabinogalactan and xyloglucans are stored in cotyledons. This is extremely relevant because the cotyledon is, evolutionarily speaking, an adapted leaf and the integration of the metabolism of these polysaccharides with the entire plant is likely to preserve several features of the leaf cell walls.

Pectin polymers are also found as cell wall storage polysaccharides, notably arabinogalactan (Buckeridge et al. 2000b). The cotyledons of lupins (especially *Lupinus angustifolius*) have been used as a model to study mobilization of this polymer.

Lupinus angustifolius seeds accumulate high proportions of galactan (Buckeridge and Reid 1994). These authors showed that an exo- β -(1,4)-galactanase purified from *L. angustifolius* seed acts specifically on this type of galactan. This enzyme is analogous to galactanases found in fruits (TBG4 in tomato for example—see below) where it is thought to play a major function in the changes of porosity in cell walls (Brummell 2006).

Of the CWSP known, xyloglucan seems to be the more complex in most senses. Its basic structure is similar to the primary wall xyloglucans. They have a backbone composed of (1 $\rightarrow$ 4)- β -linked glucan (like cellulose) with regular branching with (1 $\rightarrow$ 6)- α -linked xylosyl residues that can be branched further with (1 $\rightarrow$ 2)- β -linked galactosyl residues. There is no case reported where fucose was detected in storage xyloglucan. Four enzymes responsible for storage xyloglucan degradation have been detected, purified and characterized (α -xylosidase, β -galactosidase, β -glucosidase and xyloglucan-endo- β -glucanase, latter on renamed xyloglucan transglucosylase/hydrolase (XTH) (Buckeridge et al. 2000a; Buckeridge 2010).

In *Hymenaea*, Buckeridge et al. (1997) discovered that storage xyloglucan contains two types of constitutive blocks in the main chain, i.e., XXXG and XXXXG. Later on, Tiné et al. (2006) showed that these blocks are not combined randomly in the polymer molecules, which led to the proposition that storage xyloglucans might have a combination of branching patterns that forms a code that have to be decrypted by the enzymatic system in order to be hydrolysed (Buckeridge 2010). Indeed, the fact that branching of cell wall polymers might not be random has been also observed early on for galactomannans (Reid and Edwards 1995).

As this kind of information is not available in most cases, research should be urgently directed to that in order to complement the efforts in the search for new enzymes as well as enzyme engineering.

13.5 Fruit Ripening

During ripening, the cells of fruits display changes in cell walls so that the final result will afford the release of seeds for dispersion. Several species have been adapted to human consumption and became sources of food, being nowadays extremely important in agriculture. That is the case of tomato, apple, pear, melon, papaya, grape to name but a few. Due to the economic importance of fruits, development and ripening have been intensively studied, with tomato being one of the most studied fruit regarding studies of cell wall changes related to texture (Brummell and Harpster 2001; Brummell 2006). Changes in fruit texture that occur during ripening in many cases lead to softening, this process being slightly different for each species (Harker et al. 1997; Brummell 2006). Nonetheless, in all cases the texture is related to changes in cell walls that are associated with the production of several hydrolases. Due to the fact that enzymes can act to hydrolyse fruit cell wall polysaccharides and/or to allow structural changes that modify the mechanical properties of plant tissues, fruit systems can be considered as an opportunity to find mechanisms of cell wall degradation in plants that could help developing biotechnology for bioenergy.

In fruit systems, the most studied degradation process is the activity of endopolygalacturonases, pectin methylesterases and β -galactosidases on pectic matrix of the walls. Together with the detection of enzyme activities, changes in cell walls of tomato are consistent with a large decrease in uronic acid as well as even larger decreases in galactose in wall fractions (Ahmed and Labavitch 1980; Rose et al. 1998; Brummell and Harpster 2001; Brummell 2006).

