

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RONE CHARLES MARANHO

PROTEOMA TOTAL E DIFERENCIAL DE GEMAS AXILARES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA
CULTIVAR RB867515 EM DIFERENTES CORTES

MARINGÁ
2017

RONE CHARLES MARANHO

PROTEOMA TOTAL E DIFERENCIAL DE GEMAS AXILARES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA
CULTIVAR RB867515 EM DIFERENTES CORTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Pires da Silva Machado

Co-orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Adriana Gonela

MARINGÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Maranho, Rone Charles

M311p Proteoma total e diferencial de gemas axilares de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 em diferentes cortes./ Rone Charles Maranho. -- Maringá, 2017.
109 f. : il. color. , figs. , tabs. , mapa.

Orientadora: Prof.a. Dr.a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

Coorientadora: Prof.a. Dr.a. Adriana Gonela.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

1. *Saccharum* spp. 2. Longevidade do canavial. 3. Espectrometria de massas. 4. Proteômica. I. Machado, Maria de Fátima Pires da Silva, orient. II. Gonela, Adriana, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 22. ED.631.821
JLM000759

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os professores e pesquisadores, que peculiarmente contribuem para um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minhas orientadoras Prof. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Prof. Dra. Adriana Gonela, pela oportunidade, auxílio e confiança.

Agradeço a meu pai José Maranhão, minha mãe Inervina Barizon Maranhão e meu irmão Gustavo Barizon Maranhão pela força, apoio em todas as etapas da elaboração desse trabalho.

Agradeço à professora Dra. Marise Fonseca dos Santos da UFPR-Palotina, à Ana Lúcia de Oliveira Carvalho e toda equipe da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) da UFRJ onde foram realizadas as análises no espectrômetro de massas e pelo apoio, ensinamentos e auxílios técnicos que foram imprescindíveis para a execução desse trabalho.

Agradeço aos técnicos e colegas de laboratório, em especial a Adeline Neiverth da UFPR-Palotina pelo auxílio nos experimentos.

Agradecimento também aos técnicos Érika Cristina Takamizawa Sato e Reinaldo Bernardo, pelos puxões de orelha, auxílios e dedicação ao programa de Pós-graduação em Agronomia – PGA.

Agradecimento em especial à minha colega, amiga e namorada Mariana Mancini Benez, pela companhia, paciência e pela ajuda na execução da pesquisa, sendo sua ajuda essencial para a execução dos experimentos.

Agradeço ao Sr. Eurides Luiz Camargo Benez, sócio/diretor do grupo Nova Aralco-SP, pelo esforço, dedicação e apoio em nos fornecer o material biológico utilizados no presente trabalho.

Agradeço de coração a todos os professores que tive a oportunidade de contato, tanto em salas de aulas quanto pelos caminhos da vida, em especial à prof. Dra. Claudete Aparecida Mangolin e Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau, pelas dicas e auxílios prestados.

À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior, pela concessão da bolsa.

PROTEOMA TOTAL E DIFERENCIAL DE GEMAS AXILARES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA CULTIVAR RB867515 EM DIFERENTES CORTES

RESUMO

O setor sucroenergético tem papel importante na sustentabilidade de recursos energéticos e de consumo, sendo a cana-de-açúcar, matéria prima para obtenção de etanol, açúcar e energia. O sistema atual de cultivo da cana-de-açúcar envolve o plantio inicial da cana-planta e sucessivas rebrotas (socas), onde o cultivo se mantém na média de seis anos e cinco cortes, em lavouras comerciais. A queda da produtividade é evidente no sistema atual de cultivo, sendo de forma geral, inviável a manutenção do canavial a partir do quinto corte. Fatores extrínsecos e intrínsecos à cana-de-açúcar podem estar relacionados com a queda da produtividade, sendo que, a utilização de ferramentas moleculares como a proteômica pode colaborar com a elucidação dos efeitos genéticos e bioquímicos relacionados à resposta da planta a fatores externos, como os tratos culturais e fatores edafoclimáticos. O objetivo neste trabalho foi conhecer o efeito do cultivo da cana-de-açúcar na expressão proteica ao longo dos ciclos de corte da cana-de-açúcar, caracterizando o proteoma total e diferencial de gemas axilares da cana-planta e da quarta soca da cultivar RB867515. As proteínas totais foram extraídas em triplicata pelo método TCA/acetona adaptado para utilização em gemas axilares de cana-de-açúcar. As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e corado com azul de comassie. Cada *lane* do gel de poliacrilamida foi recortado, fracionado e tratado para purificação e isolamento dos polipeptídeos. Foi realizada a digestão trípica em cada fragmento com posterior separação por UPLC (Nano Acquity). Os polipeptídeos foram analisados em espectrômetro de massas Waters® Micromass® ESI-Q-Tof micro™. A adaptação do protocolo de extração de proteínas realizada no presente trabalho se mostrou efetiva na extração de proteínas totais em 200 mg de material vegetal. As amostras de proteínas das gemas axilares nos diferentes estágios de cortes apresentaram distintos padrões de bandas no gel de SDS-PAGE indicando modificação do proteoma nos diferentes estágios de cortes. Foram identificadas um total de 235 proteínas, destas 71 foram diferencialmente expressas na cana-planta, 52 na quarta soca e 112 foram expressas em ambos os cortes. As proteínas identificadas fazem parte das mais diversas estruturas celulares e/ou participam de processos biológicos como resposta a estresses, metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, regulação da expressão gênica, entre outros. Destacam-se entre as diferentemente expressas em cada corte,

proteínas relacionadas principalmente a estresses bióticos e abióticos, regulação da expressão gênica, fatores de transcrição e transdução de sinais. Muitas proteínas importantes detectadas na cana-planta, principalmente relacionadas com respostas de defesa das plantas, não foram encontradas na quarta soca. Na quarta soca destacou-se um conjunto de proteínas que indicam a influência de estresses abióticos e bióticos e condições de anóxia e/ou hipóxia sobre as gemas axilares desse corte, mesmo em gemas axilares não submetidas a essas condições. O proteoma diferencial da cana-planta e quarta soca representam modificações ao nível molecular com grande potencial para queda considerável de produtividade e longevidade encontrada nas idades de cortes mais avançadas nos canaviais.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Longevidade do canavial. Espectrometria de massas.

TOTAL AND DIFFERENTIAL PROTEOME OF AXILLARY BUDS OF SUGARCANE
CULTIVAR RB867515 IN DIFFERENT CUTS

ABSTRACT

The sugar-energy sector plays an important role in the sustainability of energy and consumption resources, with sugarcane being the raw material for obtaining ethanol, sugar and energy. The current sugarcane cultivation system involves the initial planting called plant cane and successive regrowths (ratoons), where the cultivation is maintained in the average of six years and five cuts, in commercial crops. The productivity decrease is evident in the current system of cultivation and generally, it is not feasible to maintain the sugar cane after fifth cut. Extrinsic and intrinsic factors to sugarcane may be related to the productivity decrease, and the use of molecular tools such as proteomics, may contribute to the elucidation of the genetic and biochemical effects in plant response to external factors, such as cultural practices and edafoclimatic factors. The objective of this work was to know the effect of sugarcane cultivation on protein expression during the sugarcane cutting cycles, characterizing the total and differential proteome of axillary buds of the plant cane and fourth ratoon of the cultivar RB867515. The total proteins were extracted in triplicate by the modified TCA/acetone method for use in axillary sugarcane buds. Protein samples were submitted to denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with comassie blue. Each lane of the polyacrylamide gel was fractionated and treated for purification and isolation of the polypeptides. Tryptic digestion was performed on each fragment with subsequent UPLC separation (Nano Acquity). The polypeptides were analyzed on Waters® Micromass® ESI-Q-ToF micro™ mass spectrometer. The adaptation of the protein extraction protocol, performed in the present work, was effective in the extraction of total proteins in 200 mg of plant material. Protein samples from the axillary buds at different cut stages showed distinct bands patterns in the SDS-PAGE gel if it was promising for the proteomic study. Two hundred thirty five proteins were identified, of which 71 were differentially expressed in the plant cane, 52 in the fourth ratoon and 112 were expressed in both cuts. The proteins identified are part of the most diverse cellular structures and/or participate in biological processes as a response to stresses, metabolism of carbohydrates, lipids and nucleic acids, regulation of gene expression, etc. Stand out in each cut, proteins related mainly to biotic and abiotic stresses, regulation of gene expression, transcription factors and signal transduction. Many important proteins detected in the plant cane, mainly

those that participate in defense responses of the plants, were not found in the fourth ratoon (five cut). In the fourth ratoon, were highlighted a set of proteins that indicate the influence of abiotic and biotic stresses and conditions of anoxia and/or hypoxia on the axillary buds of this cut, even in axillary buds not submitted to these conditions. The differential proteome of the plant cane and fourth ratoon represents changes at the molecular level with great potential for a considerable productivity and longevity decrease, found in the ages of more advanced cuts in the cane fields.

Keywords: *Saccharum* spp. Proteomics. Longevity of sugarcane. Mass spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais características agronômicas da cultivar RB867515.....	7
Tabela 2 Taxa de brotação das gemas axilares da cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515 cinco dias após o plantio em vermiculita.....	30
Tabela 3 Condições experimentais usadas para a separação dos peptídeos por cromatografia líquida	39
Tabela 4 Parâmetros utilizados na identificação das proteínas pelo Mascot.....	39
Tabela 5 Quantificação da mistura proteica obtida pelo método TCA/acetona com e sem Triton X-100.....	41
Tabela 6 Quantificação das proteínas totais da cultivar RB867515 extraídas pelo método TCA/acetona adaptado para gemas axilares de cana-de-açúcar.....	46
Tabela 7 Proteoma total da gema axilar da cana-planta da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar.....	48
Tabela 8 Proteoma total da gema axilar da quarta soca da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar.....	61
Tabela 9 Funções de proteínas diferentemente expressas na cana-planta com participação na resposta a estresses e desenvolvimento da gema.....	73
Tabela 10 Funções de proteínas diferentemente expressas na quarta soca com participação na resposta a estresses e desenvolvimento da gema	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquemas mostrando o processo de obtenção de cultivares atuais de cana-de-açúcar através do processo de Nobilização.....	5
Figura 2 Ambientes de produção da cana-de-açúcar.....	8
Figura 3 Inserção e disposição das folhas e localização do nó e entrenó no colmo.....	10
Figura 4 Ciclo da cana-planta e da cana-soca.....	10
Figura 5 Produtividade agrícola por estágio de corte – em t.ha ⁻¹	11
Figura 6 Colmo de cana-de-açúcar em processo de perfilhamento e enraizamento	13
Figura 7 Níveis de expressão dos genes nos organismos que caracterizam a genômica Funcional.....	15
Figura 8 Fluxo experimental em um estudo proteômico.....	19
Figura 9 Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	21
Figura 10 Imagem de satélite com demarcação da área da Fazenda Santo Antônio, do grupo Nova Aralco em Santo Antônio do Aracanguá-SP.....	26
Figura 11 Gema axilar individualizada em um minitolete.....	27
Figura 12 Minitoletes de cana-de-açúcar contendo uma gema axilar por nó e plantadas em vermiculita para ativação da brotação.....	27
Figura 13 Toletes cortados entre o 4° e 9° nó de plantas da cultivar RB867515 em diferentes cortes (primeiro, quarto e quinto corte).....	29
Figura 14 Gema axilar seccionada do nó central do colmo de cana-de-açúcar para posterior extração de proteínas totais.....	30
Figura 15 Minitoletes de cana-planta contendo as gemas axilares ativas (A) e dormentes/inativas (B).....	21
Figura 16 Divisão dos fragmentos para análises por espectrometria de massas.....	36
Figura 17 17a - Gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata. 17b – Proteína totais extraídas das cultivares CTC4 e RB966928 pela metodologia adaptada no presente trabalho e coradas com azul de comassie.....	42
Figura 18 Comparação entre as colorações por nitrato de prata e azul de comassie.....	43

Figura 19 Gel PAGE-Nativo com amostras de proteínas extraídas pelo método de TCA/acetona adaptado para extração de proteínas de gemas axilares de cana-de-açúcar.....	43
Figura 20 Gel SDS-PAGE das proteínas totais extraídas das gemas axilares da cana-planta e quarta soca.....	44
Figura 21 Bandas diferenciais indicando alteração no proteoma das gemas axilares nos diferentes cortes.....	45
Figura 22 Diagrama de Venn com a quantidade de proteínas e cadeias polipeptídicas identificadas nas gemas axilares da cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515, e proteínas diferentemente encontradas em cada idade de corte analisada.....	47
Figura 23 Via biosintética do jasmonato em plantas.....	85
Figura 24 Diversidade funcional das proteínas 14-3-3s.....	88

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	Classificação botânica da cana-de-açúcar.....	4
2.2	Cultivar RB867515 de cana-de-açúcar.....	6
2.3	Aspectos morfológicos e do cultivo da cana-de-açúcar.....	9
2.4	Fenologia da cana-de-açúcar.....	12
2.5	Genômica funcional.....	15
2.6	Proteômica.....	17
2.7	Proteômica em cana-de-açúcar.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Material vegetal.....	25
3.2	Adaptação de protocolo para extração de proteínas totais das gemas axilares de cana-de-açúcar.....	31
3.3	Extração das proteínas totais para análise no espectrômetro de massas, quantificação por fluorimetria e pré-fracionamento em gel SDS-PAGE.....	35
3.4	Digestão triptica em gel SDS-PAGE e extração das proteínas do gel.....	36
3.5	Identificação das proteínas.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Adaptação de protocolo.....	40
4.2	Perfil proteico em gel de SDS-PAGE e quantificação de proteínas totais extraídas das gemas de cana-planta e quarta soca.....	44
4.3	Identificação das proteínas expressas na cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515.....	46
4.4	Proteoma diferencial da cana-planta e quarta soca.....	72
5	CONCLUSÕES.....	92
6	REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), introduzida no Brasil em 1532, se tornou matéria prima de grande importância econômica e estratégica, sendo utilizada na produção de açúcar, etanol e energia, pelo setor sucroenergético brasileiro e mundial. Nesse setor, o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China, liderando também a produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar (CONAB, 2015a).

Apesar de ser um setor dinâmico e que sofre grande influência do clima e da economia nacional e internacional, como o valor do petróleo e outras “commodities”, a produção canavieira do Brasil vem aumentando nos últimos anos. Na safra de 2017/2018, a projeção média de moagem de cana calculada pela novaCana (2017) com base em dados de 12 instituições ligadas a área de produção de álcool e açúcar, é de 589,97 milhões de toneladas, o que equivale a um aumento de 1,1% em relação as estimativas para a safra de 2016/17.

A cultura da cana-de-açúcar tem um forte apelo ambiental, quando se considera o etanol como uma alternativa para a queima de combustíveis fósseis, sendo essa, de baixa emissão de gases de efeito estufa (GEE), considerando o ideal manejo da produção (Carmo et al., 2012). Além disso, a possibilidade de obtenção de uma série de produtos e subprodutos, e a utilização destes em diversos processos industriais, tais como produção de biopolímeros, combustíveis, alimentos, dentre outros, estimula toda a cadeia produtiva, desde a pesquisa científica básica, o plantio das variedades em campo e a venda dos produtos obtidos da cana-de-açúcar.

A produtividade agrícola da cana-de-açúcar pode ser mensurada em toneladas por hectare (TCH), e, em geral, é influenciada pela genética, pelo ambiente e pela interação genética x ambiente (Borém e Miranda, 2013), podendo ter alguns fatores destacados: a prática cultural, a classe de solo, incidência de fitopatógenos, cultivar (clone) plantada, dentre outros. A interação genótipo e ambiente, que está diretamente ligada à produtividade da cana-de-açúcar (Gilbert et al., 2006), reflete na expressão das proteínas, que em conjunto é responsável pelos caracteres morfológicos e fisiológicos, relacionados a produtividade, longevidade e outros aspectos culturais.

Uma série de características morfológicas está relacionada com a produtividade, tais como: o desenvolvimento do sistema radicular, desenvolvimento das gemas axilares (brotação e perfilhamento), área foliar, diâmetro dos entrenós e outras diversas características, assim

como caracteres fisiológicos, destacando a assimilação fotossintética, a fixação de nitrogênio, respostas a estresses (bióticos e abióticos), a síntese de hormônios e diversos outros compostos metabólicos.

A cana-de-açúcar teve sua produtividade e longevidade aumentada pelos programas de melhoramento genético (Pinto, 2009) e pela evolução no manejo cultural, sendo comum encontrar canaviais no sexto corte e com produtividade ainda economicamente viável. Entretanto, apesar do aumento da longevidade da cultura, o decréscimo da produtividade é evidente e intrínseco de cada variedade. No primeiro levantamento da safra de 2015/16, feito pela CONAB (2015a), foi observado uma produtividade agrícola geral de 90,66 t.ha⁻¹ na cana-planta e 60,98 t.ha⁻¹ na quarta-soca (quinto corte), ou seja, uma redução de 32,73% na produtividade média geral no Brasil. A referida queda na produtividade pode estar relacionada com a compactação do solo, ocasionada principalmente pela colheita mecanizada (Vischi Filho, 2014), disponibilidade de nutrientes, trato cultural (cana crua ou queimada) e outros fatores (Manhães et al., 2015), sendo alguns ainda pouco estudados.

O estabelecimento de um canavial é dependente da brotação das gemas axilares no decorrer do ciclo vegetativo comercial da cultura, sendo a brotação uma fase importante, pois trará a área cultivada plantas vigorosas (Silva et al., 2004). Como processo biológico, a brotação das gemas axilares é influenciada por fatores extrínsecos e intrínsecos, relacionando-se através da interação genótipo e ambiente, produzindo um proteoma que permite a sobrevivência e continuidade da produção. Os efeitos que as práticas culturais impõem sobre a síntese proteica nas gemas axilares no decorrer dos cortes ainda são desconhecidos. O acesso a essa síntese proteica pode ser feito através das tecnologias genômicas, sendo assim possível estudar o proteoma da cana-de-açúcar por meio de metodologias consagradas, a fim de gerar dados inéditos, validar, complementar e até mesmo corrigir informações obtidas por outras abordagens, contribuindo, assim, para uma maior compreensão da biologia da planta (Maireles, 2007).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi conhecer os efeitos dos sucessivos cortes da cana-de-açúcar na expressão proteica, ao longo dos ciclos de rebrota da cana-de-açúcar, caracterizando o proteoma total e diferencial de gemas axilares da cana-planta e da quarta soca da cultivar RB867515, utilizando ferramentas moleculares tradicionais e de alta abrangência, alta sensibilidade e acurácia, como a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e sistemas de espectrometria de massas (MS), gerando assim

informações importantes para o desenvolvimento futuro de novas cultivares e novos sistemas de cultivo de cana-de-açúcar que melhor respondem a demanda comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem sua origem intimamente associada à atividade humana, sendo que as variedades atuais descenderam de espécies do Sudeste Asiático, que são cultivadas desde a pré-história (CIB, 2016). As espécies existentes atualmente pertencem ao gênero *Saccharum*, nomenclatura esta, que teve origem do termo sânscrito *sarkara*, que também deu origem a todas as outras versões da palavra açúcar nas línguas indo-européias, como *sakkar* em árabe, *saccharum* em latim, *zuccher* em italiano, *seker* em turco, *zucker* em alemão e *sugar* no inglês (Silva e Silva, 2012).

Apesar da dinâmica na sistemática botânica, atualmente a classificação taxonômica mais difundida inclui a cana-de-açúcar na família Poaceae, sub-família Panicoideae, tribo Andropogoneae, sub-tribo Saccharinae, grupo Saccharastrae e gênero *Saccharum* (Daniel e Roach, 1987). O gênero *Saccharum* junto com os gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga* e *Miscanthus*, formam o “complexo *Saccharum*”, com possibilidade de intercruzamentos entre eles, sendo estes gêneros a origem da base genética da cana-de-açúcar (Roach, 1989) no início da sua domesticação nas ilhas Melanésias.

As cultivares atuais surgiram de cruzamentos interespecíficos das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. barberi* realizados no início do século XX (Roach, 1972). Os híbridos obtidos pelos cruzamentos foram então submetidos ao processo de nobilitação (Figura 1), para melhorar os caracteres agrônômicos, como o teor de açúcar, característica essa, mais acentuada em canas nobres (*S. officinarum*).

A cana-de-açúcar é uma espécie altamente poliploide e com número variável de cromossomos, devido aos cruzamentos interespecíficos entre espécies de diferentes ploidias, assim como a frequente aneuploidia que ocorre em plantas poliploides (Barreto e Simon, 1982), sendo possível, dessa forma, encontrar variação no número de cromossomos nas cultivares de cana-de-açúcar. O número de cromossomos geralmente varia de 100 a 130. Ferrari (2010) encontrou $2n=112$ cromossomos para as cultivares RB72454 e RB835486, e para a cultivar RB867515, foi encontrado $2n=110$ cromossomos.

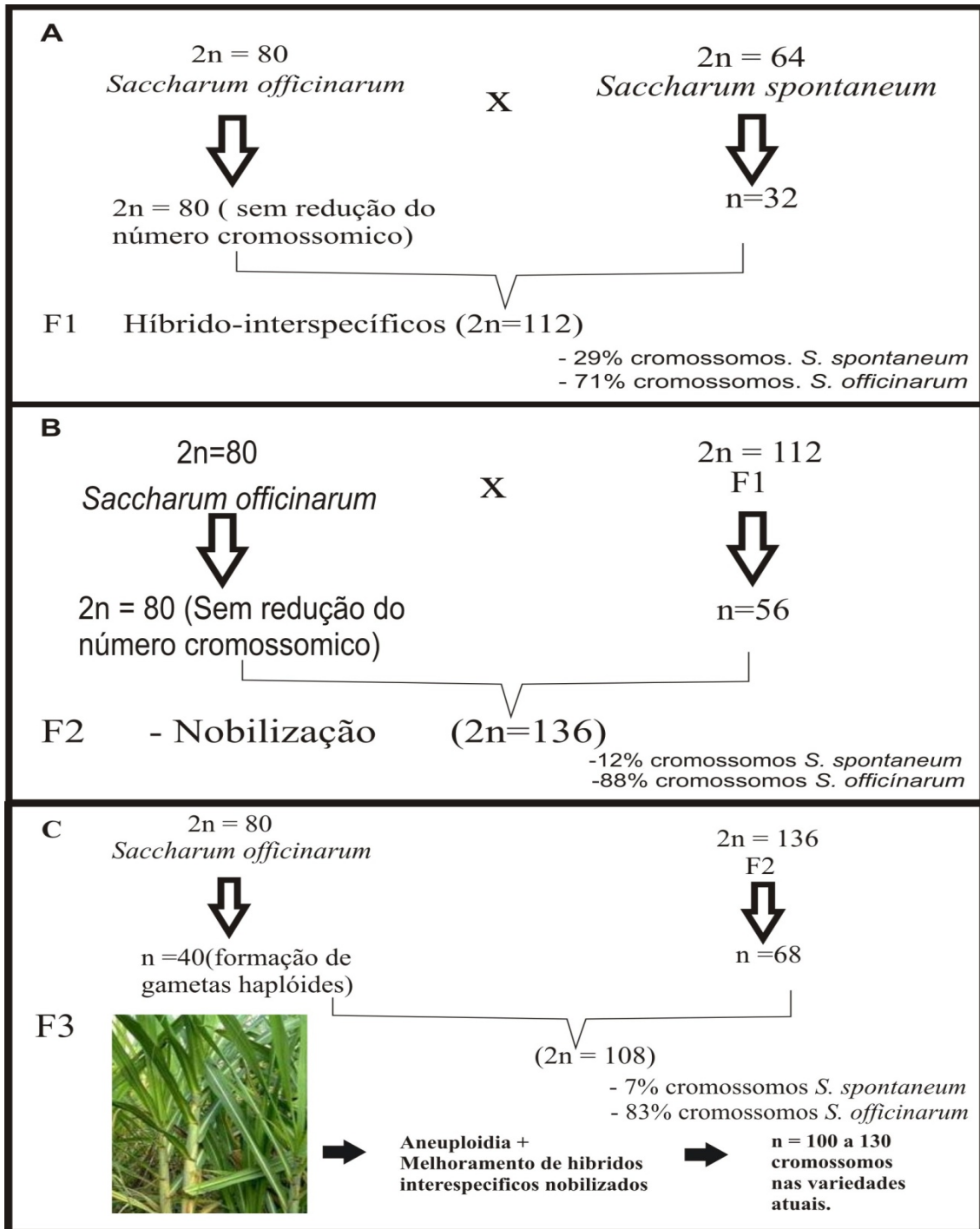


Figura 1 – A, B, C: Esquemas mostrando o processo de obtenção de cultivares atuais de cana-de-açúcar através do processo de Nobilitação (Ming et al., 2006; Ferrari, 2010).

2.2 Cultivar RB867515 de cana-de-açúcar

A cultivar RB867515 é um clone desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) na década de 80 através de policruzamento entre parental feminino da cultivar RB72454 com parental masculino desconhecido (♀RB72454 x ♂?). Essa variedade é de grande expressividade na cultura comercial de cana-de-açúcar, sendo a mais cultivada na safra nacional de 2015 nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (26% da área total cultivada em 138 unidades produtoras no Mato Grosso do Sul e São Paulo) e a segunda mais plantada nesses estados, correspondendo a 16,7% do plantio (Chapola e Hoffmann, 2016).

A cultivar utilizada se destaca por possuir boa tolerância a seca e boa resistência às principais doenças, em especial às ferrugens (marrom e alaranjada) e ao carvão. Além disso, a variedade RB867515 apresenta alto teor de sacarose, alta produtividade agrícola e boa brotação na planta e nas socas (RIDESA, 2010) (Tabela1).