It has been demonstrated that pectinases are associated with ripening and softening through degradation of endopolygalacturonases present in the middle lamella. The action of this enzyme is thought to lead to cell separation, a phenomenon that is linked to the subsequent softening of the fruits and change in their texture and taste (Fray and Grierson 1993; Barsan et al. 2010).

The xyloglucan-cellulose network has also been pointed out as an important target in ripening (Rose and Bennett 1999; Brummell 2006). These authors highlight the role of expansions and XTHs in the process and the former authors even compare the process of fruit ripening with the cell expansion system in hypocotyls. Brummell (2006) reviewed fruit ripening from the viewpoint of the wall changes, putting forward the idea that whereas pectin degradation varies among different fruit species (Brummell 2006), the xyloglucan-cellulose network seems to undertake changes that are much more consistent among species. However, the author also highlights the fact that, contrarily to what has been observed for pectins, xyloglucan small fragments have not been detected. Thus, the effects of expansin and enzymes on the xyloglucan-cellulose matrix seem to be more

towards a relaxation of this matrix rather than hydrolysis. This seems to lead to cell wall swelling that happens concomitantly with pectin solubilization.

The increase in pore sizes, thought to be related to the attack of α -galactanase in pectin matrix (Brummell 2006), probably opens the way for expansions, XTHs, cellulases, as well as other debranching enzymes, that will attack the cellulose-hemicellulose matrix of the wall, finally changing wall texture as a whole. Indeed, according to Carpita et al. (1979), pore sizes of the walls in plant tissues would be in the range of 35–40 Å, whereas the glycosyl hydrolases stoke radius [e.g. a 20 kDa protein would be approximately 2.5 nm according to Carroll and Somerville (2009)] is in general higher than the pore sizes, so that this is a clear limitation for penetration of enzymes in the cell wall matrix.

Although endo- β -glucanases have been found to increase during fruit ripening, very little evidence has been produced that cellulose would be hydrolysed. However, it has been speculated that cellulases would be capable to act on the surface of microfibrils (Brummell 2006) without, however, any assignment of a function for this event.

In spite of the fact of hydrolysis, in a broad sense, being the main process in course during fruit ripening, other steps such as cell separation and expansion, have been observed (Brummell 2006). On the other hand, differently from some other cell wall degradation processes such as aerenchyma formation and abscission (see below), fruit ripening seems do not include programmed cell death.

From a general point of view, fruit ripening is a process in which walls are firstly attacked by pectinases that increases wall porosity, probably allowing the action of other enzymes like XTHs and endo- β -glucanases that will transform the cellulose-hemicellulose matrix, promoting swelling and increasing even more wall porosity. The extensins that bind to the cellulose-hemicellulose matrix of the wall also could participate of these processes, being probably the first proteins to interact with the wall matrix. Thus, the cell wall alteration plus a higher hydration capacity given by the presence of pectins with lower molecular weight modifies fruits softening.

All this knowledge is extremely useful for bioenergy purposes, as it makes possible to understand details of how plants can manipulate their own walls. These events could be compared with the ones that occur during biomass pretreatment process used to achieve the 2G bioethanol. The possibility of applying such knowledge in bioenergy crops to produce similar effects in grass stems cell walls (e.g.) could lead to the establishment of a biological pretreatment that could be implemented using synthetic biology tools in the future.

13.6 Abscission

Abscission is a general term applied to the processes that takes place during the detachment of leaves, fruits, seeds and also cotyledons, lateral branches and many reproductive structures. In all cases studied, extremely precise biochemical pathways lead to cell wall modification and breakdown in order to form a fracture line

known as the abscission zone. The events that occur during abscission and dehiscence processes are clearly related to cell wall modification, in a very similar way to the other ones reported in this chapter.

Roberts et al. (2002), highlight the facts that endopolygalacturonases and endo- β -glucanases are closely related to the processes of cell separation. In fruits like tomato, silencing of abscission-related polygalacturonases (e.g. TAPG1) led to a delay in abscission and increased the force needed to break the abscission zone in explants treated with ethylene (Jiang et al. 2008).

In the abscission zone, cortex cells of different plant tissues are thought to be positionally differentiated target cells that will receive the signal from hormones (ethylene, auxin, abscisic acid, gibberellin) in such a balance that the cross talk among these will lead to transdifferentiation and finally to abscission. McManus et al. (1998) demonstrated the existence of transdifferentiation in mature cortical cells of bean abscission tissues. According these authors, this means that cells from the cortex of some plant tissues have the flexibility to differentiate into functionally competent ethylene-responsive cells that exhibit a gene expression compatible with an abscission cell.

Although not reported in most cases, cell wall degradation is thought to occur during abscission, since detection of activity of endo- β -glucanase has been reported for many abscission systems (Roberts et al. 2002). Also, accumulation of mRNA related with genes encoding Cel1 and Cel4 in tomato fruit and flower abscission zones have been reported (González-Carranza et al. 1998).

The similarity of this process with the ones described above is remarkable. Abscission is widespread in plants, occurring in many different tissues of different organs in plants. It includes wall separation and expansion, which are associated with pectin degradation as well as modifications in the cellulose hemicellulose matrix. However, programmed cell death has not been reported for abscission processes, according to the literature revised for this chapter. Thus, there seems to be a great variety of combinations of action of hydrolases to perform cell separation and hydrolysis so that it could be used to design technologies associated to 2G bioethanol production.

13.7 Aerenchyma Formation

Aerenchyma comprises a series of interconnected gas chambers developing on parenchymatic tissue (cortex) of shoots and roots as a result of sequential events, showing typical features of a programmed cell death process. Its formation is regarded as a response to oxygen shortage (Gunawardena et al. 2001a), exogenous ethylene (Gunawardena et al. 2001b), nitrogen, phosphorus and/or sulphur starvation (He et al. 1994; Siyiannis et al. 2011), mechanical impedance (He et al. 1996b), oxidative stress (Steffens et al. 2011) and osmotic stress (Karahara et al. 2012).

In opposition to the inducible aerenchyma, the constitutive formation is commonly observed in aquatic species as *Juncus effusus* (Visser and Bögemann 2006) and *Sagittaria lancifolia* (Schussler and Longstreth 2000), and also in maize relatives (Mano et al. 2007) and in rice wetland species (Justin and Armstrong 1991), independently of environmental stimuli. In both cases, its development lies upon a cell separation process termed schizogeny (thought of as a cell separation process that does not include cell wall hydrolysis). Alternatively, for the lysogenic process (i.e. cell separation followed by cell wall hydrolysis) to take place, the cells targeted to form aerenchyma clearly undergo a programmed cell death. It is essential to mention that both processes rely on polysaccharide hydrolysis, whereas the cell separation in schizogenous aerenchyma formation depends on middle lamella degradation. As for the lysogenous process, cell wall modifications occur and for that a wide array of enzymes would be required.

Concerning cell wall modifications, most of the aerenchyma-related data is restricted to the lysigenic and inducible formation in maize roots. As reported for other cell degradation events, in this model the inductive role is played by ethylene (He et al. 1992, 1996a; Gunawardena et al. 2001a). One of the earliest signs of aerenchyma formation is the ethylene accumulation, followed by cell death and endo- β -glucanases activity (Kawase 1979; He et al. 1996a). Indeed, inhibitors of cell death or ethylene biosynthesis block the enhancement of endo- β -glucanases activity (He et al. 1994, 1996a), suggesting the coupling between cell wall degradation, ethylene signalling and programmed cell death.