A cultivar RB867515 apresenta excelente desempenho em solos de textura arenosa (RIDESA, 2010), sendo amplamente cultivada, na região centro-sul, em ambiente de produção entre tipo C e E. Ambientes de produção, segundo Prado (2008) é a interação das condições de solos (físico-químicas e hídricas), com o clima (precipitação e as perdas de água pela evapotranspiração) medindo o potencial de produtividade. Prado (2008) descreve que os componentes dos ambientes de produção são representados pela profundidade, que tem relação direta com a disponibilidade de água e o volume de solo explorado pelas raízes; fertilidade como fonte de nutrientes para as plantas; a textura que está relacionada com os níveis de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions (CTC) e disponibilidade hídrica, e pela água como parte da solução do solo, essencial para a sobrevivência das plantas. Na figura 2 é possível ver as características dos diversos ambientes de produção de cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Principais características agrônômicas da cultivar RB867515

Produtividade Agrícola		Alta
Colheita		Jul - Set
Perfilhamento	Cana-planta	Médio
	Cana-soca	Médio
Brotação da Soca	Queimada	Muito boa
	Crua	Boa
Fechamento entre linhas		Boa
Velocidade de Crescimento		Rápido
Porte		Alto
Hábito de Crescimento		Ereto
Tombamento		Eventual
Florescimento		Eventual
Chochamento		Médio
Maturação		Média tardia
Despalha		Média
PUI (Período de Utilização Industrial)		Médio
Exigência em Ambientes		Média restrição
Teor de Sacarose		Alto
Teor de Fibra		Médio
Carvão		Tolerante
Ferrugem marrom		Resistente
Escaldadura		Tolerante
Mosaico		Tolerante

Fonte: RIDESA, 2010; CanaUFV, 2016.

AMBIENTES	PRODUTIVIDADE MÉDIA TCH,	SOLOS
A1	> 100	ADA; e, ef, m, mf; CTC média/alta: Argissolos, Latossolos, Nitossolos, Chernossolos, Cambissolos, Gleissolos
A2	96 - 100	ADM; e, ef; CTC média/alta: Argissolos, Latossolos, Nitossolos, Cambissolos, Gleissolos
B1	92 - 96	ADA; mf, m; CTC média/alta: Argissolos, Latossolos, Cambissolos ADM; ma*; CTC média/alta: Argissolos ADM; e; m; CTC baixa: Argissolos ADB; ef, e; CTC média/alta: Latossolos, Argissolos, Cambissolos
B2	88 - 92	ADM; m; mf; d; CTC média/baixa: Argissolos, Latossolos, Cambissolos ADB; e; m; CTC baixa: Argissolos ADA; a; CTC alta: Gleissolos
C1	84 - 88	ADM; d; CTC média/baixa: Argissolos ADM; ma*; CTC média/alta: Latossolos ADM; e; CTC média/alta: Cambissolos ADM; a; CTC alta: Nitossolos ADB; e, m; CTC média/baixa: Argissolos ADB; df, d; CTC média/alta: Latossolos
C2	80 - 84	ADM; a*, d; CTC média/alta: Argissolos ADM; d, a; CTC média/alta: Cambissolos ADB; d; CTC baixa: Latossolos ADB; d; CTC média/baixa: Argissolos ADMB; ef, e; mf, m; CTC média/alta: Latossolos
D1	76 - 80	ADM; a, ma; CTC média/baixa: Argissolos ADM; d, a; CTC média/alta: Cambissolos ADB; wf, w; CTC média/alta: Latossolos ADB; ma; CTC média: Latossolos ADB; d; CTC média/baixa: Argissolos ADMB; e; m; CTC média: Latossolos
D2	72 - 76	ADM; a, ma; CTC média/baixa: Argissolos ADB; ma; CTC baixa: Latossolos ADM; e; m; CTC alta; A chernozêmico: Neossolos Litólico ADB; d; CTC baixa: Argissolos ADMB; e; m; CTC baixa: Latossolos ADMB; d; CTC média: Cambissolos
E1	68 - 72	ADB; a; ma; CTC média/baixa: Argissolos ADB; e; m; CTC baixa: Argissolos ADB; e; m; CTC média/alta: Plintossolos Háptico ADMB; d; ma; wf, w; CTC média/alta: Latossolos ADMB; ma; CTC média/alta: Argissolos
E2	< 68	ADEB; e; m; d; ma; a; aa; CTC baixa/média/alta: Argissolos, Latossolos, Neossolos Quartzarênicos, Neossolos Litólicos A moderado, Plintossolos Petríco

Figura 2 – Ambientes de produção da cana-de-açúcar (Prado, 2008; Cavalcante e Prado, 2010). I-ÁGUA DISPONÍVEL: ADA: água disponível alta; ADM: água disponível média; ADB: água disponível baixa; ADMB: água disponível muito baixa; ADEB: água disponível extremamente baixa. II- QUÍMICA ABAIXO DA CAMADA ARADA: ef: eutroférico; e: eutrófico; mf: mesotroférico; m: mesotrófico; df: distroférico; d: distrófico; wf: acriférico; w: ácrico; ma: mesoálico; a: álico; aa: alumínico. III- CTC DO SOLO NA CAMADA ARÁVEL: alta > 8 cmol.Kg⁻¹; média: 4 a 8 cmol.Kg⁻¹; baixa < 4 cmol.Kg⁻¹.

2.3 Aspectos morfológicos e do cultivo da cana-de-açúcar

Assim como as demais espécies integrantes da família Poaceae, a cana-de-açúcar apresenta inflorescência do tipo panícula, crescimento do caule em colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainhas abertas. As folhas são compostas pela lâmina foliar, pela bainha e pelo colar, caracterizando assim uma folha completa e de inserção alterna no colmo (Silva e Silva, 2012) (Figura 3).

O sistema radicular é composto por basicamente três tipos de raízes: raízes superficiais, ramificadas e absorventes; raízes cordão, com alguns metros de profundidade; e as raízes de fixação (Van Dillewijn, 1952). As raízes de fixação são as primeiras a se desenvolverem a partir dos meristemas do primórdio radicular na zona radicular da região nodal do colmo (Faroni, 2004). O sistema radicular é fator determinante para a produtividade do canavial, visto que, é a interface de troca entre o solo e a planta, favorecendo o ideal fornecimento de água e nutrientes para a planta, assim como sustentação da touceira.

Ming et al. (2006) descreveram a cana-de-açúcar como sendo uma planta perene (semiperene no cultivo comercial), tropical ou subtropical, com propagação através de gemas axilares ou segmentos de colmos (toletes) com idade não superior a 12 meses. A propagação vegetativa, mantém as características da cultivar e reduz o tempo de desenvolvimento do canavial. Além do plantio direto de colmos, a cana-planta pode ter origem da cultura de tecidos vegetais (micropropagação *in vitro*) ou através de técnicas de mudas pré-brotadas (MPB). Landel et al. (2012), juntos com o Programa Cana IAC, desenvolveram e aprimoraram o método MPB com o objetivo de incorporação de ganhos produtivos, reduzindo o volume de mudas utilizadas e melhorando o controle da qualidade de vigor das mudas de cana-de-açúcar, resultando em canaviais de excelente padrão clonal.

O ciclo de cultivo comercial da cana-de-açúcar é caracterizado pelo plantio e os sucessivos cortes realizados a partir das rebrotas, sendo seu ciclo produtivo, em média, de seis anos com cinco cortes (novaCana, 2016). A cana plantada pela primeira vez, denominada cana-planta, receberá o primeiro corte na época de colheita. A partir do primeiro corte, novas plantas surgirão do desenvolvimento das gemas localizadas na região do nó (Figura 3), dando início ao ciclo da cana-soca (Figura 4).

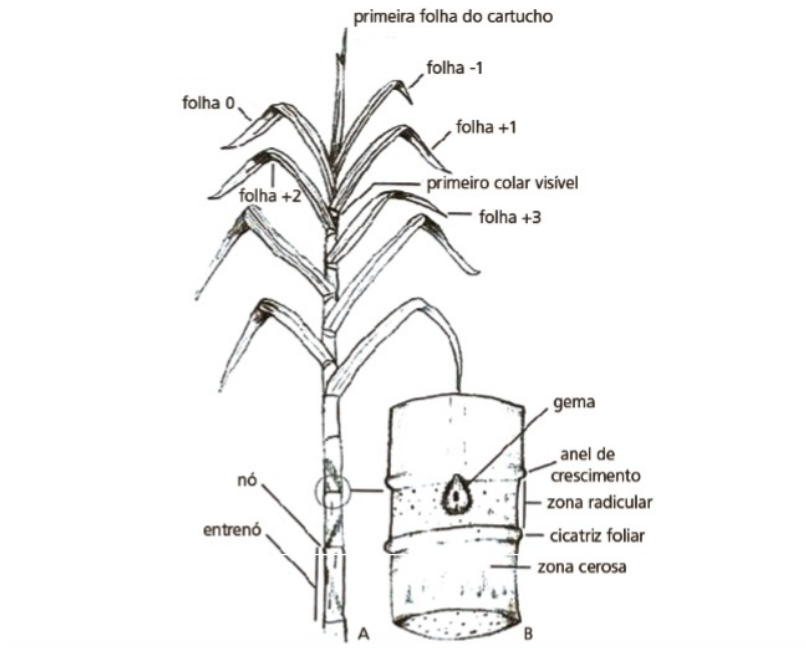


Figura 3 – A - Inserção e disposição das folhas e localização do nó e entrenó no colmo; B – Detalhamento da região nodal (Van Dillewijn, 1952; Segato et al., 2006; Silva e Silva, 2012).

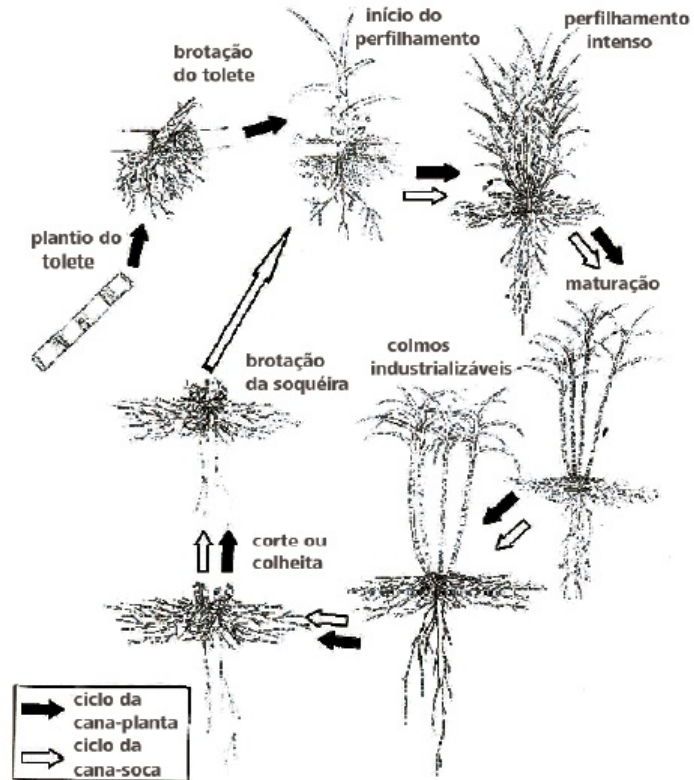


Figura 4 – Ciclo da cana-planta e da cana-soca (Segato et al., 2006).

A produtividade agrícola, em cada estágio de corte no cultivo comercial, decresce conforme avança a idade do canavial, sendo geralmente o quinto corte limitante para a renovação do canavial no Brasil (Figura 5).

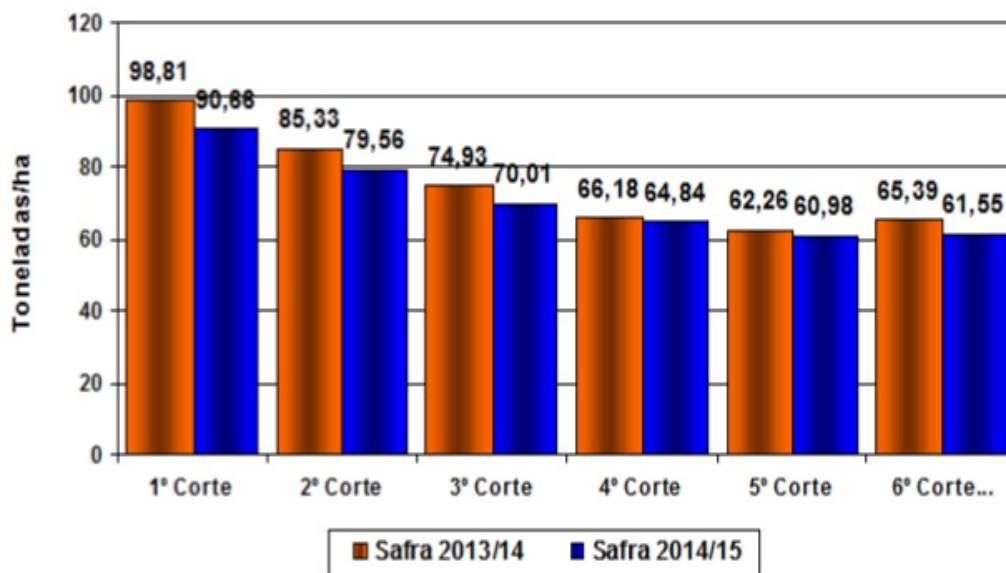


Figura 5 – Produtividade agrícola no Brasil por estágio de corte da cana-de-açúcar – em t.ha⁻¹ (CONAB, 2015a).

Assim como no Brasil, a queda na produtividade nos sucessivos cortes, também é observada nas demais nações produtoras da cultura, como relatado por Gomathi et al. (2013), onde os autores afirmam existir uma queda de 20% a 25% na produtividade agrícola entre a cana-planta e a cana-soca, nas regiões produtoras de cana-de-açúcar da Índia. Os mesmos autores realizaram um estudo referente aos fatores fisiológicos que estão associados com a redução da produtividade nas rebrotas da cultura, onde dentre vários resultados, foi possível destacar: redução de 17% e 28,1% na produção de perfílios e 15,5% e 15,7% de redução no número médio de colmos (NMC), respectivamente, entre primeira soca e segunda soca.

Na China, terceira maior produtora mundial de cana-de-açúcar, a queda na produção entre os estágios de corte pode ser ainda maior. Li e Yang (2015) afirmam que a variedade ROC22 plantada na China, é de pobre capacidade de rebrota, inferindo em um ciclo de produção de três anos, sendo um de cana-planta e mais dois de cana-soca, com a produtividade caindo mais de 50% na segunda soca.

Algumas pragas afetam diretamente a longevidade do canavial, como é o caso do bicudo da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*), onde as larvas do inseto destroem os rizomas da planta, causando prejuízos na ordem de 30 toneladas de cana por hectare. O dano promovido no rizoma pode causar a morte da planta e falhas na brotação das gemas, diminuindo assim o perfilhamento, com perdas cumulativas nos cortes, necessitando assim de reformas precoces no canavial (Leite, 2006). Além da *S. levis*, outras duas pragas são consideradas importantes, a broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), e a cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), sendo estas definidas como pragas-chaves (Santos e Borém, 2013).

A mecanização da colheita é outro fator apontado pelos produtores de cana-de-açúcar, que pode interferir na produtividade e longevidade do canavial. O principal efeito negativo seria a compactação do solo no decorrer dos cortes (Vischi Filho, 2014). Entretanto, com o aprimoramento de técnicas de colheita e da mecanização, os efeitos negativos vêm sendo drasticamente reduzidos pelo estudo e otimização das práticas agrícolas (Benedini e Donzelli, 2007).

Apesar do grande impacto no sistema produtivo da cana-de-açúcar, as alterações em nível molecular nos estádios de corte ainda são pouco estudadas. Augusto et al. (2017) compararam o número de alelos e valores de heterozigosidade observada (H_o) em diferentes estádios de corte das cultivares RB72454 e RB867515 para dez *loci* microsatélites de etiquetas de sequências expressas (Est-SSR). Os autores encontraram alterações significativas no número de alelos, sendo uma redução de alelos na quarta e sexta socas da cultivar RB72454 e um aumento de alelos na quarta, sexta e sétima socas da cultivar RB867515. Esta mesma cultivar apresentou menor polimorfismo e menores valores de H_o em relação a cultivar RB72454. Dessa forma é evidente que as alterações fenotípicas e fisiológicas que ocorrem nos sucessivos cortes da safra da cana-de-açúcar são acompanhadas de alterações em nível de DNA. Além de alterações diretas no DNA, pode ocorrer também alterações nos processos de regulação da expressão gênica como acúmulo de microRNA (miRNA) e RNA de interferência (siRNA), remodelagem da cromatina, etc (Griffiths et al., 2006).

2.4 Fenologia da cana-de-açúcar

Fenologicamente, o desenvolvimento da *Saccharum* spp. pode ser dividido em quatro estádios: brotação e emergência dos brotos, perfilhamento e estabelecimento da

cultura, período do grande crescimento e maturação (Gascho e Shih, 1983). Cada estágio fenológico tem sua relativa importância na produtividade do canavial, entretanto a fase de brotação e emergência dos brotos é decisiva para o estabelecimento da cultura. Uma melhor compreensão da fisiologia e da biologia molecular da brotação lateral em cana-de-açúcar poderia auxiliar na seleção e obtenção de clones superiores, levando em consideração características referentes a germinação da gema, perfilhamento e capacidade de rebrota (Lakshmanan et al., 2005; Ortiz-Morea, 2010).

A brotação inicia-se em condições ideais de temperatura e umidade, e a emergência dos perfilhos ocorre em aproximadamente 20 a 30 dias. O processo de emissão de colmos, originários da base da planta ou da região axilar da folha basal recebe o nome de perfilhamento (Figura 6), sendo regulado pelo hormônio de crescimento auxina, que exerce função de alongamento e inibição das gemas laterais (Crusciol et al., 2010).

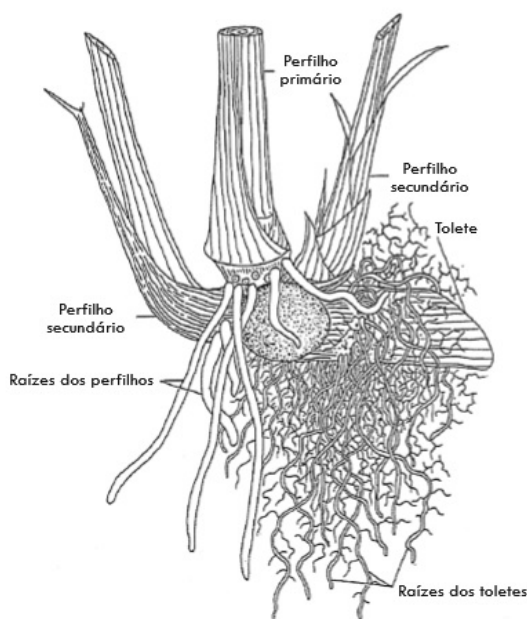


Figura 6 – Colmo de cana-de-açúcar em processo de perfilhamento e enraizamento. (Van Dillewijn 1952; Crusciol, 2010).

A brotação e o perfilhamento são etapas posteriores à germinação das gemas axilares, estando estas, localizadas em regiões específicas dos colmos, conhecidas como nós ou regiões nodais. A característica da região nodal é relativa às cultivares de cana-de-açúcar, contendo a gema lateral (axilar), o anel de crescimento, a cicatriz foliar e a zona radicular,

sendo importante na descrição das mesmas (Silva e Silva, 2012). As gemas axilares ficam dormentes devido a fatores intrínsecos e extrínsecos como a disponibilidade de nutrientes e os efeitos do hormônio auxina, que mantém a dominância apical nas touceiras do canavial. O corte realizado no ciclo da cana-de-açúcar rompe a dominância apical favorecendo a germinação das gemas axilares. Já com desenvolvimento das gemas axilares na brotação, as auxinas sintetizadas na gema apical, com o transporte polar basípeto, induzem o alongamento dos entrenós e um carregamento preferencial de carboidratos para essa região em detrimento às gemas laterais (Wood, 1976; Taiz e Zeiger, 2009). As citocininas também tem papel fundamental na brotação das gemas axilares, devido sua participação no estabelecimento da relação fonte-dreno entre o minitolete e as células meristemáticas dessas gemas. O referido hormônio atua de modo direto em, pelo menos duas proteínas, a invertase e transportador de hexoses, as quais são necessárias para o descarregamento apoplástico do floema (Kerbaudy, 2004).

Além das auxinas e citocininas, outros hormônios vegetais fazem parte dos fatores intrínsecos relacionados à brotação e dormência das gemas axilares. As giberelinas (ácido giberélico) e o ácido abscísico (ABA) possuem uma relação entre suas atividades fisiológicas, sendo as giberelinas com papel ativador da germinação e o ABA como inibidor do crescimento vegetativo, impondo a dormência das gemas (Kerbaudy, 2004). Dessa forma, a brotação das gemas axilares da cana-de-açúcar após o corte, envolve a ativação da proliferação e do crescimento celular, alterações na expressão gênica e uma série de modificações na relação hormonal (Wang e Li, 2008).

O controle da germinação e brotação das gemas axilares de cana-de-açúcar envolve também um complexo controle da expressão gênica, incluindo a atuação de pequenos RNAs de interferência, como os siRNA e miRNA (micro RNA) presentes nos complexos de silenciamento induzidos por RNA ou *RNA-induced silencing complexes* (RISC) (Hammond et al., 2000; Carthew e Sontheimer, 2009). Através de análises do microtranscriptoma de gemas axilares de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, Ortiz-Morea et al. (2013) encontrou vários miRNA, entre eles o miRNA 159, que bloqueia a resposta fisiológica para o ácido giberélico no estímulo a proliferação celular. Esse miRNA é modulado pelo ABA e quando ocorre o corte da cana-de-açúcar a concentração desse hormônio diminui, reduzindo a atividade do miRNA 159, possibilitando a brotação das gemas axilares. Outras 25 famílias de miRNA foram identificadas, assim como alguns siRNAs. RNAs associados a *transposons* também foram detectados, tanto em gemas ativas quanto em gemas dormentes/inativas.

2.5 Genômica funcional

O estudo do conjunto de genes dos seres vivos (genoma) foi durante muito tempo o foco de pesquisa para elucidar o funcionamento dos organismos biológicos. Atualmente a genômica é a ciência responsável pelo sequenciamento e pelos estudos das informações geradas pelo sequenciamento, enquanto a genômica funcional, é o campo da biologia molecular e bioquímica que descreve a função específica de genes e proteínas, relacionando a regulação da expressão gênica com mecanismos bioquímicos e fisiológicos (Faleiro et al., 2011).

A genômica funcional, como ferramenta biotecnológica emergente da era pós-genômica (Villas-Bôas e Gombert, 2006), tem sido amplamente utilizada para conhecer a expressão real do material genético dos organismos, e pode ser basicamente dividida nas três principais linhas de estudo: a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica (Figura 7). A transcriptômica estuda todo RNA transcrito (transcriptoma) de determinado organismo, determinada espécie, determinado tecido, assim como em determinado tratamento, condições ambientais, entre outros (Faleiro et al., 2011). A proteômica estuda o conjunto de proteínas expressas em um determinado organismo, proteínas estas, presente nas células, tecidos ou até mesmo fluidos biológicos, sendo extremamente dinâmico devido à interação ambiente x genoma. A metabolômica surgiu, pelo fato de que nem sempre as alterações em nível de mRNA (RNA mensageiro) se correlacionam com modificações nos níveis proteicos (Gygi et al., 1999) e quando traduzida, uma proteína pode ser ou não enzimaticamente ativa (Summer et al., 2003).

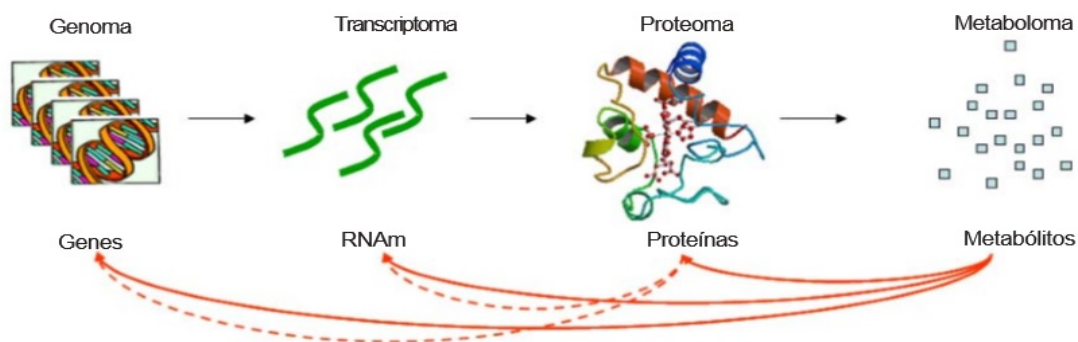


Figura 7- Níveis de expressão dos genes nos organismos que caracterizam a genômica funcional (Villas-Bôas e Gombert, 2006).

Nos últimos anos tem se intensificado os estudos em genômica estrutural e funcional de cana-de-açúcar, a fim de se entender aspectos agronômicos relacionados à cultura, principalmente relacionados a estresses hídricos, produção de açúcar, resistência a patógenos/pragas, entre outros. No Brasil, o projeto SUCEST tem destaque na área da genômica funcional de cana-de-açúcar. O projeto gerou a maior coleção de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de cana existente, tendo sequenciado 291.904 ESTs de cana-de-açúcar (Telles et al., 2001). Após o processamento das sequências expressas, foram identificadas 237.954 ESTs de alta qualidade (Vettore et al., 2003). O SUCEST foi desenvolvido por um consórcio de 22 laboratórios brasileiros, sendo que os dados gerados estão sendo analisados por 48 laboratórios, que se dedicam a prospecção e à mineração dos dados (*data mining*).