Another potentially degradative enzyme associated with aerenchyma formation is endo- β -xylanase. The rising activity levels of this enzyme were obtained in waterlogged maize roots, coinciding with the rising of ethylene levels (Bragina et al. 2001). Also concerning ethylene induction, the role of XTH, a putative cell wall loosening enzyme, was evaluated during aerenchyma formation. Transcripts of certain XTH accumulated in flooded maize roots forming aerenchyma, reaching its maximum within 12 h and remaining high for 144 h during flooding. On the other hand, the inhibition of ethylene synthesis blocked any rise of this transcript accumulation, while exogenous ethylene led to XTH transcript accumulation even under aerobic conditions (Saab and Sachs 1996). A transcriptional analysis corroborated the induction of XTH expression during the aerenchyma formation in maize roots, as well as for endo- β -glucanase (Rahji et al. 2011).

Even though the enzymatic or transcriptional approaches have been used to suggest the link between a set of glycosyl hydrolases and aerenchyma formation, to our knowledge, data regarding cell wall modifications in situ have been reported only by Gunawardena et al. (2001b), who documented the distinctive levels of methyl esterification changing in the middle lamella in cross sections of the cortex of the maize root along aerenchyma formation. These authors observed that those changes initiated before ultrastructural modifications typical of cells undergoing programmed cell death that have been reported in a previous work (Gunawardena et al. 2001a). Indeed, rise in the expression of pectin methyl esterases, pectate lyase and an endopolysaccharuronase have been observed during aerenchyma formation (Rahji et al. 2011). These data not only corroborate the existence of

homogalacturonan modifications but also suggest that more severe changes on the cell wall structure and not only on the middle lamella can occur. We have observed a similar pattern of events in sugarcane roots, not only with the pectinases, but also with the observation of the rise in gene expression of several genes that encode hemicellulases (e.g. lichenase, endo- β -xylanase, XTH, β -glucosidase—unpublished results).

Gunawardena et al. (2001a) reported the formation of vesicles and vacuole rupture while the cell wall appeared intact. It is reasonable to hypothesize that the release of hydrolytic enzymes in this step could be responsible for the cell wall degradation (Bouranis et al. 2007).

The data produced that are related with aerenchyma formation to date indicates that this phenomenon is similar to the other processes discussed above in the sense that cell walls are modified, including cell separation, hemicellulose-cellulose matrix relaxation and perhaps some hydrolysis of cellulose. Thus, the knowledge about aerenchyma formation can also be considered as a possible target for use in biotechnology that includes cell wall modifications for bioenergy purposes. Recently we have produced a consistent set of results describing events during the aerenchyma formation in sugarcane roots. We found that the events are essentially similar to maize (e.g.), with the exception that in sugarcane it is constitutively activated. Our results (manuscripts in preparation) show very clearly that cell separation, programmed cell death, hemicellulose-cellulose changes and some attack to cellulose occurs in sugarcane. We are now searching for the transcription factors responsible for regulating this processes aiming at possibly inducing them in culms so that this process might be used as a biological pretreatment in the future.

13.8 Cell Wall Modifications in Natural Systems in the Context of Bioenergy

As mentioned above, in order to establish 2G bioethanol production, the retrieval of energy from wall polymers would have to include cell wall modification. From the different systems discussed along this chapter, it is possible to think of combining some of them in order to help increasing the production of bioethanol from bioenergy feedstocks that are being studied for use in 2G processes.

In Table 13.1 the different modules that plants apparently use to transform their cell walls in order to perform different biological functions are shown in perspective. Six events seem to be common to most of the natural processes that clearly involve modifications in cell walls. Some of these events have been investigated more deeply and others are implied, but not proven, as no direct experimental evidences have been produced for them yet. In Table 13.1, the events are placed in an order (from left to right) that they seem to occur in all systems. However, some steps are missing in some of the processes (e.g. cell separation in storage cell wall mobilization and programmed cell death in fruit ripening).