A partir do SUCEST surgiram outros projetos de importância ímpar no estudo molecular de *Saccharum* spp., um deles é o projeto SUCAST (Souza et al., 2001), onde o foco é a identificação dos componentes de transdução de sinal na cana-de-açúcar através dos ESTs descritos pelo SUCEST. No referido projeto, foram identificadas e catalogadas etiquetas de sequências expressas (EST) codificadoras de uma série de enzimas envolvidas em rotas metabólicas diversas assim como da biossíntese de hormônios (giberelinas, etileno, auxinas, ácido abscísico e ácido jasmônico). Os dados produzidos pelo SUCEST e de outros projetos baseados em ferramentas biotecnológicas, estão disponíveis em um banco de dados denominado SUCEST-FUN (<http://sucest-fun.org>). Além do SUCEST, é possível encontrar outros dados no SUCEST-FUN, como o *Sugarcane Gene Index* (SGI), dados de expressão gênica, GRASSIUS *database*, e registros de dados agronômicos, fisiológicos e características bioquímicas de cultivares de cana-de-açúcar (Dal-Bianco et al., 2011).

Casu et al. (2015) realizaram o estudo do transcriptoma tecido-específico relacionado a genes do transporte de sacarose e a expressão da celulose sintase. Nesse estudo foram utilizadas ferramentas transcriptômicas como a obtenção de cDNA (DNA complementares), hibridização por GeneChip array, *quantitative reverse transcription PCR* (RT-qPCR) e análises dos dados através de *softwares* específicos. Foram encontradas no referido trabalho, dentre outros resultados, a regulação positiva dos genes transportadores *ShPST2a*, *ShPST2b* e *ShSUT4* no parênquima de armazenamento, enquanto o gene *ShSUTI* foi mais expresso nos feixes vasculares.

Um grupo de pesquisa do Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Biocombustível (CTBE) em parceria com instituto e universidades brasileiras (IAC, Unicamp e USP), realizou um estudo transcriptômico em folhas de cana-de-açúcar, utilizando

sequenciamento de última geração e bioinformática, gerando cerca de 250 mil possíveis genes transcritos. O referido estudo, segundo Mattiello et al. (2015) identificou 2.416 genes, com relativa abundância nos distintos segmentos das folhas e que podem estar diretamente ligados ao processo fotossintético, processo este, responsável pelo acúmulo de biomassa na planta. Dessa forma, os resultados obtidos e os dados brutos disponibilizados pela equipe, devem ajudar programas de melhoramento genético de cana, no desenvolvimento de novas variedades com melhor resposta fotossintética para fins comerciais.

Ferreira et al. (2016) realizaram um estudo do transcriptoma de genótipos ancestrais (*S. officinarum* e *S. robustum*) e da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar, associando fenótipos de biomassa com o perfil comparativo de expressão gênica desses três genótipos com o objetivo de identificar genes úteis para o melhoramento da cana-de-açúcar, como os responsáveis pelo acúmulo de parede celular. No estudo foram obtidos os transcritos de folhas, entrenós imaturos e entrenós intermediários dos genótipos de cana. Entre outros resultados, os autores sugerem que mecanismos de acúmulo de sacarose podem ser regulados de forma epigenética, através de expressão diferencial de histonas. Além disso, os autores encontraram uma série de fatores reguladores de transcrição (TF) que podem estar relacionados com genes para a biossíntese de lignina e acúmulo da parede celular, destacando-se o gene *ScMYB52* como um candidato promissor para estudos futuros.

2.6 Proteômica

O proteoma de um organismo pode ser caracterizado como sendo o conjunto de proteínas de origem celular, estando essas localizadas nos mais diversos segmentos e estruturas dos organismos estudados, assim como nos fluidos dos mesmos. O estudo proteômico pode ser considerado desafiador, devido à dinâmica da expressão gênica e sua relação com ativadores e inibidores da expressão, através da relação do organismo com o ambiente e seu desenvolvimento. O estudo de um proteoma específico (cultivar, tecido, organela, etc.), tem aplicações diretas na descoberta de vias metabólicas em todos os estádios do ciclo celular, gerando uma massiva quantidade de conhecimento em biologia celular e bioquímica (Faleiro, 2011).

Algumas técnicas se destacam no estudo proteômico, onde é possível citar a eletroforese bidimensional, a cromatografia líquida e a espectrometria de massas (MS), sendo atualmente, a associação da cromatografia líquida (LC) com a espectrometria de massas, uma

ferramenta analítica versátil no estudo qualitativo e quantitativo de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (Lanças, 2009).

O fluxo de trabalho em proteômica, geralmente inicia-se com a escolha do material biológico e a padronização da coleta de amostras, a fim de se obter, com o máximo de fidelidade, a resposta exata do organismo à condição de interesse no estudo. Em seguida a extração das proteínas pode ser baseada em uma série de protocolos específicos para o organismo, assim como o tecido a ser utilizado, levando em consideração as técnicas analíticas que serão utilizadas na quantificação e identificação das proteínas. Em cana-de-açúcar vários tecidos têm sido explorados para análises proteômicas, como as raízes, folhas e caules (Barnabas et al., 2015) entretanto, existem poucos trabalhos com gemas axilares. As gemas axilares têm papel fundamental no estabelecimento do canavial, tanto na cana-planta quanto nas socas, participando de importantes etapas fenológicas já descritas. Dessa forma o presente trabalho é pioneiro na obtenção e avaliação do proteoma total e diferencial de gemas axilares em diferentes estágios de corte da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar.

Os principais métodos utilizados na extração de proteínas totais dos diversos órgãos e tecidos de plantas são: método com ácido tricloroacético/acetona (Damerval et al., 1986); método com ácido tricloroacético (TCA)/acetona modificado (Shen e Matsubae, 2002) e o método com fenol/SDS/acetato de amônio (Wang et al., 2003). Os três métodos apresentados foram testados para tecido foliar e radicular de cana-de-açúcar por Riffel et al. (2012); o método de TCA/acetona modificado e o método de fenol/SDS/acetato de amônio, foram os que apresentaram bons rendimentos em quantidade de proteínas extraídas para folhas de cana-de-açúcar, sendo o último método, igualmente eficiente para extrair proteínas tanto de folhas quanto para raízes de cana-de-açúcar.

Análises qualitativas para comprovar a eficácia da extração, podem ser realizadas usando a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ou eletroforese bidimensional, enquanto a quantificação da mistura proteica obtida pela extração pode ser feita usando métodos tais como a espectrofotometria e a fluorimetria.

Após a extração das proteínas, cada amostra passa a ser uma mistura complexa de proteínas que deve ser resolvida em frações simples de proteínas individuais ou uma mistura simples de proteínas para identificação (Salvato e Carvalho, 2010), seguindo basicamente o fluxo experimental apresentado na Figura 8. Essa separação de proteínas em frações mais simples pode ser feita por eletroforese (proteômica *top-down*) ou por cromatografia (*bottom-up*, *shotgun* ou MuDPIT). Dessa forma, a proteômica *top-down* analisa proteínas intactas,

geralmente separadas por SDS-PAGE ou eletroforese bidimensional. Quando se analisa proteínas previamente digeridas por enzimas proteolíticas, a técnica recebe o nome de proteômica *bottom-up*, e se a amostra for constituída por misturas de proteínas diversas, denomina-se então de proteômica *shotgun* (Zhang et al., 2013) ou MuDPIT (*Multi-Dimensional Protein Identification Technology*).

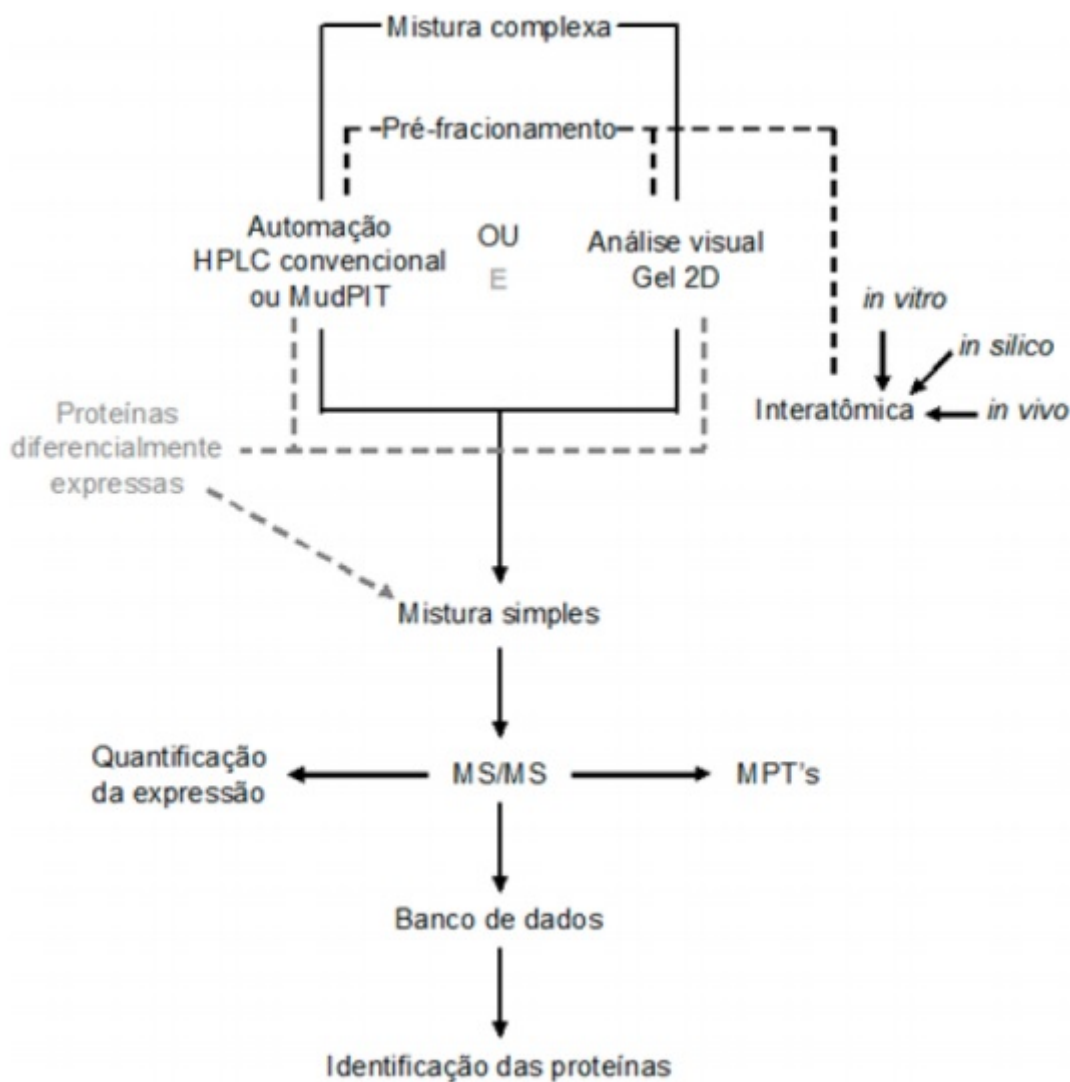


Figura 8 – Fluxo experimental em um estudo proteômico (Salvato e Carvalho, 2010).

A purificação e o pré-fracionamento das proteínas da mistura complexa, podem ser realizadas usando diversas metodologias, como a eletroforese (1DE ou 2DE), a cromatografia líquida (LC) e suas versões mais atuais, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). A cromatografia líquida pode ser

acoplada a espectrômetros de massa (MS) que irá auxiliar na identificação das proteínas estudadas. Algumas técnicas podem estar associadas na análise do material, entre elas, pode-se destacar a proteômica quantitativa baseada em etiquetas isobáricas (iTRAQ), onde são feitas marcações covalentes das porções N-terminal e das aminas de cadeias laterais de peptídeos obtidos a partir da digestão prévia das proteínas. Além do iTRAQ, outros métodos de quantificação relativa de proteínas podem ser utilizados, como o iCAT (*isotopic coded affinity tag*) e H₂O¹⁸; todos possibilitam uma estimativa da expressão relativa de proteínas em amostras marcadas (Salvato e Carvalho, 2010).

Após o tratamento das amostras, o sequenciamento é realizado por espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* – MS), técnica essa iniciada por Joseph John Tomson em 1912 (Downard, 2012) sendo constantemente aprimorada. Segundo John Bennett Fenn, pioneiro no uso da *Electro Spray Ionization* (ESI) como fonte de ionização para a espectrometria de massas, “a espectrometria de massas é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares” (Lanças, 2009). A princípio, as amostras são inseridas no espectrômetro de massas (Figura 9) através de um dispositivo específico para essa finalidade (*inlet*) e direcionada para a fonte de ionização. Atualmente as fontes de ionização utilizadas são *Electrospray* (ESI) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Os íons formados pelo ionizador são então separados de acordo com a relação de massa e carga (*m/z*) de cada íon (Wilson e Walker, 2010; Lanças, 2013). Essa separação de íons é feita pelo analisador de massas, sendo disponíveis diversos tipos, tais como, *ion-traps*, *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros (Cantú et al., 2008).

Analisadores híbridos também podem ser utilizados na identificação de proteínas, como por exemplo, o *Quadrupole Time-of-Flight* (Q-TOF). Nos espectrômetros de massas que utilizam o Q-TOF, um íon com *m/z* específico é separado em um primeiro analisador do tipo quadrupolo, direcionado para uma câmara de colisão, onde será fragmentado pela colisão de um gás neutro (argônio, xenônio, entre outros) e posteriormente analisado pelo TOF (Wilson e Walker, 2010). Os íons separados pelo analisador de massas são recebidos pelo detector, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados e disponíveis nos diversos formatos de saída de dados. Os espectrômetros baseados em Q-TOF, como o sistema Waters® Micromass® Q-Tof micro™, apresentam uma alta resolução (5.000 nos modos MS e MS/MS) e exatidão (5 ppm nos modos MS e MS/MS) podendo ser acoplados a um sistema UPLC para estudos analíticos de alta precisão.

A identificação das proteínas pode ser feita através de ferramentas de busca, como o MASCOT da *Matrix Science* (<http://www.matrixscience.com/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Essas ferramentas utilizam banco de dados com sequências de aminoácidos depositados por pesquisadores, sendo extremamente útil na identificação das proteínas encontradas em uma amostra. Atualmente existem alguns bancos de dados específicos para cana-de-açúcar, como o já citado SUCEST-FUN, entretanto não existe até o momento, um banco de dados específico de proteínas para o referido grupo. Além da utilização de bancos de dados específicos, é possível o alinhamento de sequências (DNA, RNA e proteínas) em bancos de dados mundiais como o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*). O *Plant Genome DataBase* (PlantGDB) (Dong et al., 2004) é um banco de dados com seqüências de várias espécies de plantas e atualmente é muito utilizado para identificação de proteínas expressas em cana-de-açúcar.

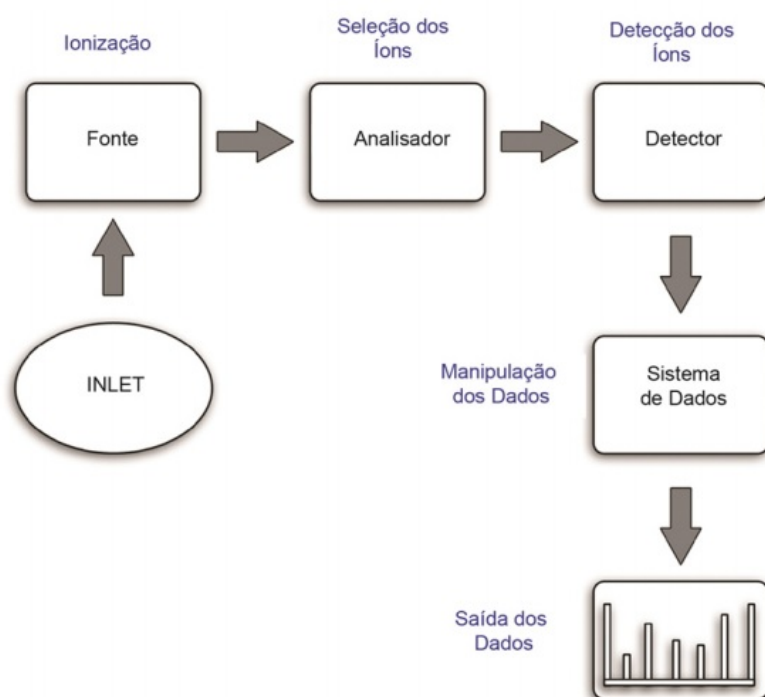


Figura 9 – Componentes básicos de um espectrômetro de massas (Lanças, 2013).

A *Universal Protein Resource* (UniProt) é uma das ferramentas utilizadas na análise proteômica. Nela é possível encontrar algumas bases de dados para proteínas, sendo elas: *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB); a *UniProt Reference Cluster* (UniRef) e a *UniProt Archive* (UniParc). A UniProt é uma colaboração entre a EMBL, a *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) e a *Protein Information Resource* (PIR).

Programas específicos foram desenvolvidos para alinhamento e comparação entre as sequências obtidas e as sequências depositadas nos bancos de dados. Os dois principais programas são o *BLAST* (Camacho et al., 2009; Amaral et al., 2007) e o *FASTA* (Lipman e Pearson, 1985). O *BLAST* é uma família de programas para comparação de sequências, que possui o algoritmo específico para utilização com proteínas, onde compara a sequência de aminoácidos de entrada (*query*) contra um banco de dados de sequência de proteínas (*subject*), enquanto o *FASTA* (inicialmente denominado *FASTAP*) foi descrito em 1985 por Lipman e Pearson, e segue a mesma funcionalidade do *BLASTP*. Os dados são introduzidos nos programas de alinhamento (*BLAST* e *FASTA*), no formato FASTA. O formato FASTA é a forma de apresentação da sequência, representada pelo código que utiliza uma letra para cada nucleotídeo ou aminoácido, segundo normas IUB/IUPAC, antecedida por uma linha que pode conter qualquer registro dado pelo usuário (Amaral et al., 2007).

2.7 Proteômica em cana-de-açúcar

A utilização de ferramentas proteômicas em cana-de-açúcar está ainda na infância quando comparada a outras monocotiledôneas (Barnabas et al., 2015), porém com o aumento de pesquisas genômicas baseadas em modernas ferramentas analíticas, tem intensificado as pesquisas proteômicas dos mais diversos tecidos e variedades de cana-de-açúcar. Segundo Barnabas et al. (2015), 28.909 publicações sobre pesquisas com cana-de-açúcar foram publicadas entre os anos de 1970 e 2013, sendo dessas, 1.634 publicações referentes a análises proteômicas. Utiliza-se a proteômica em cana-de-açúcar principalmente para o mapeamento proteômico e a comparação entre cultivares com características distintas ou em condições especiais de desenvolvimento, identificando assim, proteínas e cadeias polipeptídicas relacionadas com características distintas como a resistência a patógenos, variedades mais responsivas a certos tratamentos, resposta a estresses, entre outros.

Almaraj et al. (2010) realizaram uma análise inédita através de estudos proteômicos de colmos da cana-de-açúcar da cultivar CoC 671. No trabalho, estes autores testaram vários

métodos de extração de proteínas para serem utilizados em caules de cana-de-açúcar e após identificação do melhor método, submetem as proteínas extraídas a uma separação por eletroforese 2DE. Posteriormente os autores selecionaram 42 *spots* do gel 2DE e analisaram em sistemas de espectrometria de massas do tipo eLD-IT-TOF-MS/MS e nESI-LC-MS/MS. Nessa análise foram identificadas 36 proteínas não redundantes, sendo elas relacionadas principalmente com defesa, metabolismo, crescimento celular e desenvolvimento de múltiplas isoformas de peroxidases.

Calderan-Rodrigues et al. (2014) utilizaram a tecnologia nanoACQUITY UPLC MS/MS e banco de dados de proteínas traduzidas do SUCEST para identificação de proteínas da parede celular de células em suspensão oriundas da cultivar SP80-3280, com o objetivo de auxiliar na melhoria de variedades para obtenção de etanol de segunda geração. Na predição da localização subcelular e dos domínios funcionais das proteínas, foram utilizados banco de dados do *Sorghum bicolor*, por ser a espécie mais próxima da cana-de-açúcar com o genoma completamente sequenciado. No trabalho foram encontradas 377 proteínas, sendo 69 relacionadas com parede celular e distribuídas em oito classes funcionais diferentes, destacando-se as oxirredutases, hidrolases glicosídicas, proteases, proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos e proteínas transdutoras de sinais.

Barnabas et al. (2016) compararam o proteoma de meristemas da cultivar Co 96007 de cana-de-açúcar de indivíduos livre de fungos e indivíduos infectados com o fungo *Sporisorium scitamineum* (carvão da cana-de-açúcar). Para a análise utilizaram eletroforese 2DE, espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS) e qRT-PCR. Os autores desse trabalho identificaram através do MASCOT e outras ferramentas, cerca de 53 proteínas diferentemente expressas e relacionadas com defesa, estresse, metabolismo, dobramentos de proteínas, energia e divisão celular, sugerindo que existam modulações sutis e complexas interações entre proteínas representantes de vias de fenilpropanóides, respostas ao estresse oxidativo e outros processos metabólicos e celulares em meristemas de cana-de-açúcar infectados pelo fungo.

Estresses bióticos e relações interespecífica são também estudados através de análises proteômicas da cana-de-açúcar, como relatado no estudo de Lery et al. (2011), onde os autores obtiveram o proteoma diferencialmente expresso na interação entre *Saccharum* spp. e a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, para a investigação de aspectos moleculares desta relação. Nesse trabalho os pesquisadores analisaram o proteoma de raízes da cultivar SP70-1143 e do genótipo Chuneé (*Saccharum barberi*) desenvolvidas em co-

cultura com a bactéria através de técnicas de cultura de tecido vegetal e para a análise utilizaram o sistema 1DE-LC-ESI-Q-TOF, ou seja, as proteínas extraídas foram previamente separadas em um gel SDS-PAGE (1DE) e posteriormente digeridas por tripsina, sendo os polipeptídios separados por cromatografia líquida (LC) automaticamente acopladas a um ionizador do tipo *Electrospray* (ESI) e analisador do tipo híbrido Quadrupolo/Time-of-Flight (Q-TOF). A identificação das proteínas foi realizada pelo MASCOT com base no NCBI nr. No estudo foram identificadas 56 proteínas diferentemente expressas nos diferentes tipos de interação (bactéria-SP70 e/ou bactéria-Chunee), sendo 14 proteínas diferentemente expressas na interação bactéria-SP70, 22 proteínas na interação bactéria-Chunee e 20 proteínas expressas em ambas as interações. Essas proteínas integram classes ou estão envolvidas em vias celulares de reconhecimento celular, sinais de transdução, remodelagem da cromatina, metabolismo de lipídios e degradação de proteínas.

Outras pesquisas proteômicas importantes foram realizadas em cana-de-açúcar destacando-se: *i*) estudo da interação *Saccharum* spp. e *Sporisorium scitamineum* (Que et al., 2011; Song et al., 2013; Barnabas et al., 2016); *ii*) resposta a estresse salino (Pacheco et al., 2013); *iii*) resposta a estresse osmótico (Zhou et al., 2012); *iv*) desenvolvimento de perfil proteômico (Cesarino et al., 2012; Cesarino et al., 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

3.1.1 Material vegetal para teste e adaptação do protocolo de extração de proteínas totais das gemas axilares

Foram utilizadas gemas axilares da cultivar RB867515, cultivadas na Fazenda Santo Antônio (Lat: 20°54'39.68"S / Long: 50°25'28.80"O) (Figura 10), na cidade de Santo Antônio do Aracanguá no estado de São Paulo, pertencente ao grupo paulista Nova Aralco. A cultivar RB867515, na Fazenda Santo Antônio, está sendo cultivada em ambiente de produção C e se destaca no cultivo comercial, sendo a cultivar mais cultivada na safra de 2015 em São Paulo e Mato Grosso do Sul (Chapola e Hoffmann, 2016), apresentando boa tolerância a seca, alta produtividade agrícola e boa brotação da soca (RIDESA, 2010). Para testar a eficácia do método de extração em outras cultivares de cana-de-açúcar, após adaptação do protocolo, o mesmo foi utilizado na extração de proteínas totais das cultivares CTC4 e RB966928, sob mesmas variáveis de trato cultural, coleta e brotação das gemas axilares da RB867515.

Para obtenção das gemas axilares foram coletados setenta toletes de cana-de-açúcar com 10 meses de idade, no terceiro corte (segunda soca). Os toletes contendo as gemas axilares foram coletados de plantas diferentes em um mesmo talhão. As plantas utilizadas foram coletadas no interior do talhão, em aproximadamente 10 metros da margem dos mesmos. Foram escolhidos exemplares aparentemente sadios e o corte para a retirada dos colmos foi realizado entre o 4º e 9º nó, utilizando-se a contagem foliar pelo sistema de Kuijper descrito por Van Dillewijn (1952), onde o entrenó 1 é considerado aquele em que tem origem a folha +1 (Figura 3), sendo esta a primeira folha de cima para baixo que está inserida a aurícula. Foram mantidas as folhas recobrimdo as gemas axilares até a data do plantio.