Table 13.1 Correlation among situations that include cell wall modifications and natural events in plant biology where these situations are key to biological function

Processes	Target cells	Cell separation	Cell expansion	Programmed cell death	Hemicellulose hydrolysis	Cellulose hydrolysis
Plant microorganism interaction	?	YES	?	YES	YES	YES
Storage cell wall mobilization	?	NO	YES	?	YES	?
Fruit ripening	YES	YES	YES	NO	YES	YES/NO
Abscission	YES	YES	YES	?	YES	YES
Aerenchyma formation	YES	YES	YES	YES	YES	?

YES = there is literature showing that it occurs in most (or all) systems studied; NO = not observed in the systems studied to date; YES/NO = observed only in some of the systems studied to date; ? = not reported to occur to date

The combination of events is consistent with a chain of processing steps that would follow a sequence of modifications in the walls that are apparently similar in the five processes reviewed in this chapter. The general idea is that in a parenchymatic tissue, a given group of cells would be targeted to start the process (as seen in abscission according to Roberts et al. (2002) and also in aerenchyma formation). The following step would be cell separation that probably involves the action of endo-polygalacturonase(s) on the pectins of the middle lamella. This might be involved with the release of calcium that could be responsible for the signaling related to programmed cell death. The latter seems to occur in parallel with cell expansion and subsequent production and release glycosyl hydrolases that would attack hemicelluloses and cellulose. Every one of these events can be regarded as a *module* that can or not be used in the complete process that leads to partial or complete cell wall modification.

There are two possible ways to use this information for biotechnology purposes: (1) using them for production of transformed plants; or (2) express some of the hydrolase genes heterologously in order to use them as additions to enzyme cocktails already in use in industry.

For the first option, it should be possible to use the modern tools of synthetic biology in order to induce cell separation and expansion along with some modification of the hemicellulose-cellulose matrix. In this case, plants would produce biomass with the characteristics expected to be analogous to a pretreated biomass material, i.e. materials that would be easily hydrolyzed when being processed in industry, especially during the hydrolysis process. For advancing the second option, some of the enzymes known to be present during hydrolysis processes in bioenergy feedstocks, such as sugarcane, miscanthus, maize, poplar, willow and others should be studied regarding their specificity. Some of these enzymes may be heterologously expressed for production and added to existent cocktails.

In both cases, there is a relatively long way to go in terms of production of the proof of concepts that will be necessary in order to develop the necessary technologies. However, in some cases, such processes are already present in plants and could be improved using transformation, possibly of transcription factors that trigger the whole process.

It is important to note here that wood feedstocks would probably have to be treated differently regarding the strategies discussed in this chapter. Wood feedstocks have large proportions of dead cells composed of high proportions of cellulose and also with a much higher degree of lignification. For this type of bioenergy feedstock, an addition to the strategy would be the modification of lignin composition to facilitate access to the cell wall polysaccharides, which in fact is currently under investigation (Vanholme et al. 2013). As grasses can have some lignin and phenylpropanoids in their cell walls, as well as the cells of the vascular system, whose walls bear many features in common with the wood tissues, the use of the strategies proposed in this chapter for tissues containing large proportion or primary cell walls, along with the ones being developed for decreasing lignin interference, would probably have to be coupled in the future in order to improve bioenergy production even more.

Based on the examples discussed in this chapter, it is very likely that natural processes that involve cell wall modifications in plants will be useful as additions to 2G bioethanol technologies, via the use of modern molecular techniques associated to systems and synthetic biology.

Acknowledgments This work is part of the production of the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol-INCT do Bioetanol (FAPESP 2008/57908-6 and CNPq 574002/2008-1) and of the Centro de Processos Biológicos e Industriais para Biocombustíveis-CeProBIO (FAPESP 2009/52840-7 and CNPq 490022/2009-0). Financial support by FAPESP Projects 2010/17104-5, 2010/17070-3, 2011/07586-5 and 2011/02344-3.