Os toletes foram lavados três vezes com água corrente e posteriormente foram cortados, individualizando as gemas axilares em minitoletes (Figura 11), mantendo aproximadamente dois centímetros de colmo nas extremidades dos nós. Cada minitolete foi plantado para estimular a brotação e intumescimento das gemas axilares. Os minitoletes foram plantados em bandejas de 10 litros com vermiculita, em sulcos de 6 cm e espaçamento médio de três centímetros entre cada minitolete (Figura 12), sendo mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 25°C. Foram realizadas irrigações a cada dois dias, com aproximadamente 1,5 litros de água por bandeja.

Os minitoletes foram coletados seis dias após o plantio (DAP), onde foram retirados da vermiculita e lavados por três vezes com água corrente para eliminação de qualquer resíduo do substrato. O material foi encaminhado para o laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá, onde foi lavado três vezes com água destilada. As gemas axilares foram seccionadas com o auxílio de bisturi, congeladas em nitrogênio líquido, pesadas e separadas em microtubos de 2,0 mL. As amostras foram armazenadas em ultra freezer -80 °C até sua utilização.



Figura 10 – Imagem de satélite com demarcação de área da Fazenda Santo Antônio, do grupo Nova Aralco em Santo Antônio do Aracanguá-SP. (Fonte: Google earth)



Figura 11 – Gema axilar individualizada em um minitolete.



Figura 12 – Minitoletes de cana-de-açúcar contendo uma gema axilar por nó e plantadas em vermiculita para ativação da brotação. Os minitoletes foram posteriormente cobertos com o substrato.

3.1.2 Material vegetal para obtenção dos proteomas das gemas axilares da cana-planta e quarta soca

Para obtenção das gemas axilares foram coletados trinta toletes de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 com 10 meses de idade, do primeiro corte (cana-planta), e trinta toletes do quinto corte (quarta soca). Os toletes contendo as gemas foram coletados de plantas diferentes em um mesmo talhão para cada corte, sendo todas as plantas cultivadas em ambiente de produção C e em setores próximos (nos diferentes cortes) recebendo assim as mesmas interferências climáticas e de trato cultural. As plantas utilizadas foram coletadas no interior do talhão, em aproximadamente 10 metros da margem dos mesmos. Foram coletados ao acaso exemplares aparentemente saudáveis e o corte para a retirada dos colmos foi realizado entre os 4º e 9º nós, evitando-se o ápice caulinar (Figura 13), sendo utilizando a contagem foliar pelo sistema de Kuijper descrito por Van Dillewijn (1952), onde o entrenó 1 é considerado aquele em que tem origem a folha +1, sendo esta a primeira folha de cima para baixo que está inserida à aurícula. Foram mantidas as folhas recobrando as gemas axilares até a data do plantio.

A cana-planta de onde foram retiradas as gemas axilares do primeiro corte e do quinto corte, teve origem de mudas pré brotadas (MPB). Do primeiro ao terceiro corte as colheitas foram manuais, com queima e sem aplicação de maturadores. A partir do quarto corte a colheita foi mecanizada, sem queima e sem aplicação de maturadores.

Os toletes foram plantados com o objetivo de estimular o desenvolvimento das gemas axilares, ativando assim, a expressão das proteínas relacionadas à brotação.

Para o plantio, os toletes foram lavados três vezes com água corrente e posteriormente cortados, de forma a individualizar as gemas axilares, mantendo aproximadamente dois centímetros de colmo nas extremidades dos nós. Após cortados, um total de 129 minitoletes para cada tratamento (cana-planta e quarta soca) foram plantados em bandejas de 10 litros com vermiculita, em sulcos de 6 cm e com espaçamento médio de três centímetros entre cada minitolete, sendo mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 22 °C. Foram realizadas irrigações a cada dois dias, com aproximadamente 1,5 litros de água por bandeja, cuidando para que não ocorresse acúmulo ou falta de água no substrato.

Os minitoletes foram coletados cinco dias após o plantio (DAP), onde foram retirados da vermiculita e lavados por três vezes para eliminação de qualquer resíduo do substrato. Na Tabela 2 podem ser visualizados dados sobre a brotação das gemas axilares utilizadas no estudo. O material foi então levado para o laboratório de Genética e

Biociotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá, onde foi lavado três vezes com água destilada. As gemas foram seccionadas com o auxílio de bisturi (Figura 14), congeladas em nitrogênio líquido, pesadas e separadas em microtubos de 2,0 mL. As amostras foram armazenadas em ultra freezer -80 °C até sua utilização. Cada amostra foi constituída por mistura de gemas axilares ativas e dormentes/inativas (Figura 15), dessa forma o proteoma obtido refere-se às gemas axilares de forma genérica. Tal medida foi tomada para evitar a exclusão de possíveis proteínas inibitórias da brotação das gemas axilares, presente nas gemas axilares dormentes/inativas.

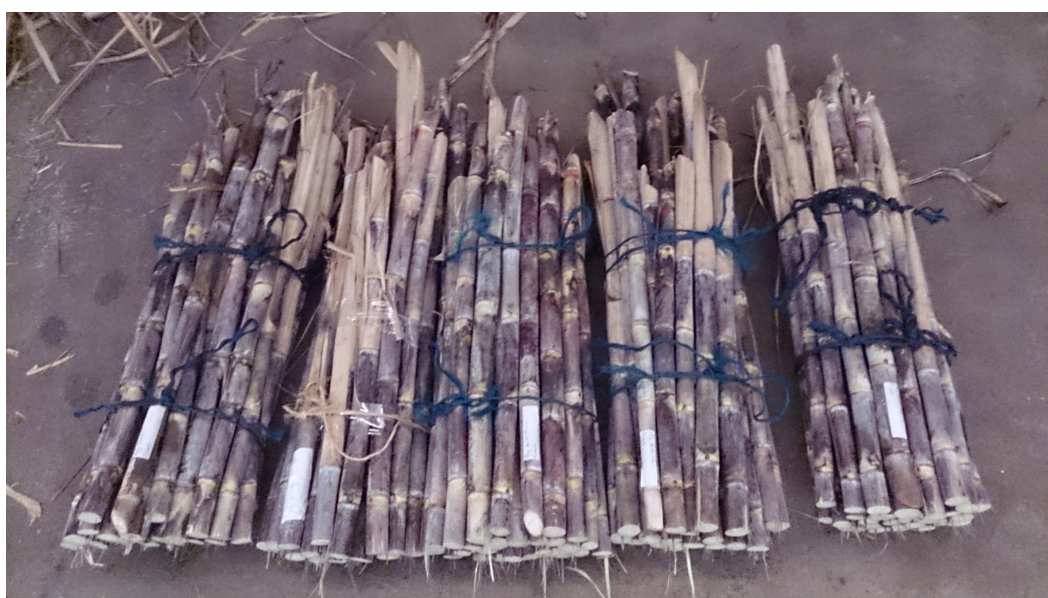


Figura 13 – Toletes cortados entre o 4° e 9° nó de plantas da cultivar RB867515 em diferentes cortes (primeiro, quarto e quinto corte).

Tabela 2 – Taxa de brotação das gemas axilares da cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515 cinco dias após o plantio em vermiculita

Cana-planta	
Minitoletes plantados	129
Total de brotação (5 DAP)	90
Taxa de brotação	69,8%

Quarta soca	
Minitoletes plantados	129
Total de brotação (5 DAP)	48
Taxa de brotação	37,2%

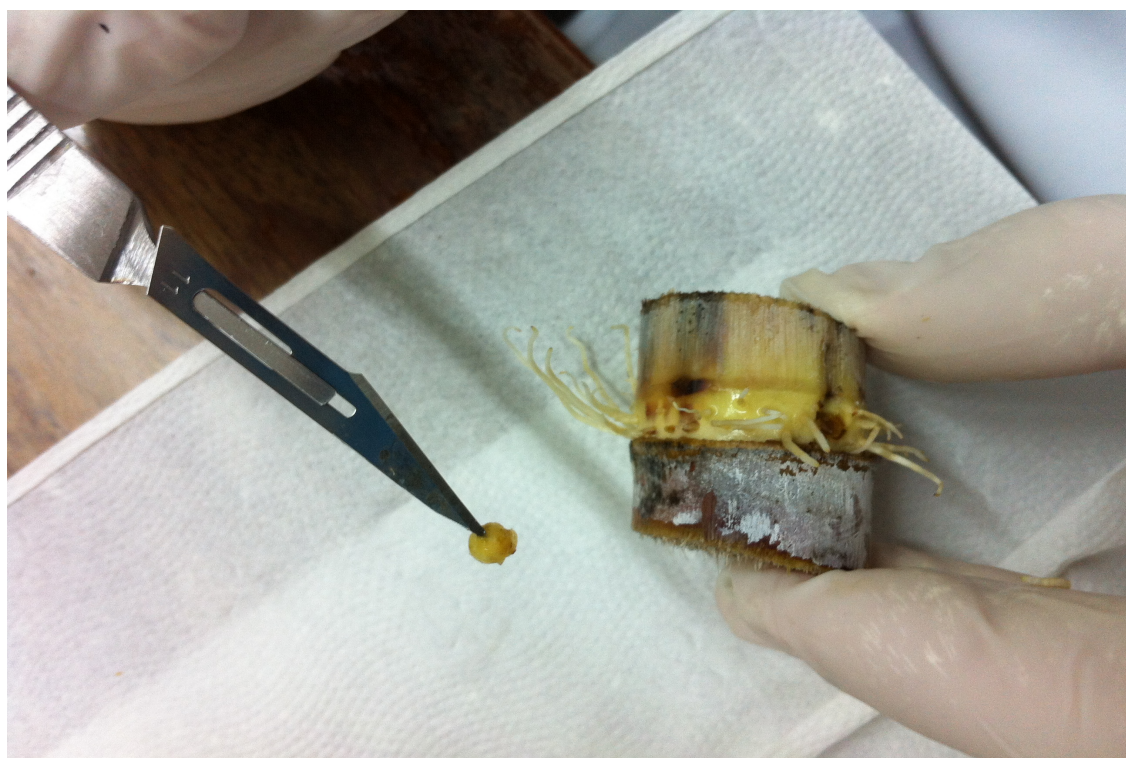


Figura 14 – Gema axilar seccionada do nó central do colmo de cana-de-açúcar para posterior extração de proteínas totais.

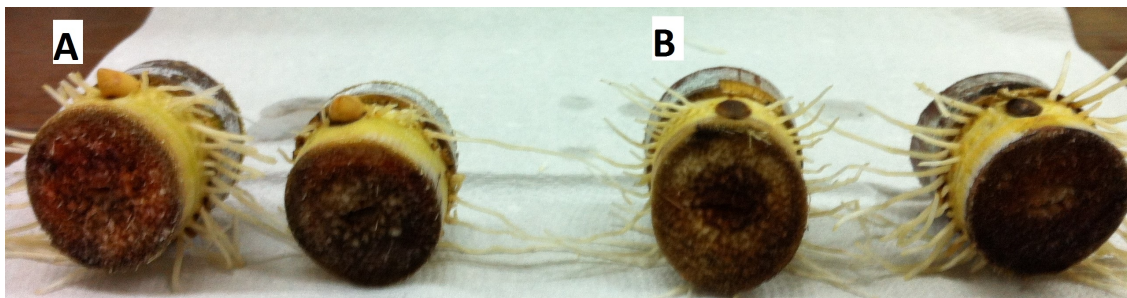


Figura 15 – Minitoletes de cana-planta contendo as gemas axilares ativas (A) e dormentes/inativas (B).

3.2 Adaptação de protocolo para extração de proteínas totais das gemas axilares de cana-de-açúcar

3.2.1 Extração pelo método de Riffel et al. (2012)

O método de Riffel et al. (2012) é baseado na extração por ácido tricloroacético/acetona descrito por Shen e Matsuabe (2002), porém com algumas modificações.

No primeiro teste foram macerados 100 mg e 200 mg de gemas axilares com auxílio de almofariz e pistilo, acrescidos de 0,02 g/g de polivinilpirrolidona (PVP-40) e nitrogênio líquido. Ao material macerado foi acrescentado respectivamente 1 mL e 2 mL de solução de extração de proteínas [Tris-HCl 40 mM pH 7,5; PVP-40 0,2% (m/v), sacarose 250 mM, EDTA 10 mM; phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM e β -Mercaptoetanol 2% (v/v), Triton X-100 a 1% (v/v)].

Com o auxílio de uma micropipeta, foram coletadas alíquotas e colocadas em microtubos de 2 mL, mantendo agitação em gelo por duas horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas com 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo. Foi acrescentado mais 1 mL de solução de extração de proteínas e agitado manualmente por 1 minuto. Após a agitação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos com 12.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi novamente retirado e colocado em novos microtubos, sendo acrescentado 1 mL de solução a 10% de TCA em acetona. Os tubos foram incubados por 12 horas a -20 °C.

Após a incubação os tubos foram centrifugados com 12.000 x g por 15 minutos em 4°C. O precipitado foi lavado três vezes com solução 10% de TCA em acetona e uma vez com etanol 80%. Cada lavagem foi realizada com 5 minutos de agitação manual e

centrifugação com 12.000 x g por 15 minutos em 4°C. O precipitado, após as lavagens foi seco e ressuspendido em solução de solubilização (7 M de uréia, 2 M de tiouréia e 2% de Triton X-100). O material ressuspendido foi então armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

3.2.2 Modificações no método de Riffel et al. (2012) para utilização em gemas axilares de cana-de-açúcar

As modificações consistiram em: *a)* utilização de 200 mg de tecido vegetal proveniente das gemas axilares; *b)* inclusão de etapa de incubação por 20 minutos com agitação em temperatura ambiente (após primeira adição da solução de extração); *c)* divisão da amostra em alíquotas menores (na recuperação dos sobrenadantes); *d)* aumento na rotação da centrífuga de 12.000 x g para 13.860 x g e aumento no tempo de centrifugação de 15 minutos para 30 minutos (nas etapas de precipitação e lavagem); *e)* retirada do Triton X-100 da solução de extração. Paralelamente foi realizado o mesmo procedimento descrito, utilizando solução de extração de proteínas acrescido de Triton X-100 a 1% (v/v).

O precipitado, após as lavagens foi seco e ressuspendido em solução de solubilização sem Triton X-100 (7 M de uréia e 2 M de tiuréia) para as amostras extraídas sem o detergente. Para as amostras extraídas com o detergente, a ressuspensão foi realizada com solução de solubilização acrescida de 2% de Triton X-100 (7 M de uréia e 2 M de tiuréia). O material ressuspendido foi armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

As proteínas obtidas foram quantificadas utilizando o método baseado em fluorimetria. Para a quantificação foi utilizado o fluorímetro (Qubit[®] Fluorometer 1.0) e o kit de quantificação Qubit[®] Protein Assay da *Life Technologies*. Dessa forma, foi possível determinar qual método (com ou sem Triton X-100) foi mais eficiente na extração de proteínas totais das gemas axilares de cana-de-açúcar.

3.2.3 Análise qualitativa dos métodos de extração por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

3.2.3.1 Análise em PAGE-Nativo

As proteínas obtidas nos métodos de extração foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para análise da qualidade da extração. O gel de visualização foi preparado com o polímero (30% acrilamida, 0,8% N-N'-metilenobisacrilamida) na

concentração final de 12% (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, persulfato de amônio a 10% (m/v) e TEMED) e o gel de empilhamento preparado na concentração final de 5% em pH 6,8, permitindo assim, boa separação das proteínas com variados pesos moleculares (220 kDa a 10 kDa).

Cada microtubo contendo as amostras foi retirado do freezer e mantido a temperatura ambiente por 20 minutos, sendo posteriormente misturados usando um vortex por 1 minuto. Após a homogeneização, 8 μ L da amostra foi acrescida a igual volume de tampão de amostra (glicerol 20%, 10 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 10% (m/v) de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.). A separação das proteínas foi realizada em cuba eletroforética vertical com tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e água destilada q.s.p.). A duração da eletroforese foi de aproximadamente 3 horas com 200 volts.

Após a eletroforese, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata a 0,2% (Chevallet et al. 2006) para visualização das bandas formadas pela separação das proteínas presente nas amostras.

3.2.3.2 Análise em SDS-PAGE

As mesmas amostras utilizadas no teste em PAGE-Nativo foram analisadas em SDS-PAGE para comparação dos métodos.

O gel de visualização foi preparado com o polímero (30% acrilamida, 0,8% N-N'-metilenobisacrilamida) na concentração final de 12% (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS a 10% (m/v), persulfato de amônio 10% (m/v) e TEMED) e o gel de empilhamento na concentração final de 5% em pH 6,8.

Cada tubo contendo as amostras foi retirado do freezer e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos, sendo posteriormente agitadas usando um vortex por 1 minuto. Após a homogeneização, 8 μ L da amostra foi acrescida a igual volume de tampão de amostra (glicerol 20%, 10 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 10% (m/v) de azul de bromofenol, SDS 10% (m/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e água destilada q.s.p.). Antes da aplicação no gel, cada amostra foi mantida em banho Maria a 95°C por 5 minutos. A separação das proteínas foi realizada em cuba eletroforética vertical com tampão preparado com Tris-HCl 25 mM, Glicina 200 mM e SDS 0,1% (m/v) e água destilada (q.s.p.). A eletroforese durou aproximadamente 3 horas com 200 volts.

Foram realizadas duas eletroforeses com as proteínas extraídas pelo método modificado, uma para coloração com nitrato de prata e outra para teste de coloração com o Comassie Brilliant Blue R-250 (Alfenas, 2006).

3.2.3.4 Coloração dos géis SDS-PAGE

Após as eletroforeses, os géis foram submetidos à coloração com nitrato de prata a 0,2% e coloração com Comassie Brilliant Blue R-250 0,1%, para visualização das bandas formadas pela separação das proteínas presente nas amostras, fotografado e seco para conservação do mesmo.

Para a coloração com nitrato de prata, foi seguido o protocolo descrito por Chevallet et al. (2006) sendo realizadas as seguintes etapas:

1ª etapa (Fixação): O gel foi fixado por 1 hora em solução com 50% (v/v) de etanol, 12% (v/v) de ácido acético glacial, 0,075% (v/v) de formaldeído e água destilada q.s.q.; 2ª etapa: lavagem por 3 vezes (por 20 minutos cada) com solução de etanol 90% (v/v); 3ª etapa: tratado por 1 minuto em solução de 0,02% (m/v) de tiosulfato de sódio; 4ª etapa: lavagem por três vezes com água destilada; 5ª etapa (impregnação pela prata): incubação por 20 minutos em solução contendo 0,2% (m/v) de nitrato de prata, 0,075% (v/v) de formaldeído; 6ª etapa: lavagem por três vezes com água destilada; 7ª etapa (revelação): incubação até a revelação das bandas em solução contendo 6% (m/v) de carbonado de sódio, 2% (v/v) de solução de tiosulfato (mesma da 3ª etapa), 0,05% (v/v) de formaldeído, 100 mL de água destilada q.s.p. Para finalizar a revelação a solução da primeira etapa foi utilizada como *stop*.

Para a coloração com o azul de comassie, foi utilizado o método descrito por Alfenas (2006), sendo o gel incubado por 12 horas em solução preparada com 0,1% (m/v) de Brilliant Blue –R250, 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial e água destilada q.s.p. Após a incubação, o gel foi lavado por quatro vezes com solução fixadora PAGE (45% de metanol, 10% de ácido acético glacial) para fixação das bandas representativas e remoção do excesso de corante.

3.3 Extração das proteínas totais para análise no espectrômetro de massas, quantificação por fluorimetria e pré-fracionamento em gel SDS-PAGE

As proteínas totais foram extraídas das gemas de cana planta e da quarta soca, utilizando o método de TCA/acetona descrito por Riffel et al. (2012), com as modificações descritas no item **3.2.2**.

Foram utilizados 200 mg de gemas e a solução de extração de proteínas utilizada sem o detergente Triton X-100, pois o mesmo pode interferir nas leituras realizadas no sequenciamento pela espectrometria de massas.

Toda extração foi realizada em triplicatas biológicas para cada tipo de gema axilar analisada (cana-planta e quarta soca).

As soluções de proteínas obtidas após o processo de extração foi submetida à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para verificação da qualidade. Para verificar o padrão dos pesos moleculares das proteínas extraídas foi utilizado o marcador Novex BenchMark™ *Protein Ladder* da *Life Technologies*® de 14 bandas, abrangendo pesos moleculares de 10 kDa a 220 kDa. O gel foi corado com azul de comassie (Comassie Brilliant Blue –R250), através da metodologia descrita no item **3.2.3**, por apresentar melhor definição das bandas, quando comparadas com o nitrato de prata, para as amostras obtidas de cana-de-açúcar.

As amostras foram quantificadas utilizando o método baseado em fluorimetria. Para a quantificação foi utilizado o fluorímetro (Qubit® Fluorometer 1.0) e o kit de quantificação Qubit® *Protein Assay* da *Life Technologies*.

Após a quantificação das amostras, foi feito o pré-fracionamento das proteínas totais em gel SDS-PAGE, com a utilização de 20 µg de proteínas totais por amostra, sendo as proteínas e polipeptídios desse gel utilizados na identificação por espectrometria de massas (MS). Essa metodologia baseada na eletroforese unidimensional (1DE SDS-PAGE) foi escolhida por permitir uma prévia visualização do perfil proteico de cada tratamento no gel SDS-PAGE e a posterior utilização do mesmo gel na identificação por MS. Com a utilização do marcador de peso molecular, é possível confrontar as massas das proteínas identificadas em cada região do gel, com as massas relativas das proteínas depositadas nos bancos de dados. Além disso, a 1DE SDS-PAGE proporciona um pré-fracionamento das amostras, obtendo misturas menos complexas de proteínas e polipeptídeos a serem inseridas no UPLC e no espectrômetro de massas.

Os microtubos contendo as proteínas totais extraídas e quantificadas das gemas axilares, foram devidamente armazenados em ultra freezer -80°C até sua utilização.

3.4 Digestão tríptica em gel SDS-PAGE e extração das proteínas do gel

A digestão tríptica foi feita com base no trabalho de Shevchenko et al. (1996). Cada Lane do gel SDS-PAGE foi recortado em onze fragmentos conforme a Figura 16. O gel foi cortado com o auxílio de bisturi e negatoscópio previamente limpos com álcool 70%.

Os fragmentos de gel foram divididos em microtubos, livres de proteases e previamente lavados com metanol para eliminação de qualquer contaminante, além das amostras foram obtidos dois fragmentos com padrões de peso molecular (50 kDa e 20 kDa) como controle positivo e dois com fragmentos sem proteínas, polipeptídeos e corantes (controles negativos).

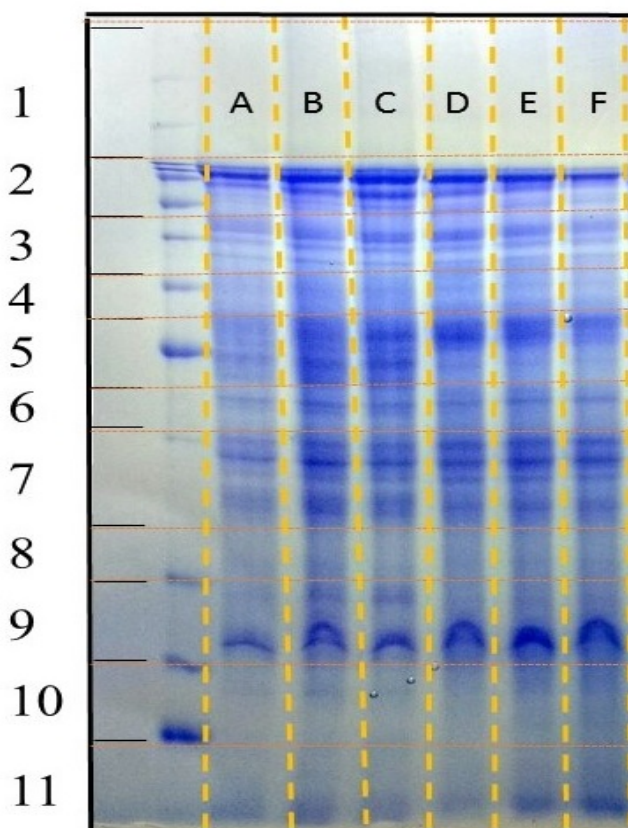


Figura 16 – Divisão dos fragmentos para análises por espectrometria de massas. A, B, C – cana-planta; D, E, F – quarta soca.

As bandas dos fragmentos foram lavadas quatro vezes em solução 50% acetonitrila em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 25 mM pH 8,0, para retirada de todo Comassie Brilliant Blue R-250 e SDS. Os fragmentos foram então lavados duas vezes por 10 minutos

cada, com acetonitrila 100%. Os géis foram completamente secos em dessecador a vácuo até estarem completamente desidratados.

Foi feita a redução de pontes dissulfeto pela incubação em 100 µL de solução contendo 10 mM de ditioneitol (DTT) em solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. A incubação foi feita por 60 minutos em 56°C. Após a incubação foi retirado a solução de DTT e os géis foram lavados uma vez com 300 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM. Posteriormente, os resíduos de cisteína foram alquilados através de incubação em solução de alquilação (iodoacetamida 50 mM em solução de bicarbonato de amônio 25 mM), por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após a incubação, a solução de iodoacetamida foi descartada e os géis foram lavados, com auxílio de vortex, em 200 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM. A solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram desidratados em dessecador a vácuo.

A digestão enzimática das proteínas foi realizada com solução de tripsina Promega na concentração final de 0,01 µg/µL. A solução de tripsina foi adicionada nos microtubos até cobrir os fragmentos de gel, sendo mantidos os microtubos no gelo por 10 minutos até completa penetração da tripsina sem que ocorra a digestão. Após os 10 minutos foi acrescentado solução de bicarbonato de amônio 25 mM até completa reidratação dos fragmentos. A digestão foi realizada *overnight* a 37 °C por 16 horas. Após a digestão os peptídeos foram extraídos dos fragmentos de gel com a adição de solução de extração (0,1 % ácido fórmico; 50% acetonitrila; água ultrapura q.s.p.). A extração foi realizada em sonicador por 30 minutos, sendo repetida 2 vezes com recuperação da solução de extração. Ao final os microtubos foram centrifugados a 2.935 x g e as amostras foram secas em dessecador à vácuo até completa desidratação.

3.5 Identificação das proteínas

As amostras foram analisadas na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica – UEMP, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Inicialmente as amostras foram ressuspensas em 0,1% de ácido fórmico e posteriormente dessalinizadas usando a pré-coluna C18 Waters Symmetry (180 µm X 20 mm, 5 µm). As moléculas foram então aplicadas no sistema Waters Nano Acquity (Waters, Milford, MA). Utilizou-se 7,5 µL do volume para a injeção da amostra, a qual foi separada

por cromatografia líquida utilizando a coluna BEH 130 C18 (100 µm X 100 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA) em eluição a 0,5 µL/min, com gradiente linear de acetonitrila (10–40%) contendo 0,1% de ácido fórmico (Tabela 3). Os espectros de massa sequenciais foram obtidos utilizando o espectrômetro Waters® Micromass® Q-Tof micro™ (Waters, Milford, MA) com interface para o sistema de cromatografia capilar Nano Acquity. A ionização por electrospray (ESI) foi realizada utilizando 3500V, com temperatura da fonte de 80 °C e voltagem de cone 30 V.

A aquisição dos dados e controle do instrumento foi conduzida no programa MassLynx (Versão 4.1, Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 400-2000 razão massa/carga (m/z), usando intervalos de 1 segundo aplicados durante todo o processo cromatográfico. Dados dependentes da aquisição de fragmentação MS/MS foram realizados nos precursores com cargas 2, 3 e 4, ao longo de um intervalo de 50-2000 (m/z). A partir de cada espectro (MS) no máximo 3 íons foram selecionados para posterior fragmentação por MS/MS.

A dissociação induzida por colisão (CID) foi obtida através da utilização do gás argônio a uma pressão de 40 psi e uma energia de colisão com variação de 18 a 90V dependendo da carga e massa do precursor. Todos os dados foram processados usando o servidor ProteinLynx Global (versão 2.5, Waters) onde o valor da massa/carga de cada precursor (MS) e fragmento (MS/MS) foi determinado a partir dos espectros de massas oriundos desses cromatogramas, utilizando para calibração o sistema Q-Tof LockSpray™ (Waters, Milford, MA).

A identificação das proteínas com base nos dados processados pelo ProteinLynx Global foi realizada com a ferramenta Mascot da *Matrix Science* (<http://www.matrixscience.com/>), e UniProt (<http://www.uniprot.org/>) usando os bancos de dados NCBIprot, SwissProt e UniProtKB, disponíveis *on-line*. Os parâmetros utilizados para a identificação das proteínas pelo Mascot podem ser visualizados na Tabela 4.

Na identificação das proteínas que constituem o proteoma total das gemas axilares da cana-planta e quarta soca, foram selecionadas apenas proteínas com pelo menos um peptídeo correspondente (match) e com *score* acima do limite indicado pelo Mascote, com íons apresentando identidade ou extensa homologia ($p < 0,05$). Para evitar redundâncias, apenas uma proteína por peptídeo identificado foi considerada, levando em consideração sempre o maior score atribuído pelo Mascot.

Tabela 3 - Condições experimentais usadas para a separação dos peptídeos por cromatografia líquida

Soluções	
Solução A	99,9 % água + 0,1 % ácido fórmico
Solução B	99,9 % acetonitrila + 0,1 % ácido fórmico
Solução C	GFP 320 fmol/ μ L em 50 % acetonitrila + 50 % água
Colunas Cromatográficas	
Pré coluna – Symmetry C18 180 μ m X 20 mm, 5 μ m	
Coluna analítica – BEH 130 C18 100 μ m X 100 mm, 1.7 μ m	
Gradientes Cromatográficos	
<i>Trapping</i> – 15 minutos de 97% de solução A a um fluxo de 10 μ L/min	
Gradiente cromatográfico – elui peptídeos não retidos por solução B na faixa de 3% a 50%, com incrementação de 1.5% de solução B por volume de coluna, a um fluxo de 0.5 μ L/min	
Referencia	
Solução C a 0.35 μ L/min	

Tabela 4 – Parâmetros utilizados na identificação das proteínas pelo Mascot

Parâmetros:	
Enzima	Tripsina
Clivagens perdidas	1
Taxonomia	Plantas Verdes (Viridiplantae)
Banco de dados	NCBIprot; SwissProt; UniProtKB
Modificações fixas	Carbamidomethyl (C) – Carbametilação da cisteína
Modificações variáveis	Oxidação (M) – Oxidação da metionina
Tolerância da massa peptídica	50 ppm
Tolerância da massa do fragmento	0.3 Da
Carga dos peptídeos	1+, 2+ e 3+

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adaptação de protocolo

O método de extração descrito por Shen e Matsubae (2002) e modificado por Riffel et al. (2012) para folha e raiz de cana-de-açúcar, não foi eficiente para extração de proteínas totais das gemas axilares, quando foram utilizados 100 mg de material vegetal. A quantidade de proteínas obtida não foi suficiente para realização de eletroforese. Quando foi usado a quantidade de 200 mg de material, o método foi efetivo na extração, porém como é possível observar na Figura 17a, o perfil eletroforético evidencia a baixa qualidade da extração sem padronização, apresentando baixo número de frações proteicas quando comparado ao método TCA/acetona modificado para o presente trabalho. O método de extração descrito por Riffel et al. (2012) apresentou frações de proteínas em SDS-PAGE como bandas difusas e levemente coradas (Figura 17a).

O método TCA/acetona para extração proteica de gemas axilares de cana-de-açúcar com modificações nos processos de centrifugação e no tempo de incubação das amostras revelou um número de bandas bem definidas no sistema SDS-PAGE, com pesos moleculares entre 10 kDa e 120 kDa. Ficou evidente que o método TCA/acetona com modificações para utilização em gemas axilares que consistiu *i)* na utilização de 200 mg de material; *ii)* na inclusão de etapa de incubação em temperatura ambiente por 20 minutos com agitação; *iii)* na melhor recuperação do sobrenadante através da divisão em alíquotas; *iv)* no aumento na rotação da centrífuga de 12.000 x g para 13.860 x g, assim como no aumento do tempo de centrifugação de 15 minutos para 30 minutos, tanto na precipitação quanto na lavagem e *v)* retirada de Triton X-100, foi mais eficiente do que os outros métodos utilizados para cana-de-açúcar (Shen e Matsubae, 2002; Riffel et al., 2012). Esse resultado é mais um exemplo mostrando que os métodos para extração de proteínas em plantas são específicos para diferentes tecidos.

O aumento na rotação da centrífuga provavelmente proporcionou uma maior compactação do precipitado, sendo mais efetivo na separação dos compostos não proteicos do macerado (carboidratos, lipídeos, DNA, RNA, entre outros), com isso a recuperação do sobrenadante foi mais eficiente. De forma congênere, o aumento na rotação durante a centrifugação, permitiu melhor compactação das proteínas no fundo dos microtubos, na etapa

de precipitação com TCA/acetona e etapas de lavagem, mantendo maior quantidade de proteína por extração.

A utilização do Triton X-100 não mostrou diferenças no sistema SDS-PAGE (Figura 18). A concentração média das proteínas, para as três replicatas biológicas, extraídas com Triton X-100, frequentemente utilizado na extração proteica em tecidos vegetais, não foi significativamente maior que a quantificação de proteínas de gemas axilares de cana-de-açúcar sem o Triton X-100 em solução tampão (Tabela 5).

Tabela 5 – Quantificação da mistura proteica obtida pelo método TCA/acetona com e sem Triton X-100

Amostra	µg/mL
5A (sem Triton X-100)	1.930
5B (sem Triton X-100)	1.620
5C (sem Triton X-100)	2.240
6A (com Triton X-100)	1.980
6B (com Triton X-100)	2.050
6C (com Triton X-100)	1.820
Média sem Triton X-100	1.930
Média com Triton X-100	1.950

O gel PAGE-Nativo não foi adequado para a separação eletroforética da mistura proteica. Ficou evidente no gel, a necessidade da desnaturação pelo calor, uso do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e do β -mercaptoetanol. O β -mercaptoetanol foi adicionado no tampão da amostra, e o SDS foi adicionado no tampão da amostra, no tampão do gel e no tampão dos eletrodos. O β -mercaptoetanol é responsável por reduzir as ligações dissulfeto (Siddiqui et al., 2005) presentes nas sequências polipeptídicas deixando-as livres para migrar no gel independentemente. O β -mercaptoetanol também reduz as ligações dissulfeto intramolecular, permitindo que cada sequência polipeptídica migre independentemente da sua estrutura secundária, enquanto o SDS se liga a proteína por ligações predominantemente hidrofóbicas promovendo o desdobramento das estruturas terciárias, deixando também, as moléculas de proteínas negativamente carregadas (Bhuyan,

2009). Nas Figuras 17 e 19 é possível comparar as mesmas amostras (A, B, C, D) submetidas à SDS-PAGE (Figura 17a) e PAGE-Nativo (Figura 19). O protocolo foi eficiente também para a extração de proteínas totais das gemas axilares das variedades CTC4 e RB966928 (Figura 17b).

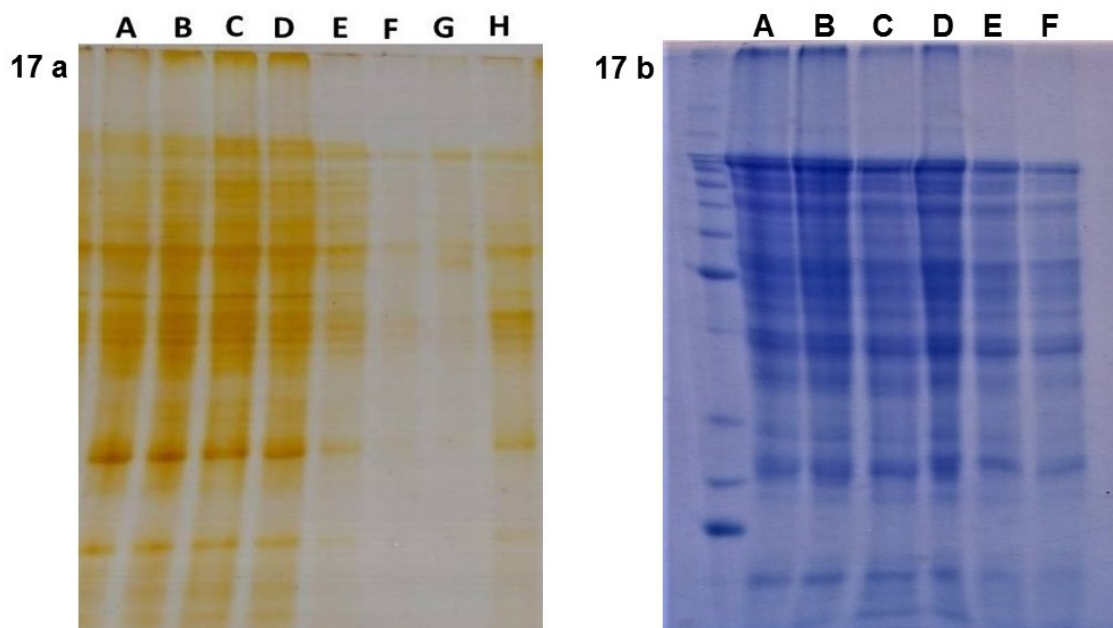


Figura 17 – 17a- Gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata. A, B, C, D, amostras extraídas pelo método TCA/acetona modificado para gemas axilares de cana-de-açúcar; E, F, G, H, amostras extraídas pelo método de Riffel et al. (2012). **17b** – Proteínas totais extraídas das cultivares CTC4 (A, B, C) e RB966928 (D, E, F) pela metodologia modificada no presente estudo e coradas com azul de comassie.

A coloração realizada com o azul de comassie apresentou uma melhor definição das bandas, facilitando a análise do gel, como pode ser observado na Figura 18 a e b.

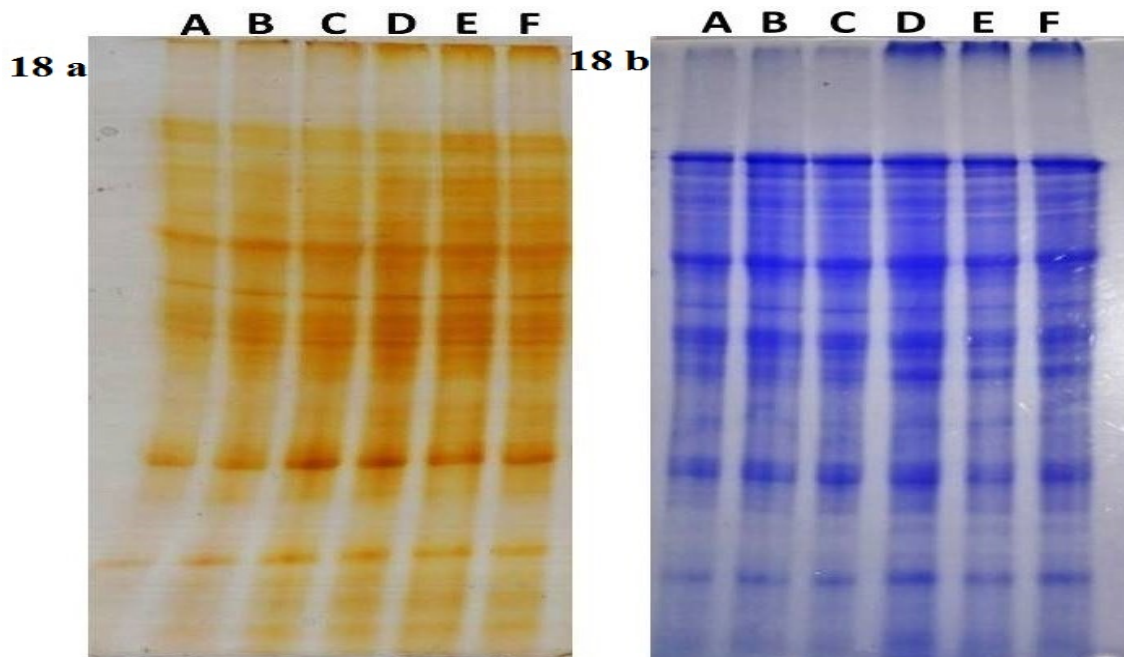


Figura 18- Comparação entre as colorações por nitrato de prata (18 a) e azul de comassie (18 b). A, B, C – sem utilização de Triton X-100 na extração; D, E, F – com utilização de Triton X-100 na extração. A, B, C, D, E, F: gemas axilares do terceiro corte da cultivar RB867515.

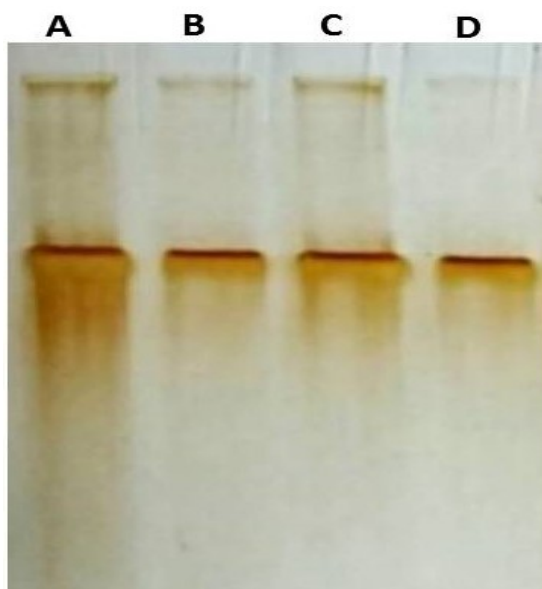


Figura 19 – Gel PAGE-Nativo com amostras de proteínas extraídas pelo método de TCA/acetona adaptado para extração de proteínas de gemas axilares de cana-de-açúcar.

4.2 Perfil proteico em gel de SDS-PAGE e quantificação de proteínas totais extraídas das gemas de cana-planta e quarta soca

O gel de SDS-PAGE realizado com as proteínas extraídas das gemas axilares de cana-de-açúcar demonstrou que o método foi efetivo na extração das proteínas totais, sendo possível observar padrões distintos nos respectivos tratamentos, como é possível observar na Figura 20.

A eletroforese desnaturante é uma etapa fundamental para se observar o padrão de extração das proteínas, dessa forma, uma boa extração deve conter o máximo possível de bandas distintas. Além disso, esta separação prévia em gel SDS-PAGE indica que os diferentes tratamentos apresentam diferenças na expressão de proteínas. Na Figura 21, é possível visualizar diferenças no perfil eletroforético entre a cana-planta e a quarta soca, sendo as mais marcantes, sinalizadas com setas vermelhas.

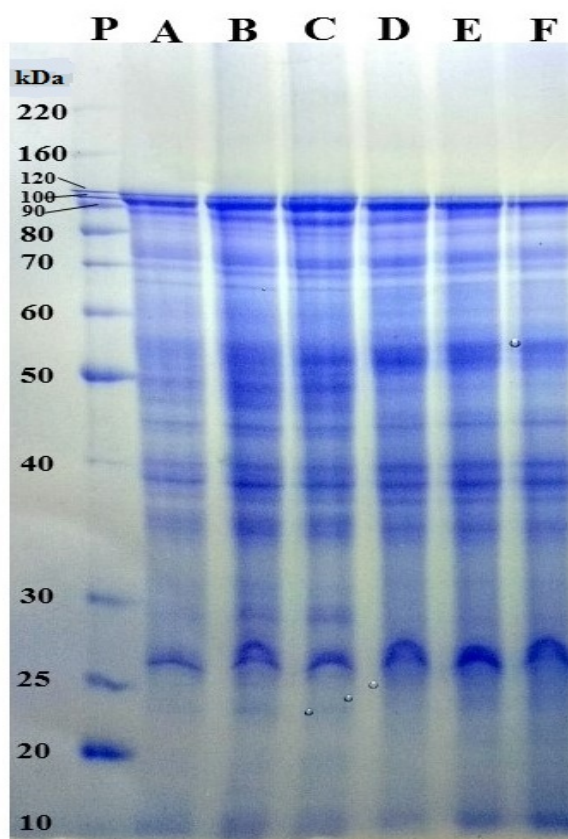


Figura 20 – Gel SDS-PAGE das proteínas totais extraídas das gemas axilares da cana-planta (A, B, C) e quarta soca (D, E, F), da cultivar RB867515.

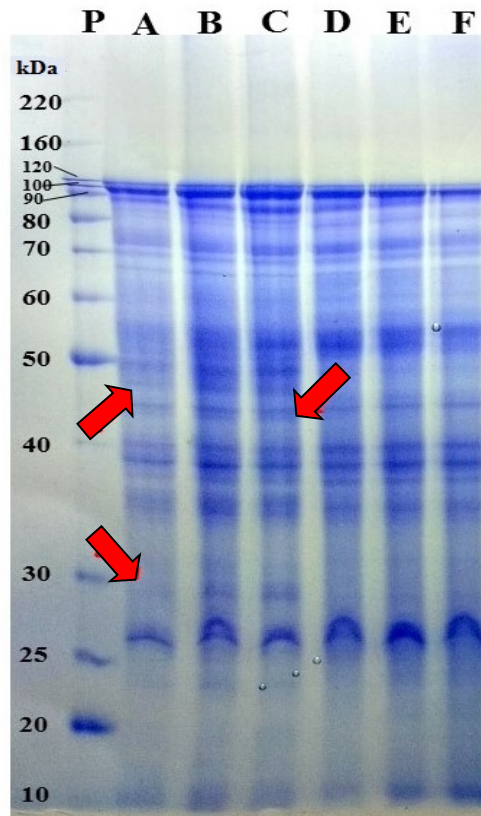


Figura 21 – Bandas diferenciais indicando alteração no proteoma das gemas axilares nos diferentes cortes. P = *Ladder*; A, B, C = cana-planta; D, E, F = quarta soca.

A quantificação pelo método fluorimétrico, mostrou valores variando entre 1.240 $\mu\text{g/mL}$ (quarta soca) a 1.780 $\mu\text{g/mL}$ (cana-planta) de proteínas por extração, caracterizando uma concentração média de 1.507 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas totais extraídas das gemas axilares da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar (Tabela 6). Ribeiro (2010) obteve uma média de 530 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína utilizando o método de TCA para extração de proteínas totais de folha e entrenó imaturo de cana-de-açúcar. Silva e Souza (2009) obtiveram uma quantidade proteica de 2.200 $\mu\text{g/mL}$ e 1.192 $\mu\text{g/mL}$, para folhas e raízes, respectivamente, de *Piper tuberculatum*, utilizando método de tampão com sacarose e 500 mg de material vegetal. Almaraj et al. (2010) testaram protocolos para extração de proteínas totais de tecido de colmos de cana-de-açúcar e encontraram cerca de 300 mg de proteínas por grama de tecido fresco, utilizando o método TCA/acetona com diferentes soluções de ressuspensão.

Tabela 6 – Quantificação das proteínas totais extraídas da cultivar RB867515 pelo método TCA/acetona adaptado para gemas axilares de cana-de-açúcar

Amostra	µg/mL
A (cana-planta)	1.700
B (cana-planta)	1.700
C (cana-planta)	1.780
D (quarta soca)	1.370
E (quarta soca)	1.240
F (quarta soca)	1.250
Média (cana-planta)	1.727
Média (quarta soca)	1.287
Média geral	1.507

4.3 Identificação das proteínas expressas na cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515

Os proteomas totais das gemas axilares da cana-planta e da quarta soca podem ser observados, respectivamente nas Tabela 7 e Tabela 8. No total foram identificadas 235 proteínas. Na cana planta foram identificadas 183 proteínas, sendo 71 (38,8% do proteoma total) detectadas apenas nessa idade de corte (Tabela 7, marcação ^a). A quarta soca apresentou 164 proteínas, sendo 52 (31,7% do proteoma total) encontradas exclusivamente nessa idade de corte (Tabela 7, marcação ^b), apresentando uma redução de 10,4% em relação ao proteoma total da cana planta. Um total de 112 proteína foram encontradas tanto na cana planta quanto na quarta soca (Figura 22).



Figura 22 – Diagrama de Venn com a quantidade de proteínas e cadeias polipeptídicas identificadas nas gemas axilares da cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515, e proteínas diferentemente encontradas em cada idade de corte analisada.

As 112 proteínas detectadas tanto na cana-planta quanto na quarta soca estão associadas com os mais amplos processos biológicos, como o metabolismo de compostos orgânicos (proteínas, carboidratos e lipídios) respostas a diversos tipos de estresses (salino, hídrico, osmótico, entre outros), componentes de membranas celulares (citoplasmática e vacuolar), reguladores da expressão gênica, componentes da “maquinaria traducional” (ribonucleoproteínas e fatores de alongação), entre outros diversos processos que afetam a manutenção e desenvolvimento das gemas.

Um fato importante a ser observado é a identificação de proteínas em regiões do gel onde não apresentava bandas bem definidas, como as regiões 1, 4, 8 e 10 (Figura 16). Em todas essas regiões foi possível a identificação de proteínas, sendo as proteínas e cadeias polipeptídicas com massa entre 200 e 119 kDa, 56 a 62 kDa, 30 a 33 kDa, 19 a 25 kDa correspondente respectivamente as regiões 1, 4, 8 e 10 do gel de SDS-PAGE. Dessas regiões destaca-se a região 8, com 26 proteínas identificadas. Fica evidente a importância em se analisar regiões sem bandas aparentes no gel SDS-PAGE, principalmente com a utilização de técnicas com alta sensibilidade como a espectrometria de massas. Não analisar essas regiões do gel reflete na perda de informação, principalmente na elaboração do proteoma total de espécies ou material biológico de interesse.