References

- Ahmed AE, Labavitch JM (1980) Cell wall metabolism in ripening fruit 1. Cell wall changes in ripening “Bartlett” pears. *Plant Physiol* 65:1009–1013
- Anderson MA, Stone BA (1975) A new substrate for investigating the specificity of glucan hydrolases. *FEBS Lett* 52:202–207
- Annis SL, Goodwin PH (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur J Plant Pathol* 103:1–14
- Balat M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manag* 52:858–875
- Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, Egea I, Rossignol M, Kuntz M et al (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot* 61:2413–2431
- Bewley JD, Burton RA, Morohashi U, Fincher GB (1997) Molecular cloning of a cDNA encoding a (1 → 4)- β -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* 203:454–459
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ (2007) Lysigenous aerenchyma development in roots: triggers and cross-talks for a cell elimination program. *Int J Plant Dev Biol* 1:127–140

- Bragina TV, Martinovich LI, Rodionova NA, Bezborodov AM, Grineva GM (2001) Ethylene-induced activation of xylanase in adventitious roots of maize as a response to the stress effect of root submersion. *Appl Biochem Microbiol* 37:722–725
- Brummell DA (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33:103–119
- Brummell DA, Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47:311–340
- Buckeridge MS (2006) Implications of emergence, degeneracy and redundancy for the modeling of the plant cell wall. In: Hayashi T (ed) *The science and the lore of the plant cell wall: biosynthesis, structure and function*. BrownWalker Press, Boca Raton, pp 41–47
- Buckeridge MS (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol* 154:1–7
- Buckeridge MS, De Souza AP (2013) The fine structure of cell wall polysaccharides might be related to the existence of a glycomic code in plant cell walls. In: Lam E (ed) *Compendium of bioenergy plants: sugarcane* (submitted)
- Buckeridge MS, Dietrich SMC (1996) Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth (Leguminosae-Faboideae). *Plant Sci* 117:33–43
- Buckeridge MS, Reid JSG (1994) Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192:502–511
- Buckeridge MS, Crombie HJ, Mendes CJM, Reid JSG, Gidley MJ, Vieira CJ (1997) A new family of xyloglucan oligosaccharides from cotyledons of *Hymenaea courbaril*: structure determination of the oligosaccharide XXXXG by enzymatic sequencing and NMR. *Carbohydr Res* 303:233–237
- Buckeridge MS, Dietrich SMC, Lima DU (2000a) Galactomannans as the reserve carbohydrate of legume seeds. In: Gupta AK, Kaur N (eds) *Developments in crop science*. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp 283–316
- Buckeridge MS, Santos HP, Tiné MAS (2000b) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* 38:141–156
- Buckeridge MS, De Souza AP, Arundale RA, Anderson-Teixeira KJ, DeLucia E (2012) Ethanol from sugarcane in Brazil: a midway strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. *GCB Bioenergy* 4:119–126
- Carpita NC (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:445–476
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1–30
- Carpita NC, Sabulase D, Montezinos D, Delmer DP (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205:1144–1147
- Carpita N, Tierney M, Campbell M (2001) Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol* 47:1–5
- Carroll A, Somerville C (2009) Cellulosic biofuels. *Ann Rev Plant Biol* 60:165–182
- Chandra RP, Bura R, Mabee WE, Berlin A, Pan X, Saddler JN (2007) Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:67–93
- Cooper RM (1983) The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In: Callow JA (ed) *Biochemical plant pathology*. Wiley, Chichester, pp 101–137
- De Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenerg Res* 6:564–579
- Dos Santos WD, Gómez EO, Buckeridge MS (2011) Bioenergy and the sustainable revolution. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, pp 15–26
- Fray RG, Grierson D (1993) Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends Genet* 9:438–443