Tabela 7– Proteoma total da gema axilar da cana-planta da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar

Nº/Acesso ou ID das proteínas/ Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
1/CLH1_ORYSJ/ SwissProt	Clathrin heavy chain 1	4/4	219	3	194.534	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
2/KHG02463.1/ NCBIprot	Splicing factor 3B subunit 3	1/1	70	1	136.932	<i>Gossypium arboreum</i>
3/NM18365.1/ NCBIprot	*Acetyl-CoA carboxylase 2	1/1	49	1	135.515	<i>Zea mays</i>
4/EMT08767.1/ NCBIprot	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	1/1	51	1	119.941	<i>Egilopsis tauschii</i>
5/UBE11_WHEAT/ SwissProt	Ubiquitin-activating enzyme E1	1/1	55	1	117.846	<i>Triticum aestivum</i>
6/ACOC_ORYSJ/ NCBIprot	Putative aconitate hydratase, cytoplasmic (Aconitase)	1/1	54	2	98.591	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
7/ONM08081.1/ NCBIprot	Lipoxygenase	1/1	81	1	96.845	<i>Zea mays</i>
8/PHSH_SOLTU/ Swissprot	*Alpha-glucan phosphorylase, H isozyme	1/1	66	1	95.451	<i>Solanum tuberosum</i>
9/OEL20031.1/ NCBIprot	Elongation factor 2	7/7	336	10	94.808	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>
10/OEL17456.1/ NCBIprot	Heat shock 70 kDa protein 14	1/1	60	1	94.240	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>
11/ENPL_ARATH/ SwissProt	*Endoplasmin homolog (Protein SHEPHERD)	1/1	57	1	94.203	<i>Arabidopsis thaliana</i>
12/AGI56230.1/ NCBIprot	Sucrose synthase	8/7	526	16	93.492	<i>Saccharum officinarum</i>
13/PLDA1_BRAOC/ SwissProt	Phospholipase D alpha 1	1/1	67	1	92.236	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
14/CD48A_ARATH/SwissProt	Cell division control protein 48 homolog	2/2	124	3	90.079	<i>Arabidopsis thaliana</i>
15/AQK52792.1/NCBIprot	^a TUDOR-SN protein 1 (Ribonuclease TUDOR 1-like)	1/1	70	1	84.747	<i>Zea mays</i>
16/KXG24059.1/NCBIprot	Hypothetical protein (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase – UniProtKB)	12/4	864	21	84.696	<i>Sorghum bicolor</i>
17/AGC60019.1/NCBIprot	Heat shock protein 90	4/0	239	7	80.355	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP80-3280
18/MFP_ORYSJ/SwissProt	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein (Enoyl-CoA hydratase)	1/1	58	1	79.038	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
19/BAD01242.1/NCBIprot	Putative glycyl-tRNA synthetase	1/1	55	1	77.653	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
20/AQL02798.1/NCBIprot	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase	1/1	62	1	74.843	<i>Zea mays</i>
21/TKTC_MAIZE/SwissProt	Transketolase, chloroplastic	1/1	57	1	73.347	<i>Zea mays</i>
22/HSP7J_ARATH/SwissProt	Heat shock 70 kDa protein 10, mitochondrial	1/1	56	1	73.174	<i>Arabidopsis thaliana</i>
23/ONM09254.1/NCBIprot	^a Exhydrolase II	1/1	56	2	72.774	<i>Zea mays</i>
24/AQK53726.1/NCBIprot	Phenylalanine ammonia lyase	7/0	414	13	72.130	<i>Zea mays</i>
25/NP_001306686.1/NCBIprot	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37 (Heat Shock Protein 70)	10/0	686	27	71.517	<i>Zea mays</i>
26/SDHA_ORYSJ/SwissProt	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (Flavoprotein subunit of complex II)	2/2	168	4	69.494	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
27/VATA_ARATH/SwissProt	V-type proton ATPase catalytic subunit A	2/1	140	4	69.111	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/único	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
28 /XP_016551170.1/NCBIprot	^a Predicted: methylenetetrahydrofolate reductase 2-like	1/1	53	1	68.077	<i>Capsicum annuum</i>
29 /AAB94293.1/NCBIprot	Polyphenol oxidase	4/4	264	9	67.709	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar
30 /AFO64345.1/NCBIprot	Putative ATP citrate lyase	5/2	276	8	66.539	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28
31 /RH52C_ORYSJ/SwissProt	^a DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52C	1/1	60	2	66.232	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
32 /OEL22530.1/NCBIprot	T-complex protein 1 subunit eta	2/2	137	6	66.202	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>
33 /NP_001146890.1/NCBIprot	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta;	2/1	141	3	64.511	<i>Zea mays</i>
34 /AAC49177.1/NCBIprot	^a Dhurrinase (Cyanogenic beta-glucosidase dhurrinase)	2/2	106	3	64.195	<i>Sorghum bicolor</i>
35 /ACG25573.1/NCBIprot	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2/2	149	5	64.112	<i>Zea mays</i>
36 /AQK46517.1/NCBIprot	^a Beta-D-xylosidase 4	1/1	52	1	64.089	<i>Zea mays</i>
37 /ONL98792.1/NCBIprot	Nucleoredoxin 1-1	1/1	68	2	64.030	<i>Zea mays</i>
38 /NP_001170508.1/NCBIprot	^a Dihydroxy-acid dehydratase chloroplastic	1/1	112	3	63.848	<i>Zea mays</i>
39 /AQK54720.1/NCBIprot	Ppi-phosphofructokinase subunit alpha (Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha)	1/1	92	2	63.745	<i>Zea mays</i>
40 /AGT16432.1/NCBIprot	Phosphoglucomutase	2/2	125	8	63.202	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
41 /XP_002454700.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Leucine aminopeptidase family protein – UniProtKB)	4/4	250	14	62.121	<i>Sorghum bicolor</i>
42 /NP_001168412.1/NCBIprot	Ppi-phosphofructokinase subunit beta (Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta)	2/2	116	4	61.640	<i>Zea mays</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
43/ONM41488.1/NCBIprot	^a Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	1/1	162	4	61.607	<i>Zea mays</i>
44/OEL25462.1/NCBIprot	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic;	4/4	261	10	61.586	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
45/CDPKF_ORYSJ/SwissProt	^a Calcium-dependent protein kinase (OsCDPK)	1/1	57	2	61.563	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
46/CH61_MAIZE/SwissProt	Chaperonin CPN60-1, mitochondrial; HSP60-1	1/1	69	2	61.458	<i>Zea mays</i>
47/AQK42951.1/NCBIprot	^a Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma family protein	1/1	54	1	61.326	<i>Zea mays</i>
48/ACG36897.1/NCBIprot	Aspartyl-tRNA synthetase	1/1	71	2	61.283	<i>Zea mays</i>
49/ONM26494.1/NCBIprot	^a Protein disulfide isomerase	1/1	53	3	61.141	<i>Zea mays</i>
50/KHN24460.1/NCBIprot	^a T-complex protein 1 subunit gamma	1/1	61	1	60.781	<i>Glycine soja</i>
51/KQL26130.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Beta-amylase – UniProtKB)	2/2	109	6	60.452	<i>Setaria italica</i>
52/AFF18772.2/NCBIprot	Glutathione reductase	1/1	50	2	60.433	<i>Dimocarpus longan</i>
53/KXG33615.1/NCBIprot	Hypothetical protein (2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase – UniProtKB)	2/2	81	3	60.384	<i>Sorghum bicolor</i>
54/EMS60932.1/NCBIprot	T-complex protein 1 subunit beta	2/2	97	4	59.628	<i>Triticum urartu</i>
55/ACG40009.1/NCBIprot	^a T-complex protein 1 subunit épsilon	1/1	55	5	59.585	<i>Zea mays</i>
56/AQK54532.1/NCBIprot	Selenium-binding protein	1/1	50	2	59.467	<i>Zea mays</i>
57/EMT24003.1/NCBIprot	^a RuvB-like protein 1 (49-kDa TATA box-binding protein-interacting protein)	1/1	58	2	58.973	<i>Aegilops tauschii</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
58/KXG23127.1/NCBIprot	^a Hypothetical protein (Pyruvate dehydrogenase complex component E2–UniProtKB)	1/1	63	2	58.231	<i>Sorghum bicolor</i>
59/IMA1A_ORYSJ/SwissProt	^a Importin subunit alpha	2/2	132	6	58.162	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
60/XP_006647227.1/NCBIprot	Predicted: T-complex protein 1 subunit delta	1/1	88	4	58.060	<i>Oryza brachyntha</i>
61/KPYC1_ORYSI/SwissProt	Pyruvate kinase 1, cytosolic	1/1	88	4	57.740	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
62/3FR7_A/NCBIprot	Chain A, Ketol-Acid Reductoisomerase (Kari) In Complex With Mg ²⁺	2/2	143	5	57.566	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
63/AHZ13843.1/NCBIprot	Catalase	3/2	187	9	56.820	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar Yacheng05-179
64/ADP02192.1/NCBIprot	Putative non-cyanogenic beta-glucosidase	1/1	90	3	56.692	<i>Triticum aestivum</i>
65/XP_006649652.1/NCBIprot	Predicted: Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 3	1/1	52	2	56.571	<i>Oryza brachyantha</i>
66/UAP1_ARATH/SwissProt	^a UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase 1	1/1	56	2	56.548	<i>Arabidopsis thaliana</i>
67/YP_009295487.1/NCBIprot	ATPase subunit 1,mitochondrion (ATP synthase F1, alpha subunit)	2/2	165	6	55.435	<i>Saccharum officinarum</i>
68/VATB1_ARATH/SwissProt	V-type proton ATPase subunit B1	5/2	302	15	54.188	<i>Arabidopsis thaliana</i>
69/AGT16642.1/NCBIprot	Adenosylhomocysteinase	5/4	294	14	53.888	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
70/XP_004968669.1/NCBIprot	^a Predicted: Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like	1/1	54	3	53.609	<i>Setaria italica</i>
71/OEL22996.1/NCBIprot	Putative elongation fator 1-gamma	1/1	55	4	53.467	<i>Dichantheium oligosantes</i>
72/JAU25398.1/NCBIprot	^a 26S proteasome regulatory subunit 4 - like protein A, partial	1/1	58	2	53.430	<i>Noccaea caerulescens</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
73/XP_002444986.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Glycosyltransferase – UniProtKB)	2/2	119	5	53.225	<i>Sorghum bicolor</i>
74/UGDH4_ORYSJ/SwissProt	UDP-glucose 6-dehydrogenase	4/0	341	14	53.391	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
75/KQJ84715.1/NCBIprot	^a Hypothetical protein (Polyadenylate-binding protein RBP45-Like – UniProtKB)	1/1	65	1	53.263	<i>Brachypodium distachyon</i>
76/ACL80329.1/NCBIprot	UDP-glucose pyrophosphorylase	5/3	341	13	52.431	<i>Saccharum officinarum</i>
77/AGT15905.1/NCBIprot	Serine hydroxymethyltransferase	2/2	157	9	52.087	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
78/HISX_ORYSJ/SwissProt	^a Histidinol dehydrogenase, chloroplastic	1/1	55	3	50.990	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
79/TBB1_MAIZE/SwissProt	Tubulin beta-1 chain	3/2	157	9	50.614	<i>Zea mays</i>
80/TBA1_ELEIN/NCBIprot	Tubulin alpha-1 chain	5/3	426	17	50.384	<i>Eleusine indica</i>
81/CAA75477.1/NCBIprot	ATP synthase subunit beta	6/5	378	18	49.219	<i>Sorghum bicolor</i>
82/OMO98074.1/NCBIprot	^a Peptide chain release factor eRF1/aRF1	1/1	48	2	49.100	<i>Corchorus capsularis</i>
83/OEL38116.1/NCBIprot	^a BAHD acyltransferase DCR	1/1	53	3	48.885	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
84/EMT27516.1/NCBIprot	^a Citrate synthase	1/1	57	3	48.396	<i>Aegilops tauschii</i>
85/ENO_ORYSJ/SwissProt	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Enolase)	4/3	256	12	48.285	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
86/PRS8A_ARATH/SwissProt	^a 26S protease regulatory subunit 8	1/1	53	3	47.389	<i>Arabidopsis thaliana</i>
87/IF4A_MAIZE/SwissProt	Eukaryotic initiation factor 4A	1/1	60	6	46.849	<i>Zea mays</i>
88/NP_001150503.1/NCBIprot	3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase	1/1	47	2	46.584	<i>Zea mays</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
89 /BAD45460.1/ NCBIprot	Putative pectinesterase	2/1	110	5	46.405	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
90 /NP_001150674.1/ NCBIprot	Transaldolase	2/2	132	6	46.274	<i>Zea mays</i>
91 /ICDHC_ARATH/ SwissProt	Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP]	1/1	65	4	46.059	<i>Arabidopsis thaliana</i>
92 /AQK40926.1/ NCBIprot	Obg-like ATPase 1	1/1	73	4	46.058	<i>Zea mays</i>
93 /PRS6B_ARATH/ SwissProt	^a 26S protease regulatory subunit 6B homolog	1/1	89	4	45.984	<i>Arabidopsis thaliana</i>
94 /PS10A_ARATH/ SwissProt	^a 26S protease regulatory subunit 10B homolog A	1/1	76	5	44.960	<i>Arabidopsis thaliana</i>
95 /AXS_ORYSJ/ SwissProt	^a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase	1/1	67	2	44.818	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
96 /NP_001147047.1/ NCBIprot	^a 60S ribosomal protein L4	3/3	102	8	44.528	<i>Zea mays</i>
97 /XP_002447121.1/ NCBIprot	Hypothetical protein (Aminomethyltransferase – UniProtKB)	1/1	53	2	44.388	<i>Sorghum bicolor</i>
98 /AGT16628.1/ NCBIprot	^a Elongation factor 1 alpha	3/1	154	13	44.302	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
99 /ONM10543.1/ NCBIprot	^a Hypothetical protein (DNA-directed RNA polymerase subunit beta – UniProtKB)	2/2	121	9	44.043	<i>Zea mays</i>
100 /KXG33418.1/ NCBIprot	^a Hypothetical protein (Aspartate aminotransferase – UniProtKB)	1/1	50	2	43.956	<i>Sorghum bicolor</i>
101 /OPR7_ORYSJ/ SwissProt	12-oxophytodienoate reductase	1/1	52	2	43.878	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
102 /EOY27737.1/ NCBIprot	^a 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I	1/1	63	3	43.735	<i>Theobroma cacao</i>
103 /XP_008800626.1/ NCBIprot	Predicted: probable LL-diaminopimelate aminotransferase	1/1	55	3	43.613	<i>Phoenix dactylifera</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/único	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
104 /XP_020101537.1/NCBIprot	^a S-adenosylmethionine synthase 5	1/1	83	3	43.510	<i>Ananas comosus</i>
105 /B0LDU6.1/NCBIprot	^a Chalcone synthase	1/1	54	3	43.203	<i>Rubus idaeus</i>
106 /GME1_ORYSI/SwissProt	^a GDP-mannose 3,5-epimerase 1	1/1	60	4	43.180	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
107 /ONM15574.1/NCBIprot	Isopropylmalate dehydrogenase 2	2/2	116	9	43.132	<i>Zea mays</i>
108 /ACG35066.1/NCBIprot	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	1/1	67	3	43.105	<i>Zea mays</i>
109 /NP_001142404.1/NCBIprot	Phosphoglycerate kinase	6/2	313	19	42.470	<i>Zea mays</i>
110 /AQK96567.1/NCBIprot	^a UBP1-associated protein 2C (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1)	1/1	67	5	42.200	<i>Zea mays</i>
111 /ACT3_PEA/SwissProt	^a Actin	2/1	98	10	41.836	<i>Pisum sativum</i>
112 /CBB36460.1/NCBIprot	^a Alcohol dehydrogenase	1/1	75	5	41.685	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
113 /KXG39210.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Putative acetyl-CoA acetyltransferase cytosolic – UniProtKB)	3/1	153	13	41.564	<i>Sorghum bicolor</i>
114 /OEL24402.1/NCBIprot	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase-like protein 5, partial	1/1	51	1	41.366	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>
115 /XP_012854067.1/NCBIprot	^a Predicted: UDP-arabinopyranose mutase 3	1/1	50	5	41.204	<i>Erythranthe guttata</i>
116 /OQU78658.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Nucleoside-triphosphatase; Apyrase – UniProtKB)	1/1	60	3	40.969	<i>Sorghum bicolor</i>
117 /XP_002466246.1/N8BIprot	Hypothetical protein (Imidazolonepropionase-UniProtKB)	2/2	134	6	40.544	<i>Sorghum bicolor</i>
118 /OEL24262.1/NCBIprot	^a Hypothetical protein (Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase – UniProtKB)	1/1	64	5	40.041	<i>Dichanthelium oligosanthes</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas /Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
119/ONM22945.1/NCBIprot	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein	1/1	101	4	39.908	<i>Zea mays</i>
120/AAQ67347.1/NCBIprot	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	3/3	156	9	39.824	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
121/XP_002454890.1/NCBIprot	^a Uncharacterized protein (Vegetative storage protein PNI288 – UniProtKB)	1/1	81	6	39.730	<i>Sorghum bicolor</i>
122/KQK91059.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Ricin B-like lectin R40G2 – UniProtKB)	1/1	92	5	39.274	<i>Setaria italica</i>
123/AQK89688.1/NCBIprot	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent (Putative alcohol dehydrogenase superfamily protein)	1/1	71	3	39.196	<i>Zea mays</i>
124/BAI59775.1/NCBIprot	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme (Aldolase C-2)	4/4	230	10	39.170	<i>Phyllostachys edulis</i>
125/LDH_MAIZE/SwissProt	^a L-lactate dehydrogenase	1/1	69	3	38.698	<i>Zea mays</i>
126/XP_002440480.1/NCBIprot	^a Hypothetical protein (13S globulin seed storage protein – UniProtKB)	1/1	59	3	38.091	<i>Sorghum bicolor</i>
127/OEL25000.1/NCBIprot	Ribokinase	1/1	69	3	37.603	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
128/XP_008645951.2/NCBIprot	Adenosine kinase 2	3/2	195	14	37.539	<i>Zea mays</i>
129/OEL22313.1/NCBIprot	Peroxidase	2/2	119	11	36.793	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
130/GBLPA_ORYSJ/=SwissProt	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A (Receptor for activated C kinase)	3/3	159	10	36.665	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
131/OEL20760.1/NCBIprot	^a Putative voltage-gated potassium channel subunit beta	1/1	59	4	36.625	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
132/KXG20851.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – UniProtKB)	5/4	350	24	36.618	<i>Sorghum bicolor</i>
133/KXG24253.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Fructokinase – UniProtKB)	8/6	520	29	35.831	<i>Sorghum bicolor</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
134 /NP_001130539.1 /NCBIprot	Late embryogenesis abundant protein group 2	3/2	167	14	35.309	<i>Zea mays</i>
135 /XP_002454396.1 /NCBIprot	Hypothetical protein (Thioredoxin reductase – UniProtKB)	1/1	71	6	35.006	<i>Sorghum bicolor</i>
136 /SPDE_COFAR/SwissProt	Spermidine synthase (Putrescine aminopropyltransferase)	1/1	72	4	34.878	<i>Coffea arabica</i>
137 /OQU90839.1/NCBIprot	^a Hypothetical protein (Glutamate dehydrogenase – UniProtKB)	1/1	60	7	34.859	<i>Sorghum bicolor</i>
138 /RL51_ORYSI/SwissProt	^a 60S ribosomal protein L5-1	1/1	55	2	34.791	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
139 /AQK39735.1/NCBIprot	Putative oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	1/1	64	6	34.649	<i>Zea mays</i>
140 /RLA0_MAIZE/SwissProt	60S acidic ribosomal protein P0	1/1	92	10	34.597	<i>Zea mays</i>
141 /ONM12595.1/NCBIprot	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog	1/1	48	3	34.543	<i>Zea mays</i>
142 /XP_006650879.1/NCBIprot	^a Uncharacterized protein (Late embryogenesis abundant protein Le14-A – Uniprot)	1/1	59	7	34.533	<i>Oryza brachyantha</i>
143 /OEL25171.1/NCBIprot	^a NADH-cytochrome b5 reductase-like protein	1/1	60	3	34.201	<i>Dichantheium olihosanthes</i>
144 /ONM42211.1/NCBIprot	V-type proton ATPase subunit C	1/1	79	5	34.106	<i>Zea mays</i>
145 /ABA99939.2/NCBIprot	Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor, putative, expressed	1/1	52	3	34.009	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
146 /KXG24064.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Cysteine synthase-like – UniProtKB)	1/1	67	5	34.280	<i>Sorghum bicolor</i>
147 /MD36A_ARATH/SwissProt	^a Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 36a	1/1	49	3	33.803	<i>Arabidopsis thaliana</i>
148 /OEL19650.1 /NCBIprot	^a 40S ribosomal protein SA	1/1	65	3	33.698	<i>Dichantheium oligosanthes</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
149 /OEL18647.1/ NCBIprot	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4/3	282	22	33.656	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
150 /ACG31861.1/ NCBIprot	Succinyl-CoA ligase alpha-chain 2	1/1	66	3	33.517	<i>Zea mays</i>
151 /EMS52981.1/ NCBIprot	Legumin-like protein (Glutelin type-A1)	2/2	100	8	33.443	<i>Triticum urartu</i>
152 /AHF18211.1/ NCBIprot	Glyoxylase 1 (Lactoylglutathione lyase)	1/1	77	3	33.005	<i>Saccharum</i> Hybrid cultivar
153 /IFRH_MAIZE/ SwissProt	Isoflavone reductase homolog IRL	1/1	57	3	32.831	<i>Zea mays</i>
154 /ABB47824.1/ NCBIprot	^a Protochlorophyllide reductase B, chloroplast precursor, putative, expressed	1/1	55	4	31.585	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
155 /AAS86422.1/ NCBIprot	Glutathione S-transferase GSTF14, partial	1/1	51	5	30.766	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
156 /OMP08788.1/ NCBIprot	^a Ribosomal protein S5	1/1	61	5	29.701	<i>Corchorus olitorius</i>
157 /OEL25577.1/ NCBIprot	Proteasome subunit beta type 1	2/2	140	7	29.394	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
158 /AQL01982.1/ NCBIprot	Aspartic proteinase A1	1/1	63	8	28.998	<i>Zea mays</i>
159 /ACG36992.1/ NCBIprot	^a 60S ribosomal protein L2; 60S ribosomal protein L8	1/1	71	4	28.354	<i>Zea mays</i>
160 /AGO97076.1/ NCBIprot	Ascorbate peroxidase	4/3	324	26	27.556	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28
161 /XP_020184931.1/ NCBIprot	Stress-response A/B barrel domain-containing protein DABB1-like	1/1	53	4	27.325	<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i>
162 /ACG24648.1/ NCBIprot	Triosephosphate isomerase, cytosolic	7/0	560	41	27.278	<i>Zea mays</i>
163 /AGT17219.1/ NCBIprot	Proteasome alpha subunit D2	2/2	118	10	27.087	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
164 /EMT10898.1/ NCBIprot	Ras-related protein ARA-3	1/1	66	5	27.044	<i>Aegilops tauschii</i>

Tabela 7, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
165 /XP_010493182.1/NCBIprot	^a Predicted: 20 kDa chaperonin, chloroplastic (CPN21)	1/1	72	10	26.829	<i>Camelia sativa</i>
166 /EMS48502.1/NCBIprot	^a 40S ribosomal protein S3	1/1	59	5	25.515	<i>Triticum urartu</i>
167 /RL10_MAIZE/SwissProt	^a 60S ribosomal protein L10	1/1	70	5	25.359	<i>Zea mays</i>
168 /RS8_MAIZE/SwissProt	^a 40S ribosomal protein S8	2/1	149	13	25.155	<i>Zea mays</i>
169 /EF1D1_ORYSJ/SwissProt	^a Elongation factor 1-delta 1	1/1	55	3	24.904	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
170 /GSTF1_MAIZE/SwissProt	Glutathione S-transferase 1	2/2	106	13	24.034	<i>Zea mays</i>
171 /RABD1_ARATH/SwissProt	^a Ras-related protein RABD1	1/1	73	7	22.995	<i>Arabidopsis thaliana</i>
172 /AGT16630.1/NCBIprot	^a GTP-binding nuclear protein	1/1	70	5	22.851	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
173 /RIC1_ORYSJ/SwissProt	^a Ras-related protein RIC1	1/1	73	7	22.690	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
174 /CDI66516.1/NCBIprot	^a CBS domain-containing protein	1/1	54	5	22.531	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
175 /NACA_PINTA/SwissProt	^a Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	1/1	80	8	22.452	<i>Pinus taeda</i>
176 /GL814_ORYSJ/SwissProt	^a Germin-like protein 8-14 (Auxin-binding protein)	1/1	50	10	22.018	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
177 /KMZ64823.1/NCBIprot	^a Ribosomal protein 5B	1/1	56	6	21.967	<i>Zostera marina</i>
178 /KHN19077.1/NCBIprot	Flavoprotein wrbA (NAD(P)H dehydrogenase(quinone) FQR1)	1/1	59	5	21.113	<i>Glycine soja</i>
179 /ACG31637.1/NCBIprot	^a 60S ribosomal protein L11	1/1	53	7	20.865	<i>Zea mays</i>
180 /AQK53244.1/NCBIprot	60S ribosomal protein L6;	1/1	60	8	18.857	<i>Zea mays</i>

Tabela 7, Cont.

Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
181 /AGT16090.1/ NCBIprot	Cyclophilin (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like)	2/2	143	18	18.610	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
182 /AGT16537.1/ NCBIprot	60S ribosomal protein L12	1/1	76	9	17.807	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
183 /NP_001146919.1/ NCBIprot	^a OB-fold nucleic acid binding domain containing protein	1/1	58	6	15.544	<i>Zea mays</i>

^a – Proteínas encontradas apenas na cana planta

Tabela 8– Proteoma total da gema axilar da quarta soca da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
1/CLH1_ORYSJ/SwissProt	Clathrin heavy chain 1	5/2	319	4	194.534	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
2/OEL24502.1/NCBIprot	Splicing factor 3B subunit 3	1/1	56	1	137.265	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
3/EMT08767.1/NCBIprot	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	1/1	58	1	119.941	<i>Aegilops tauschii</i>
4/UBE11_WHEAT/SwissProt	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	1/1	74	1	117.846	<i>Triticum aestivum</i>
5/AEK76075.1/NCBIprot	^b Heat shock protein 101 (Hsp101; Chaperone protein ClpB1)	1/1	84	1	101.101	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP80-3280
6/ONM35737.1/NCBIprot	Lipoxygenase	2/2	141	2	99.495	<i>Zea mays</i>
7/AQK70569.1/NCBIprot	^b Aminopeptidase M1	1/1	52	1	99.279	<i>Zea mays</i>
8/AQK50311.1/NCBIprot	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	3/2	200	6	96.324	<i>Zea mays</i>
9/OEL20031.1/NCBIprot	Elongation factor 2	7/2	404	12	94.808	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
10/OEL17456.1/NCBIprot	Heat shock 70 kDa protein 14	2/2	101	3	94.240	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
11/AGI56230.1/NCBIprot	Sucrose synthase	5/5	348	7	93.492	<i>Saccharum officinarum</i>
12/PLDA1_BRAOC/SwissProt	Phospholipase D	1/1	70	1	92.236	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata
13/AEI01159.1/NCBIprot	Cell division cycle protein 48, partial	1/1	74	1	86.499	<i>Zea mays</i>
14/OEL32117.1/NCBIprot	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate - homocysteine methyltransferase 2	7/0	497	16	83.709	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
15/AGC60019.1/NCBIprot	Heat shock protein 90	1/1	66	1	80.355	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP80-3280

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
16/EMS45026.1 / NCBIprot	^b Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	1/1	66	1	79.818	<i>Triticum urartu</i>
17/AGF69114.1/ NCBIprot	Phenylalanine ammonia lyase	6/0	386	12	76.007	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar ROC22
18/OEL36924.1/ NCBIprot	Glycine--tRNA ligase, mitochondrial 1	1/1	50	1	75.960	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
19/ACOX1_ARATH/ SwissProt	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase	1/1	78	1	74.996	<i>Arabidopsis thaliana</i>
20/AQK72170.1/ NCBIprot	^b Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL3	1/1	58	1	74.087	<i>Zea mays</i>
21/XP_019200429.1 /NCBIprot	^b Predicted: Luminal-binding protein (Heat shock 70 kDa protein BIP1)	4/1	261	6	73.880	<i>Ipomoea nil</i>
22/JAT41108.1/ NCBIprot	^b Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g15630, mitochondrial, partial (Mitochondrial small ribosomal subunit protein mS39)	1/1	51	1	73.554	<i>Anthurium amnicola</i>
23/TKTC_MAIZE/ SwissProt	Transketolase, chloroplastic	1/1	52	1	73.347	<i>Zea mays</i>
24/HSP7J_ARATH /SwissProt	Heat shock 70 kDa protein 10, mitochondrial	1/1	57	1	73.174	<i>Arabidopsis thaliana</i>
25/AAK21879.1/ NCBIprot	^b Arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-I	1/1	70	2	72.557	<i>Hordeum vulgare</i>
26/NP_001306686.1 /NCBIprot	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37 (Heat shock protein 70)	9/1	599	23	71.517	<i>Zea mays</i>
27/AQK91457.1/ NCBIprot	Enoyl-CoA hydratase 1 (Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein)	2/2	62	4	71.334	<i>Zea mays</i>
28/SDHA_ORYSJ/ SwissProt	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	1/1	105	2	69.494	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
29/AAB94293.1/ NCBIprot	Polyphenol oxidase	4/4	252	10	67.709	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar
30/EMT13737.1/ NCBIprot	^b Glucose-6-phosphate isomerase	1/1	59	1	67.675	<i>Aegilops tauschii</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
31 /ACX50497.1/ NCBIprot	^b NADP-dependent malic enzyme	1/1	58	3	67.635	<i>Zea mays</i>
32 /AFO64345.1/ NCBIprot	Putative ATP citrate lyase; ATP-citrate synthase	3/1	236	5	66.539	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28
33 /PDC2_ORYSI/ SwissProt	^b Pyruvate decarboxylase	3/3	208	8	65.889	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
34 /ACG25573.1/ NCBIprot	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2/2	110	5	64.112	<i>Zea mays</i>
35 /NRX11_ORYSJ/ SwissProt	Probable nucleoredoxin 1-1	1/1	53	2	64.047	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
36 /AQK54720.1/ NCBIprot	Ppi-phosphofructokinase subunit alpha (Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha)	1/1	67	2	63.745	<i>Zea mays</i>
37 /AQL00827.1/ NCBIprot	Ppi-phosphofructokinase subunit beta (Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta)	1/1	51	2	63.451	<i>Zea mays</i>
38 /AQK92331.1/ NCBIprot	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic	3/1	231	7	63.213	<i>Zea mays</i>
39 /AGT16432.1/ NCBIprot	Phosphoglucomutase	3/2	172	11	63.202	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
40 /VATA_MAIZE/ SwissProt	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1/1	93	4	62.198	<i>Arabidopsis thaliana</i>
41 /KHM98926.1 /NCBIprot	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	1/1	74	2	61.724	<i>Glycine soja</i>
42 /XP_002528805.1/ NCBIprot	Predicted: T-complex protein 1 subunit eta	2/1	133	5	61.160	<i>Ricinus communis</i>
43 /KXG33615.1/ NCBIprot	Hypothetical protein (2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase – UniProtKB)	1/1	103	3	60.384	<i>Sorghum bicolor</i>
44 /EMS60932.1/ NCBIprot	T-complex protein 1 subunit beta	1/1	95	4	59.628	<i>Triticum urartu</i>

Tabela 8, Cont.

Acesso ou ID das proteínas / Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
45/XP_006652614.1/NCBIprot	^b Predicted: T-complex protein 1 subunit alpha	1/1	60	5	59.571	<i>Oryza Brachyantha</i>
46/BAB92019.1/NCBIprot	^b Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	1/1	63	2	59.521	<i>Sorghum bicolor</i>
47/AQK54532.1/NCBIprot	Selenium-binding protein	1/1	49	2	59.467	<i>Zea mays</i>
48/ATPBM_MAIZE/SwissProt	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	8/5	374	16	59.181	<i>Zea mays</i>
49/NP_001167830.1/NCBIprot	Putative TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	4/3	366	21	58.096	<i>Zea mays</i>
50/XP_004986000.1/NCBIprot	Predicted: T-complex protein 1 subunit delta	4/3	396	18	57.946	<i>Setaria italica</i>
51/AIY34491.1/NCBIprot	^b Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1/1	55	2	57.923	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar Yacheng05-179
52/KPYC1_ORYSI/SwissProt	Pyruvate kinase 1, cytosolic	1/1	55	4	57.740	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
53/AHZ13843.1/NCBIprot	Catalase	2/2	146	6	56.820	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar Yacheng05-179
54/ADP02192.1/NCBIprot	Putative non-cyanogenic beta-glucosidase	1/1	124	3	56.692	<i>Triticum aestivum</i>
55/OEL32960.1/NCBIprot	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	3/3	178	8	55.748	<i>Dichantheium oligosanthos</i>
56/AGZ15751.1/NCBIprot	^b Betaine-aldehyde dehydrogenase 2	2/1	180	8	55.590	<i>Sorghum bicolor</i>
57/AMYB_MAIZE/SwissProt	Beta-amylase	1/1	85	3	55.487	<i>Zea mays</i>
58/YP_009295487.1/NCBIprot	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1/1	64	4	55.435	<i>Saccharum officinarum</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/ Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
59/VATB1_GOSHI /SwissProt	V-type proton ATPase subunit B1	5/2	320	15	54.286	<i>Gossypium hirsutum</i>
60/AGT16642.1/ NCBIprot	Adenosylhomocysteinase	3/2	176	9	53.888	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
61/GSHRC_ORYSJ /SwissProt	Glutathione reductase, cytosolic	1/1	52	4	53.873	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
62/UGDH5_ORYSJ /SwissProt	UDP-glucose 6-dehydrogenase	4/4	212	15	53.455	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
63/ACL80329.1/ NCBIprot	UDP--glucose pyrophosphorylase	8/3	552	26	52.431	<i>Saccharum officinarum</i>
64/ACG28578.1/ NCBIprot	^b Cytochrome P450 CYP74A19	1/1	50	3	53.357	<i>Zea mays</i>
65/KVH40997.1/ NCBIprot	^b Aldehyde dehydrogenase, conserved site-containing protein	1/1	49	3	52.352	<i>Cynara cardunculus var. scolymys</i>
66/XP_002444986.1/ NCBIprot	Hypothetical protein (Glycosyltransferase – UniProtKB)	1/1	106	2	53.225	<i>Sorghum bicolor</i>
67/XP_002442053.1/ NCBIprot	^b Hypothetical protein (Argininosuccinate synthase – UniProtKB)	1/1	62	3	53.100	<i>Sorghum bicolor</i>
68/LCYD1_ORYSJ /SwissProt	^b Putative L-cysteine desulhydrase 1; Isopenicillin N epimerase -like	1/1	102	5	52.430	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
69/AGT15905.1/ NCBIprot	Serine hydroxymethyltransferase	2/2	131	6	52.087	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
70/GDI_ARATH/ SwissProt	^b Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor At5g09550 (Rab GDP dissociation inhibitor alpha-like)	1/1	70	5	49.974	<i>Arabidopsis thaliana</i>
71/ENO_ORYSJ/ SwissProt	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Enolase)	4/0	259	12	48.285	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
72/KXG22883.1/ NCBIprot	Hypothetical protein (Nucleoside-triphosphatase; Apyrase – UniProtKB)	2/2	112	6	48.195	<i>Sorghum bicolor</i>
73/IF4A_MAIZE/ SwissProt	Eukaryotic initiation factor 4A	2/1	114	9	46.849	<i>Zea mays</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
74/OEL34186.1/NCBIprot	Transaldolase	3/1	193	10	46.320	<i>Dichantheium oligosanthos</i>
75/EMT04083.1/NCBIprot	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic	1/1	60	4	46.306	<i>Aegilops tauschii</i>
76/ICDHC_ARATH/SwissProt	Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP]	1/1	89	4	46.059	<i>Arabidopsis thaliana</i>
77/AQK40926.1/NCBIprot	Obg-like ATPase 1	1/1	69	4	46.058	<i>Zea mays</i>
78/OEL32119.1/NCBIprot	3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase	1/1	67	2	46.047	<i>Dichantheium oligosanthos</i>
79/NP_001151172.1/NCBIprot	^b 10-deacetylbaecatin III 10-O-acetyltransferase (10-DBAT)	1/1	50	5	45.911	<i>Zea mays</i>
80/XP_008665881.1/NCBIprot	^b Predicted: uncharacterized protein (Topless-related protein – UniProtKB)	1/1	51	3	45.605	<i>Zea mays</i>
81/XP_002447121.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Aminomethyltransferase - UniProtKB)	2/2	121	7	44.388	<i>Sorghum bicolor</i>
82/OPR7_ORYSJ/SwissProt	12-oxophytodienoate reductase	1/1	64	2	43.878	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
83/OEL37569.1/NCBIprot	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic, partial	2/1	111	5	43.488	<i>Dichantheium oligosanthos</i>
84/ONM15574.1/NCBIprot	Isopropylmalate dehydrogenase 2	1/1	64	3	43.132	<i>Zea mays</i>
85/NP_001150259.1 /NCBIprot	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	1/1	67	3	43.002	<i>Zea mays</i>
86/ONM20737.1/NCBIprot	^b Polyadenylate-binding protein 2, partial	1/1	64	4	42.897	<i>Zea mays</i>
87/KMZ65420.1 /NCBIprot	V-type proton ATPase subunit C	1/1	63	4	42.641	<i>Zostera marina</i>
88/NP_001142404.1/NCBIprot	Phosphoglycerate kinase	4/4	284	16	42.470	<i>Zea mays</i>
89/KHG03650.1/NCBIprot	^b Putative fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic	1/1	92	3	41.943	<i>Gossypium arboreum</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
90 /KXG39210.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Acetyl-CoA acyltransferase - UniProtKB)	2/2	132	6	41.564	<i>Sorghum bicolor</i>
91 /OEL24402.1/NCBIprot	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase-like protein 5, partial	1/1	54	3	41.366	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
92 /AGI97002.1/NCBIprot	Cysteine synthase	1/1	50	3	41.361	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>
93 /XP_002466246.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Imidazolonepropionase - UniProtKB)	2/2	135	6	40.544	<i>Sorghum bicolor</i>
94 /ONM22945.1/NCBIprot	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein	1/1	66	4	39.908	<i>Zea mays</i>
95 /COMT1_SACOF/SwissProt	Caffeic acid 3-O-methyltransferase;	3/3	126	8	39.838	<i>Saccharum officinarum</i>
96 /XP_002465329.1/NCBIprot	Hypothetical protein (Ricin B-like lecithin R40G2 – UniProtKB)	1/1	79	5	39.718	<i>Sorghum bicolor</i>
97 /ONM13950.1 /NCBIprot	^b Adenosylmethionine aminotransferase 1	1/1	63	3	39.635	<i>Zea mays</i>
98 /AAW21273.1/NCBIprot	^b Glutamine synthetase	3/2	166	14	39.387	<i>Saccharum Officinarum</i>
99 /ALF_MAIZE/SwissProt	Aldolase C (Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic)	3/2	216	13	39.036	<i>Zea mays</i>
100 /XP_004960754/NCBIprot	Predicted: 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	1/1	55	3	38.880	<i>Setaria italica</i>
101 /ACG36544.1/NCBIprot	Legumin-like protein (Glutelin type-A1)	2/0	125	8	38.077	<i>Zea mays</i>
102 /EMS53569.1/NCBIprot	Adenosine kinase 2	3/1	178	12	37.680	<i>Triticum urartu</i>
103 /OEL25000.1/NCBIprot	Ribokinase	2/2	118	6	37.603	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
104 /OEL22313.1/NCBIprot	Peroxidase	3/3	149	13	36.793	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
105 /NP_001136800.1/NCBIprot	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A (Receptor for activated C kinase 1A)	5/1	313	13	36.670	<i>Zea mays</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
106 /KXG20851.1/ NCBIprot	Hypothetical protein (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – UniProtKB)	3/3	226	16	36.618	<i>Sorghum bicolor</i>
107 /AEA11483.1/ NCBIprot	Beta-1,3-glucanase (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, basic vacuolar isoform)	1/1	143	10	35.987	<i>Zea mays</i>
108 /MDHC_BETVU/ SwissProt	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2/1	155	10	35.810	<i>Beta vulgaris</i>
109 /NP_001142100.1/ NCBIprot	Malate dehydrogenase, mitochondrial	4/2	344	26	35.492	<i>Zea mays</i>
110 /NP_001130539.1/ NCBIprot	Late embryogenesis abundant protein group 2	2/2	127	7	35.309	<i>Zea mays</i>
111 /AQL07637.1/ NCBIprot	^b UDP-glucuronic acid decarboxylase	1/1	49	3	35.007	<i>Zea mays</i>
112 /SPDE_COFAR /SwissProt	Spermidine synthase	1/1	53	4	34.878	<i>Coffea arabica</i>
113 /APF31922.1/ NCBIprot	Putative fructokinase 1	3/2	225	13	34.865	<i>Saccharum spontaneum</i>
114 /XP_015612215.1/ NCBIprot	^b Predicted: nitrile-specifier protein 5	1/1	53	3	34.746	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
115 /XP_020108004.1/ NCBIprot	^b Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	1/1	50	7	34.672	<i>Ananas comosus</i>
116 /AQK39735.1/ NCBIprot	Putative oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	1/1	77	6	34.649	<i>Zea mays</i>
117 /ONM12595.1/ NCBIprot	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A	1/1	52	3	34.543	<i>Zea mays</i>
118 /NP_001144369.1/ NCBIprot	^b Uncharacterized protein (2,3-dimethylmalate lyase-like - UniProtKB)	2/2	128	9	33.588	<i>Zea mays</i>
119 /ACG31861.1/ NCBIprot	Succinyl-CoA ligase alpha-chain 2	1/1	70	6	33.517	<i>Zea mays</i>
120 /AHF18211.1/ NCBIprot	Glyoxylase 1(Lactoylglutathione lyase)	1/1	59	4	33.005	<i>Sccharum hybrid cultivar</i>
121 /IFRH_MAIZE/ SwissProt	Isoflavone reductase homolog IRL	1/1	54	3	32.831	<i>Zea mays</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/unique	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
122/AQK46679.1/NCBIprot	^b Cysteine protease 1	1/1	64	5	32.811	<i>Zea mays</i>
123/KDSA_PEA/SwissProt	^b 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	1/1	58	4	32.045	<i>Pisum sativum</i>
124/OEL27074.1/NCBIprot	60S acidic ribosomal protein P0	2/2	98	15	31.928	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
125/ABR25574.1/NCBIprot	Tubulin alpha-3 chain, partial	2/1	116	12	31.592	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
126/AQL00963.1/NCBIprot	^b Putative carboxylesterase 2 (gibberellin receptor GID1L2)	1/1	51	3	31.561	<i>Zea mays</i>
127/EMT30183.1/NCBIprot	^b Putative oxidoreductase GLYR1(Succinic semialdehyde/glyoxylate reductase)	1/1	49	7	31.284	<i>Aegilops tauschii</i>
128/XP_020197734.1/NCBIprot	^b Stem 28 kDa glycoprotein-like	1/1	54	5	30.561	<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i>
129/AQL04115.1/NCBIprot	Elongation factor 1-gamma 3	1/1	68	7	29.369	<i>Zea mays</i>
130/XP_015901239.1/NCBIprot	Predicted: Pectinesterase 3, partial	1/1	52	3	29.318	<i>Ziziphus jujuba</i>
131/XP_002465318.1/NCBIprot	^b Hypothetical protein (Hydroxyacylglutathione hydrolase, putative, expressed; Glyoxalase II – UniProtKB)	1/1	54	4	29.012	<i>Sorghum bicolor</i>
132/AAP48904.1/NCBIprot	^b 14-3-3-like protein	1/1	50	11	28.978	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar <i>CP65-357</i>
133/ACN33806.1/NCBIprot	^b Unknown (6-phosphogluconolactonase – UniProtKB)	1/1	65	6	28.956	<i>Zea mays</i>
134/AQL04284.1 /NCBIprot	^b Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	1/1	53	4	28.752	<i>Zea mays</i>
135/PMM_ORYSI/SwissProt	^b Phosphomannomutase	1/1	55	7	28.403	<i>Oryza sativa Indica Group</i>
136/EES06920.2/NCBIprot	^b Hypothetical protein (2-cys peroxiredoxin BAS1 – UniProtKB)	1/1	49	5	28.236	<i>Sorghum bicolor</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/único	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
137/AGO97076.1/NCBIprot	Ascorbate peroxidase	3/1	213	19	27.556	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28
138/XP_020184931.1/NCBIprot	Stress-response A/B barrel domain-containing protein DABB1-like	1/1	71	4	27.325	<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i>
139/ALP06207.1/NCBIprot	Triosephosphate isomerase	4/4	254	26	27.181	<i>Saccharum officinaum</i>
140/AGT17219.1/NCBIprot	Proteasome alpha subunit D2 (Proteasome alpha-type)	1/1	96	5	27.087	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570
141/EXPA1_ARATH/SwissProt	^b Expansin-A1	1/1	51	3	26.957	<i>Arabidopsis thaliana</i>
142/XP_008652895.1/NCBIprot	Predicted: Proteasome subunit beta type-1	3/2	217	19	26.502	<i>Zea mays</i>
143/AOC_ORYSI/SwissProt	^b Allene oxide cyclase, chloroplastic	1/1	57	3	26.206	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
144/NP_001148765.1/NCBIprot	^b Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase	1/1	83	7	25.930	<i>Zea mays</i>
145/ONM05978.1/NCBIprot	Aspartic proteinase A1	3/3	204	20	25.606	<i>Zea mays</i>
146/ACT53877.1/NCBIprot	^b Superoxide dismutase [Mn]	3/3	180	14	25.327	<i>Saccharum officinarum</i>
147/JAU71746.1/NCBIprot	ATP-citrate synthase beta chain protein 1	1/1	59	5	25.076	<i>Noctua caerulea</i>
148/GSTF1_MAIZE/SwissProt	Glutathione S-transferase 1	1/1	54	9	24.034	<i>Zea mays</i>
149/CFIS2_ARATH/SwissProt	^b Pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 2	1/1	77	7	23.043	<i>Arabidopsis thaliana</i>
150/XP_018721988.1/NCBIprot	Predicted: Aspartate--tRNA ligase 2, cytoplasmic-like (Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic)	1/1	64	6	22.889	<i>Eucalyptus grandis</i>
151/XP_006644813.1/NCBIprot	Predicted: NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like (Flavoprotein wrbA)	2/1	136	17	21.702	<i>Oryza brachyantha</i>
152/EMT08544.1/NCBIprot	Ras-related protein ARA-3	2/1	132	13	21.365	<i>Aegilops tauschii</i>

Tabela 8, Cont.

Nº/Acesso ou ID das proteínas/Banco de dados	Descrição	Nº de match/único	Mascot Score	Cobertura da sequência da proteína (%)	Massa Monoisotópica (Mr) (Da)	Espécie
153 /OEL13196.1/ NCBIprot	^b Cyclic phosphodiesterase	1/1	52	6	21.039	<i>Dichantheium oligosanthes</i>
154 /ARF_MAIZE/ SwissProt	^b ADP-ribosylation factor	1/1	65	7	20.705	<i>Zea mays</i>
155 /KQL13994.1/ NCBIprot	^b Hypothetical protein (DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56 – UniProtKB)	1/1	84	12	20.625	<i>Setaria italica</i>
156 /AID15806.1/ NCBIprot	Beta-tubulin, partial	1/1	55	5	19.345	<i>Hypericum perforatum</i>
157 /AQK53244.1/ NCBIprot	60S ribosomal protein L6	1/1	57	8	18.857	<i>Zea mays</i>
158 /AGT16090.1/ NCBIprot	Cyclophilin (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)	2/1	132	16	18.160	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
159 /AGT16537.1/ NCBIprot	60S ribosomal protein L12	2/1	116	14	17.807	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
160 /AHX42566.1/ NCBIprot	^b Translation initiation factor5A	1/1	58	7	17.671	<i>Saccharum hybrid cultivar ROC22</i>
161 /ACG31943.1/ NCBIprot	^b Hypothetical protein – Peptídeo: STGFVWLR (DUF538 family protein -UniProtKB)	1/1	55	4	17.568	<i>Zea mays</i>
162 /XP_002446634.1/ NCBIprot	^b Hypothetical protein (Major latex protein – UniProtKB)	1/1	52	10	17.385	<i>Sorghum bicolor</i>
163 /ABA41463.1/ NCBIprot	^b Chitinase, partial (Endochitinase)	1/1	54	10	16.919	<i>Sorghum halepense</i>
164 /EMT30334.1/ NCBIprot	Thioredoxin reductase (Peroxisomal antioxidant enzyme)	1/1	72	20	9.219	<i>Zea mays</i>

^b – Proteínas encontradas apenas na quarta soca

1.4 Proteoma diferencial da cana-planta e quarta soca

As 71 proteínas detectáveis apenas na cana-planta, apresentam as mais diversas funções nos processos biológicos, sendo que muitas dessas proteínas (e sequências polipeptídicas) são componentes estruturais e funcionais de estruturas importantes para a sobrevivência das células da gema axilar.

Destaca-se entre essas sequências polipeptídicas, maior diversidade de componentes ribossomais detectáveis pela espectrometria de massas na cana-planta (proteínas **96, 138, 140, 148, 156, 159, 166, 167, 168, 177, 179, 180, 182**) em relação a quarta soca (proteínas **124, 157, 159**), indicando uma maior atividade traducional. Ferreyra et al. (2010) encontraram superexpressão da proteína ribossomal L10 em milho submetido a estresse por radiação Ultravioleta-B (que é a proteína **167** encontrada na cana-planta), indicando papel importante dessa proteína em rotas de defesa para esse tipo de estresse abiótico. O estudo de Lindström (2009) demonstrou um repertório funcional mais amplo para as proteínas ribossomais como ativação de proteínas reguladoras, respostas a estresses, entre outros.

Além das subunidades ribossomais, proteínas sinalizadoras/transportadoras (RAS, GTP-binding, RAN, NAC e Importin) foram detectadas em menor número na quarta soca (proteína **152**) em relação a cana planta (proteínas **59, 164, 171, 172, 173**). Essa atividade traducional é evidentemente reduzida no decorrer dos cortes, ao ponto de muitas subunidades ribossômicas e proteínas sinalizadoras/transportadora não serem detectáveis na quarta soca, refletindo assim inclusive na menor quantidade de proteínas totais identificadas na respectiva idade de corte.

Algumas das proteínas identificadas diferencialmente entre os cortes destacam-se por terem papel importante em processos de resistência e adaptação a estresses bióticos e abióticos, regulação da expressão gênica, entre outros processos biológicos. Estas proteínas e suas principais funções estão na Tabela 9 (cana-planta) e Tabela 10 (quarta soca). As funções e processos biológicos que consta nas referidas tabelas foram obtidas das anotações do banco de dados UniProtKB.