- Fry S (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* 161:641–675
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D et al (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19:711–724
- Gómez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ (2008) Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol* 178:473–485
- Gong X, Bewley JD (2007) Shorting out the LeMANs: endo- β -mannanase genes and their encoded proteins in tomato. *Seed Sci Tech* 17:143–154
- González-Carranza ZH, Lozoya-Gloria E, Roberts JA (1998) Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends Plant Sci* 3:10–14
- Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6:201–211
- Gunawardena A, Lan H, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001a) Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212:205–214
- Gunawardena A, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001b) Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant Cell Environ* 24:1369–1375
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallet IC, Murray SH, Carter G (1997) Texture of fresh fruit. *Hortic Rev* 20:121–124
- Harris PJ, Hartley RD (1980) Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biochem Syst Ecol* 8:153–160
- He CJ, Morgan P, Drew MC (1992) Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *J Plant Physiol* 98:137–142
- He CJ, Drew M, Morgan PW (1994) Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. *J Plant Physiol* 105:861–865
- He CJ, Pinlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW (1996a) Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* subjected to mechanical impedance and hypoxia. *J Plant Physiol* 112:1679–1685
- He CJ, Morgan PW, Drew MC (1996b) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *J Plant Physiol* 112:463–472
- Himmel ME, Adney WS, Baker JO, Elander R, McMillan JD, Nieves RA, Sheehan JJ, Thomas SR, Vinzant TB, Zhang M (1997) Advanced bioethanol production technologies: a prospective. In: Woodward J, Saha B (eds) ACS symposium series, vol 666. American Chemical Society, Washington, DC, pp 2–45
- Himmel ME, Ruth MF, Wyman CE (1999) Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol* 10:358–364
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804–807
- Holland N, Holland D, Helentjaris T, Dhugga KS, Xoconostle-Cazares B, Delmer DP (2000) A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family. *Plant Physiol* 123:1313–1323
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent crosslinks in the cell wall. *Plant Physiol* 104:315–320
- Jiang CZ, Lu F, Imsabai W, Meir S, Reid MS (2008) Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. *J Exp Bot* 59:973–979
- Justin SHFW, Armstrong W (1991) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* 118:49–62

- Kaida R, Kaku T, Baba K, Oyadamari M, Watanabe T, Nishida K, Kanaya T, Shani Z, Shoseyov O, Hayashi T (2009) Loosening xyloglucan accelerates the enzymatic degradation of cellulose in wood. *Mol Plant* 2:904–909
- Karahara I, Umemura K, Soga Y, Akai Y, Bando T, Ito Y, Tamaoki D, Uesugi K, Abe J, Yamauchi D, Mineyuki Y (2012) Demonstration of osmotically dependent promotion of aerenchyma formation at different levels in the primary roots of rice using a ‘sandwich’ method and X-ray computed tomography. *Ann Bot* 110:503–509
- Kawase M (1979) Role of cellulase in aerenchyma development in sunflower. *Amer J Bot* 66:183–190
- Keegstra K, Talmadge K, Baurer WD, Albersheim O (1973) Structure of the plant cell walls. *Plant Physiol* 51:188–196
- Lagaert S, Beliën T, Volckaert G (2009) Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Stem Cell Dev Biol* 20:1064–1073
- Lima DU, Santos HP, Tiné MAS, Molle FD, Buckeridge MS (2001) Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. *Gen Mol Biol* 24:191–198
- Lisboa CGS, Tiné MAS, Buckeridge MS (2006) Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and importance for germination and early seedling growth. *Braz J Plant Physiol* 18:269–280
- Mano Y, Omori F, Takamizo T, Kindiger B, Bird R, Loaisiga C, Takahashi H (2007) QTL mapping of root aerenchyma formation in seedlings of a maize $\times$ rare teosinte “*Zea nicaraguensis*” cross. *Plant Soil* 295:103–113
- Marques MR, Buckeridge MS, Braga MR, Dietrich SMC (2006) Characterization of an extracellular endopolygalacturonase from saprobe *Mucor ramosissimus* Samutsevitch and its action as trigger of defensive response in tropical plants. *Mycopathologia* 162:337–346
- McCann MC, Roberts K (1991) Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd CW (ed) *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, London, pp 109–129
- McManus MT, Thompson DS, Merriman C, Lyne L, Osborne DI (1998) Transdifferentiation of mature cortical cells to functional abscission cells in bean. *Plant Physiol* 116:891–899
- Nishitani K, Nevins DJ (1991) Glucuronoxylan xylanohydrolase: a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J Biol Chem* 266:6539–6543
- Ong RG, Chundawat SPS, Hodge DB, Kesar S, Dale B (2013) Linking plant biology and pretreatment: understanding the structure and organization of the plant cell wall and interactions with cellulosic biofuel production. In: Carpita NC, Buckeridge MS, McCann MC (eds) *Plants and bioenergy*. Springer, New York
- Parrish FW, Perlin AS, Reese ET (1960) Selective enzymolysis of poly- β -D-glucans, and the structures of the polymers. *Can J Chem* 38:2094–2104
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z et al (2010) A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol* 153:514–525
- Polizeli MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jore JA (2011) Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, pp 117–136
- Rahji I, Yamauchi T, Takahashi H, Nishiuchi S, Shiono K, Watanabe R, Mliki A, Nagamura Y, Tsutsumi N, Nishizawa NK, Nakazono M (2011) Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *New Phytol* 190:351–368
- Reid JSG (1971) Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum). *Planta* 100:131–142
- Reid JSG, Edwards M (1995) Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: Stephen AM (ed) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York, pp 155–186
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza Z (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Ann Rev Plant Biol* 53:131–158

- Rose JKC, Bennett AB (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci* 4:176–183
- Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB (1998) Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol* 117:345–361
- Saab IN, Sachs MM (1996) A folding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *J Plant Physiol* 112:385–391
- Sarkar P, Bosneaga E, Auer M (2009) Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *J Exp Bot* 60:3615–3635
- Schussler EE, Longstreth DJ (2000) Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *Amer J Bot* 87:12–19
- Serpa VI, Polikarpov I (2011) Enzymes in bioenergy. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, pp 99–116
- Siyiannis VF, Protonotarios VE, Zechmann B, Chorianopoulou SN, Müller M, Hawkesford MJ, Bouranis DL (2011) Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation. *Protoplasma* 249:671–686
- Soccol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge MS, Ramos LP, Pitarello AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Biores Technol* 101:4820–4825
- Steffens B, Geske T, Sauter M (2011) Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. *New Phytol* 190:369–378
- Taylor LE II, Dai Z, Decker SR, Brunecky R, Adney WS, Ding SY, Himmel ME (2008) Heterologous expression of glycosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels. *Trends Biotechnol* 26:413–424
- Tiné MAS, Silva CO, Lima DU, Carpita NC, Buckeridge MS (2006) Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydr Polym* 66:444–454
- Tomassini A, Sella L, Raiola A, D'Ovidio R, Favaroni F (2009) Characterization and expression of *Fusarium graminearum* endo-polygalacturonases in vitro and during wheat infection. *Plant Pathol* 58:556–564
- Vanholme B, Cesarino I, Goeminne G, Kim H, Marroni F, Van Acker R, Vanholme R, Morreel K, Ivens B, Pinosio S, Morgante M, Ralph J, Bastien C, Boerjan W (2013) Breeding with rare defective alleles (BRDA): a natural *Populus nigra* HCT mutant with modified lignin as a case study. *New Phytol* 198:765–776
- Verma D, Kanagaraj A, Jin S, Singh ND, Kolattukudy PE, Daniell H (2010) Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnol J* 8:332–350
- Visser EJ, Bögemann GM (2006) Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytol* 171:305–314
- Walton JD (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol* 104:1113–1118
- Ward R (2011) Cellulase engineering for biomass saccharification. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, pp 137–153
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9–27
- Xin Z, Watnabe N, Lam E (2011) Improving efficiency of cellulosic fermentation via genetic engineering to create “smart plants” for biofuel production. *Enzymes in bioenergy*. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, pp 183–199