Tabela 9 - Funções de proteínas diferentemente expressas na cana-planta com participação na resposta a estresses e desenvolvimento da gema

Nº/Nome	Função/Processos biológicos (GO)	Localização subcelular/Componente celular
11/ Endoplasmic reticulum chaperone protein (Protein SHEPHERD)	Dobramento e secreção de proteínas, regulação do crescimento de meristemas, regulação da organização estrutural de meristemas, resposta a íons cádmio, resposta ao frio, resposta ao estresse do retículo endoplasmático, resposta ao estresse salino e resposta a privação de água	Lumen do retículo endoplasmático, apoplasto, cloroplasto, retículo endoplasmático, membranas, mitocôndria núcleo plasmodesma, vacúolo
15/ TUDOR-SN protein 1 (Ribonuclease TUDOR 1-like)	Silenciamento de genes por RNA, adaptação a estresses	Citoplasma e complexo RISC
38/ Dihydroxy-acid dehydratase chloroplastic	Processo de biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada, desenvolvimento do saco embrionário, processo de biossíntese de isoleucina, desenvolvimento do pólen, resposta ao estresse salino, desenvolvimento de raiz e processo de biossíntese de valina	Cloroplasto e plastídios
45/ Calcium-dependent protein kinase (OsCDPK)	Via de sinalização ativada por ácido abscísico, transdução de sinal intracelular, Fosforilação de peptidil-serina, autofosforilação de proteínas, fosforilação proteica	Núcleo e peroxissomos
59/ Importin subunit alpha	Transporte de proteínas marcadas com sinal de localização nuclear (NLS) ao interior do núcleo e processo viral	Citosol, poro nuclear, nucleoplasma, região perinuclear do citoplasma
72/ 26S proteasome regulatory subunit 4 -like protein A, partial	Resposta imune inata, formação de raiz lateral, morfogênese da folha, manutenção da identidade do meristema radicular, crescimento do meristema, organização estrutural do meristema, regulação positiva da montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição de RNA polimerase II, montagem de proteassoma, regulação do silenciamento gênico, resposta ao íon cádmio, resposta ao calor, resposta à proteína “misfolded”, desenvolvimento de limite de raiz, desenvolvimento e morfogênese de raiz, desenvolvimento de plântulas, desenvolvimento de gemas e via ERAD ubiquitina-dependente	Complexo proteossômico, citoplasmático, membrana, complexo proteossômico nuclear, núcleo
82/ Peptide chain release factor eRF1/aRF1	Regulação do crescimento e término da tradução	Citoplasma
86/ 26S protease regulatory subunit 8	Regulação positiva da montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição de RNA polimerase II, desenvolvimento de gemas e via ERAD ubiquitina-dependente	Complexo proteossômico citoplasmático, membrana, complexo proteossômico nuclear, núcleo, complexos proteossômicos, membrana plasmática

Tabela 9, Cont.

Nº/Nome	Função/Processos biológicos (GO)	Localização subcelular/Componente celular
93/ 26S protease regulatory subunit 6B homolog	Regulação positiva da montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição de RNA polimerase II, desenvolvimento de gemas, via ERAD ubiquitina-dependente	Complexo proteossomico citoplasmático, membrana, complexo proteossomico nuclear, núcleo, complexos proteossomicos, membrana plasmática
94/ 26S protease regulatory subunit 10B homolog A	Regulação positiva da montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição de RNA polimerase II, desenvolvimento de gemas, via ERAD ubiquitina-dependente	Complexo proteossomico citoplasmático, membrana, complexo proteossomico nuclear, núcleo, complexos proteossomicos, membrana plasmática
105/ Chalcone synthase	Transporte polar de auxina, biossíntese de flavonoides, Regulação do processo de biossíntese de antocianinas, resposta a auxina, resposta a gravidade, resposta ao ácido jasmônico, resposta ao estresse oxidativo, resposta a UV-B e resposta a fermento	Reticulo endoplasmático, núcleo, membrana vacuolar
112/ Alcohol dehydrogenase	Processos fermentativos e oxireductase	Citoplasma
125/ L-lactate dehydrogenase	Resposta a estresse e metabolismo de carboidrato	Citoplasma
175/ Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	Transporte de proteínas e resposta a estresse salino	Citosol, ribossomos citosolicos, aparato golgiense, plasmodesma
176/ Germin-like protein 8-14	Resposta ao frio e resposta a citocinina	Apoplasto, parede celular, matriz extracelular e núcleo

Tabela 10– Funções de proteínas diferentemente expressas na quarta soca com participação na resposta a estresses e desenvolvimento da gema

Nº/Nome	Função/Processos biológicos (GO)	Localização subcelular/Componente celular
5/ Heat shock protein 101 (Hsp101; Chaperone protein ClpB1)	Resposta celular ao calor e processo metabólico de proteínas	Citoplasma e núcleo
21/ Luminal-binding protein (Heat shock 70 kDa protein BIP1)	Resposta a diversos tipos de estresses	Lúmen do retículo endoplasmático
33/ Pyruvate decarboxylase	Resposta a anoxia, resposta a estresse e processo fermentativo	Citosol e membranas
46/ Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	Processo metabólico do aldeído, resposta ao ácido abscísico, resposta à dessecação, resposta ao estresse salino	Mitocondria
56/ Betaine-aldehyde dehydrogenase 2	Processo de oxirredução, resposta ao ácido abscísico, resposta a dessecação e resposta a anóxia	Mitocondria e peroxissomos
64/ Cytochrome P450 CYP74A19	Reações de monoxigenação no metabolismo primário e secundário de plantas, participação em mecanismos de defesa químico e a estresses	Retículo endoplasmático e mitocôndrias
65/ Aldehyde dehydrogenase, conserved site containing protein	Processo metabólico do aldeído, resposta ao ácido abscísico, resposta à dessecação e resposta ao estresse salino	Citoplasma, retículo endoplasmático, aparato golgiense, membranas, plasmodesma, plastídios, vacúolo
80/ Topless-related protein	Especificação do meristema apical primário, regulação da transcrição (repressor), via de sinalização mediado por ácido jasmônico e resposta a auxina	Citosol e núcleo
127/ Putative oxidoreductase GLYR1 (Succinic semialdehyde/glyoxylate reductase)	Resposta a estresse oxidativo e oxirredutases	Citosol
132/ 14-3-3-like protein	Resposta a estresse, resposta celular a falta de nitrogênio, fósforo e potássio, aclimatação ao frio, via de sinalização ativada por etileno, regulação de processos metabólicos, resposta ao frio e resposta ao congelamento	Núcleo, membrana plasmática, plasmodesma, vacúolo, aparato golgiense, citosol, cloroplasto, parede celular
134/ Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Repressão da transcrição e outras diversas funções	Membrana plasmática
143/ Allene oxide cyclase, chloroplastic	Biossíntese do ácido jasmônico	Cloroplasto
163/ Chitinase, partial (endochitinase)	Catabolismo de macromoléculas da parede celular, catabolismo da quitina, senescência foliar, resposta de defesa e resposta a ABA, jasmonato e etileno	Apoplasto e parede celular

Das setenta e uma proteínas diferentemente expressas na cana-planta, quinze se destacam pela participação em eventos de defesa a estresses, regulação da expressão gênica, desenvolvimento de meristemas, entre outros (Tabela 9), e dessas, cinco estão diretamente relacionadas com resposta ao estresse salino (proteínas **11**, **15**, **38**, **45** e **175**). Os estresses abióticos prejudicam consideravelmente o desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar (Patade, 2008), devido a uma série de modificações morfológicas, metabólicas e moleculares e que, segundo Li et al. (2016), são responsáveis por queda de mais de 50% no rendimento agrícola em todo mundo. Apesar da cultivar RB867515 ter boa tolerância a seca (RIDESA, 2010), a cana-de-açúcar é considerada de forma geral como uma espécie vulnerável a estresses abióticos, especialmente estresses salino, hídrico e baixas temperaturas (Inman-Bamber e Smith, 2005; Li et al., 2016). A planta desenvolve uma série de mecanismos para se adaptar aos estresses osmótico e iônico causado pela alta concentração de sal, podendo destacar o acúmulo de solutos compatíveis, como a glicina betaína, prolina e polióis (Yeo, 1998; Patade, 2008).

A proteína **11** (endoplasmim homolog) conhecida como proteína SHEPHERD, é um tipo especial de *Heat Shock Protein* 90 kDa (HSP90.7) que como as outras chaperonas moleculares, dobram as proteínas em sua conformação funcional. Por outro lado, a proteína SHEPHERD desempenha um papel fundamental em redes de transdução de sinais, comunicação entre as células, controle do ciclo celular, crescimento celular e apoptose (Song et al., 2009). Song et al. (2009) em estudos com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, identificaram um aumento de expressão de genes correspondentes as proteínas HSP90.2; HSP90.5 e HSP90.7, quando essas eram submetidas a estresse salino com Ca^{2+} e comparadas a plantas selvagens, constatando que HSPs90 são críticas para a resposta e/ou tolerância a estresses celulares em plantas. Além do estresse salino, outro estudo (Ishiguro et al., 2002) demonstrou que a proteína SHEPHERD é necessária para o dobramento, formação e funcionamento do complexo de proteínas Clavata (proteínas sinalizadoras), fundamental para a progressão do desenvolvimento do meristema de *Arabidopsis thaliana*.

A proteína **15** (TUDOR-SN) se destaca das demais por ser uma proteína argonauta, ou seja, faz parte do Complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) que é um complexo ribonucleico composto por proteínas associadas com pequenas moléculas de siRNA ou miRNA (Tang, 2005; Griffiths et al., 2006; Meister, 2013). A proteína TUDOR-SN possui atividade de nuclease específica atuando sobre a estabilidade de mRNA, regulando a expressão gênica. Já foi demonstrado que o metabolismo de RNA é afetado de diferentes

formas para a adaptação às mudanças climáticas nos mais diversos organismos eucariotos (Jarillo et al., 1993; Zhang et al., 2008; Lorkovic, 2009; Kawa e Testerink, 2017). Em cana-de-açúcar, Ortiz-Morea et al. (2013) estudaram o papel dos *small* RNAs em gemas axilares ativas e dormentes/inativas de cana-de-açúcar, e observaram um acúmulo de miRNAs tanto nas gemas ativas quanto inativas, destacando a família de miRNA159 que responderia ao fitormônio ABA (ácido abscísico) determinando o desenvolvimento das gemas ou sua dormência. Esse estudo de Ortiz-Morea et al. (2013) foi realizado com a espécie *Saccharum officinarum* provavelmente sem cortes comerciais, entretanto os resultados deste trabalho são consistentes com a presença de proteínas TUDOR-SN nas gemas axilares da cultivar RB867515 em nosso estudo. Por outro lado, a ausência de proteínas TUDOR-SN nas gemas axilares da quarta soca do plantio comercial ainda deve ser melhor estudada.

Frey et al. (2010) e Yan et al. (2014) utilizaram mutantes de *Arabidopsis thaliana* para estudar o papel da TUDOR-SN na resposta e tolerância a estresses, principalmente no estresse salino. Frey et al. (2010) encontraram uma considerável redução na sobrevivência e crescimento de plantas transgênicas mutantes que não expressavam a proteína TUDOR-SN, entretanto em exemplares selvagens a proteína é acumulada no citoplasma e difusamente distribuída diante de estresse salino, evidenciando que as proteínas TUDOR-SN são essenciais para a tolerância a estresses abióticos em plantas. Yan et al. (2014) demonstraram que a proteína TUDOR-SR regula níveis de mRNA de GA20ox3, uma enzima chave na síntese de giberelinas (GA), sendo a TUDOR-SN um componente dos *stress granules* (SGs) que regulam o crescimento sob estresses, através da modulação do referido mRNA.

A proteína **38** (Dihydroxy-acid dehydratase - DHAD) participa da via Biosintética dos BCAAs (aminoácidos de cadeia ramificada) e está presente nos mais diversos tecidos vegetativos e reprodutivos das plantas. Zhang et al. (2015) em estudos com *A. thaliana* descobriram que a supressão dos genes responsáveis pela expressão de proteínas DHAD, reduzia consideravelmente a concentração de BCAA em raízes consequentemente produzindo fenótipos mais curtos. Além disso, os mutantes sem a síntese de DHAD se tornaram hipersensíveis ao estresse salino, dessa forma os autores sugeriram que os BCAA podem agir como osmólitos na tolerância ao sal.

As proteínas **45** (Calcium-dependent protein kinase – CDPK), **59** (α -Importin) e a proteína **175** (Nascente polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein- NAC) atuam em conjunto na resposta a estresses abióticos. Muitos dos estresses abióticos e até mesmo os bióticos, podem ser sinalizados através do aumento de Ca^{2+} intracelular que integra

a cadeia de transdução de sinais dependente de Ca^{2+} (Kudla et al., 2010; Vivek et al., 2016). Os íons Ca^{2+} são reconhecidos nas plantas por sensores do tipo CDPK (Deinlein et al., 2014) que regulam a expressão gênica ligada a vários processos celulares como resposta a estresses, dinâmica do citoesqueleto, crescimento e desenvolvimento. Em estudos com o gengibre (*Zingiber officinale*), Vivek et al. (2016) observaram a interação entre CDPK e α -Importin, sendo esta uma proteína de transporte, que reconhece o Sinal de Localização Nuclear (NLS) na proteína CDPK e a transporta para o interior do núcleo. Além disso, os pesquisadores identificaram que a interação entre proteínas CDPK, α -Importin e NAC, merece destaque na resposta a estresses nesta espécie. As CDPKs atuam também na defesa da planta, sinalizando e gerando reações metabólicas, como a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), alteração na expressão gênica e alterações na síntese de fitormônios e até mesmo sinalizando para a morte celular (Tena et al. 2011; Schulz et al., 2013).

Na resposta adaptativa das plantas aos mais diversos tipos de estresses, uma série de compostos altamente reativos e tóxicos à planta são produzidos, como os já citados ROS, álcoois, aldeídos, entre outros. Para evitar os danos causados por esses e outros compostos, a planta produz uma série de enzimas que atuam no estresse oxidativo, em condições de alta incidência de raios Ultravioleta – U.V. e em condições de anóxia e hipóxia. Na cana-planta as proteínas **105**, **112** e **125** estão relacionadas a esses tipos de estresses, atuando na defesa e na produção de energia para a sobrevivência da gema axilar juntamente com diversas outras proteínas (peroxidases, HSPs, catalase, ascorbato peroxidase, entre outras) detectadas em ambos os cortes.

A proteína **105** (Chalcone synthase - CHS) presente na cana-planta, é a enzima chave na via biosintética de flavonóides. Os flavonóides atuam nas mais diversas funções biológicas, destacando-se na defesa da planta contra ROS (Agati et al., 2007; Fini et al., 2011), raios UV (Hahlbrock e Scheel, 1989; Li et al, 1993; Dao et al., 2011) e estresse salino (Lijuan et al., 2015). A CHS também tem papel importante na defesa da planta após ferimentos ou sob ataque de patógenos e insetos (Richard et al., 2000; Ellis e Turner, 2002) e sua síntese é estimulada pelo ferimento e por influência de metil jasmonato, através de uma rede de resposta de defesa da planta. Brown et al. (2001) em estudos com *Arabidopsis thaliana*, mutantes para o gene da Chalcone synthase, observaram que a falta da CHS proporcionara efeitos fenotípicos característicos de inibidores do transporte de auxina, como redução no tamanho da planta, aumento no desenvolvimento de raízes secundárias e redução no diâmetro do caule. Apesar de poucas pesquisas sobre efeito da supressão da síntese de

CHS em cana-de-açúcar, sua ausência na quarta soca, pode significar uma menor produção de flavonoides afetando as respostas de defesa para o predadorismo, fermentos, redução da resposta a raios UV, danos causados por íons superóxidos, e até mesmo proporcionar alterações fenotípicas que comprometam a produtividade do canavial em cortes mais tardios.

As proteínas **112** (Alcohol dehydrogenase – ADH) e **125** (L-Lactate dehydrogenase – LDH) são requeridas principalmente em condições de baixa oxigenação dos tecidos, ativando assim vias fermentativas para obtenção de energia pelas células (Good e Crosby, 1989; Drew 1997; Dennis et al., 2000, Kerbauy et al., 2004). A enzima LDH catalisa a formação do lactato, entretanto a produção de L-lactato é considerada uma produção transitória que precede uma produção mais sustentada de etanol catalisada pela ADH no processo fermentativo (Dolferus et al., 1997; Mithran et al., 2014). É relevante e inesperada a presença dessas duas enzimas na cana-planta, e a ausência de ambas na quarta soca, visto que era esperado relação inversa nos cortes, pois com o decorrer dos cortes nas safras de cana-de-açúcar, a colheita mecanizada acaba compactando o solo (Severiano et al., 2010; Vischi-Filho, et al., 2015) provocando uma redução de oxigênio disponível (Xu et al. 1992) para as raízes e gemas axilares. Em contrapartida a enzima Pyruvate descarboxylase- PDC (proteína **33** da quarta soca) foi detectada apenas na quarta soca, sendo esta enzima em conjunto com a ADH, requerida nos processos fermentativos. A não detecção da PDC na cana-planta não significa que os genes (*PDC1* e *PDC2*) referentes a proteína não estejam sendo expressas, mas que a quantidade de proteína não foi o suficiente para detecção.

Mithran et al. (2014) em seus estudos encontraram uma superexpressão dos genes para PDC em condições de anóxia e hapóxia em *Arabidopsis thaliana*. Dessa forma há indícios de que a quarta soca sofra efeitos da falta e/ou redução de oxigênio disponível para o desenvolvimento das gemas axilares e que o fato é agravado pela menor presença das enzimas LDH e ADH que auxiliariam momentaneamente nas condições citadas. A presença das proteínas LDH e ADH na cana-planta poderia ser questionada por ser uma idade de corte onde ainda não ocorre a influência da compactação do solo pela colheita mecanizada, entretanto a expressão de ADH e LDH pode também ser estimulada por outros estresses abióticos, como fermentos mecânicos, desidratação e estresse por frio (Jarillo et al., 1993; Dolferus et al., 1994; Dolferus et al, 2008; Maurino e Engqvist, 2015).

As proteínas **72** (26S proteasome regulatory subunit 4-like protein A, partial), **86** (26S proteasome regulatory subunit 8), **93** (26S proteasome regulatory subunit 6b homolog) e **94** (26S proteasome regularory subunit 10B homolog A) fazem parte da maior protease não-

lisossomal encontrada nas células eucariontes (Ferrel et al., 2000). O 26S proteossoma (26SP) promovem proteólises ubiquitina-dependente, assim proteínas marcadas com cadeias poliubiquitinas em resíduos de lisina na via da ubiquitina (Ferrel et al. 2000; Wolf et al., 2004) são degradadas no citosol e/ou no núcleo pelo 26SP. A via da ubiquitina tem papel central na regulação de processos celulares essenciais como processamento de antígenos, ciclo celular, transcrição e transdução de sinais (Hershko e Ciechanover, 1998; Ferrel et al., 2000). Proteínas danificadas ou com erros de síntese também são marcadas e degradadas por essa via.

Em estudos utilizando linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* para 26SP, Kurepa et al. (2009a) concluíram que a redução de 26SP resultaram no aumento da expansão celular combinado com a diminuição de divisões celulares em diversas estruturas como folhas, caules, flores, frutos, sementes e embriões, resultando em crescimento anormal. Várias condições de estresses abióticos podem inibir o funcionamento das 26SP, através do aumento da carga do substrato ou pela inativação direta do proteossoma.

Estresses como choque térmico pode produzir muitas proteínas não dobradas e sobrecarregar a 26SP, por outro lado, estresse oxidativo pode inibir diretamente a 26SP (Reinheckel et al., 1998; Kurepa et al., 2009b) provendo os efeitos negativos no desenvolvimento vegetal.

Outro núcleo proteossomático do mesmo complexo, denominado 20SP, é também utilizado pelas células para degradação de determinadas moléculas, sendo considerada ubiquitina-independente (Coux et al., 1996; Ben-Nissan e Sharon, 2014). Foi observado que nas plantas deve haver um nível ótimo na concentração de 26SP para manter respostas a determinados tipos de estresses, como o choque térmico, que produz proteínas não dobradas prejudiciais ao funcionamento celular. Por outro lado, para respostas a estresse oxidativo é necessário nível elevado de 20SP livre (Kurepa et al., 2008). A quantidade de 26SP e 20SP é inversamente proporcional nas células, e esta relação pode ser observado nos trabalhos de Kurepa et al. (2008), dessa forma uma redução na concentração de 26SP promove um aumento na quantidade de 20SP. Em ambos os cortes de cana-de-açúcar analisados no presente estudo foi identificado subunidades de 20SP (cana-planta: proteínas **158** e **164**; quarta soca: proteínas **140** e **142**). Na cana-planta foram detectados quatro subunidades de 26SP enquanto na quarta soca foi identificada apenas uma subunidade de 26SP. Isso pode indicar que as gemas axilares da quarta soca estiveram sobre estresse oxidativo, elevando a síntese de 20SP e reduzindo 26SP.

A proteína **82** (Peptide chain release factor eRF1/aRF1) junto com a proteínas eRF3 é denominada de fator de liberação, sendo responsável pelo término da tradução nos ribossomos, onde eRF1 promove a hidrólise do peptidil-tRNA dependente do códon de término, e o eRF3 interage com eRF1 estimulando sua atividade na presença de trifosfato de guanosina – GTP (Mikuni et al., 1994; Frolova et al., 1996). Petsch et al. (2005) estudaram os efeitos da co-supressão do fator de liberação eRF1 em *Arabidopsis thaliana*, e determinaram que a ausência dessas proteínas causava a redução na elongação dos entrenós, alterações nos padrões de lignificação em células do floema (células crivadas e cambio interfascicular), alterações na divisão celular de regiões de cambio fascicular apresentando células desorganizadas e com núcleos alargados.

A proteína **176** (Germin-Like protein 8-14 - GLP) é também conhecida como Oxalato oxidase e já foi identificada em diversas plantas (Zhou et al., 1998; Godfrey et al., 2007; Manosalva et al., 2009). As GLPs degradam oxalato ($C_2H_2O_4$) em CO_2 e H_2O_2 na presença de oxigênio e essas proteínas são utilizadas nos mais diversos processos de desenvolvimento nas plantas superiores. Em trigo as germins se associam a glucuronogalactoarabinoxylans (CGAX) para sua incorporação em paredes celulares em crescimento, assim como a geração de peróxido de hidrogênio estaria ligado à sua função de ligação cruzada de coumaratos, extensinas e ferulatos à hemicelulases e pectinas da parede celular (Patnaik e Khurana, 2001). As proteínas germin também podem estar relacionadas a respostas de defesa nas mais diversas plantas. Manosalva et al. (2009) realizaram estudos em QTLs (*loci* de características quantitativas) para genes *OsGLP*, responsáveis pelas sínteses de proteínas germin-like em arroz. Os pesquisadores observaram que quanto mais genes eram silenciados mais as plantas de arroz se tornaram suscetíveis a fungos patogênicos, sugerindo que as GLPs têm papel importante e de amplo espectro na defesa a patógenos em gramíneas. Wang et al. (2013), caracterizaram GLPs em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) através de estudos dos genes *AhGLPs* que atuam no desenvolvimento e na defesa da planta. As proteínas GLPs em amendoim são expressas nos mais diversos tecidos da planta e cada gene (*AhGLP3b*, *AhGLP5b* e *AhGLP7b*) respondendo a estresses bióticos como a infecção por *Aspergillus flavus*, manchas foliares, mosaico e ferrugem, estresses abióticos como sal, estresse oxidativo e ferimentos mecânicos, e estimulação hormonal em plantas (tratamentos com ácido salicílico e ácido abscísico) indicando sua importante participação na resposta da planta a estímulos bióticos e abióticos.

Treze proteínas se destacam das cinquenta e duas proteínas diferentemente expressas nas gemas axilares da quarta soca da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar (Tabela 10). Essas proteínas estão relacionadas com a resposta a estresses bióticos (patógenos, insetos, etc.), abióticos (estresse salino, oxidativo, hídrico, etc.), regulação da expressão gênica e outros processos de impacto no desenvolvimento das gemas axilares.

A proteína **5** (Heat Shock Protein 101 – HSP101) faz parte da família de chaperonas moleculares que atuam no dobramento de outras proteínas proporcionando a correta conformação e evitando agregados proteicos nocivos as células, atuando também em diversas outras funções (Fink, 1999; Borges et al., 2001), sendo sintetizadas principalmente em repostas a estresse térmico (Gurley, 2000; Borges et al., 2001; Cagliari et al., 2011) e em vários órgãos da planta, inclusive em gemas vegetativas, acompanhado do aumento da síntese de transcritos para a HSP101 (Yong et al., 2001). Evidências atuais demonstram que a HSP101 e algumas outras *small heat shock proteins* (sHSPs) agem protegendo proteínas que atuam como fatores de tradução durante o choque térmico (McLoughlin et al., 2016). Marret et al. (2017) em estudos com *Arabidopsis thaliana* propuseram que após o choque térmico, proteínas HSP101 são requeridas para a liberação eficiente de mRNAs de proteínas ribossomais dos grânulos de estresses (*stress granules-SGs*) proporcionando rápida restauração do complexo de tradução pela produção de novas proteínas ribossomais.

Algumas HSPs foram expressas em ambos os cortes de cana-de-açúcar, entretanto a HSP101 foi detectada apenas na quarta soca. Borges et al. (2001) analisaram as anotações feitas no programa SUCEST e encontraram que 1,8% de todos os 5' EST são homólogas a chaperonas moleculares, sendo dessas um total de 44% pertencentes a família HSP70 e suas co-chaperonas, 10% pertencentes a família HSP90 e 13% à peptidil *cis, trans* isomerase.

As chaperonas pertencentes a “HSP100 family” (inclusive a HSP101) atuam junto com o sistema HSP70 (Schirmer et al., 1996). Algumas proteínas da família HSP70 foram detectadas em ambos os cortes, entretanto a proteína **21** (Luminal-binding protein – BIP1) foi encontrado apenas na quarta soca. A proteína BIP1 (*Binding Immunoglobulin Protein*) são chaperonas HSP70 específicas do retículo endoplasmático que participam no dobramento e maturação de proteínas, sendo em plantas também envolvida na defesa contra vários estresses. Alvim et al. (2001) estudando plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiniana tabacum* L. cv Havana) para genes correspondentes a proteínas BIP, encontraram que a superexpressão de BIP em plantas pode prevenir danos causados por estresses oxidativo endógenos através de uma série de respostas fisiológicas características. A resposta a estresses baseadas em

proteínas BIP foram reportados também em outras plantas como no milho (Oliver et al., 1995), soja (Valente et al., 2009), arroz (Wakaza et al., 2011), e outras várias espécies vegetais.

As proteínas **46** (Mitochondrial aldehyde dehydrogenase), **56** (Betaine-aldehyde dehydrogenase 2) e **65** (Aldehyde dehydrogenase, conserved site containing protein) da quarta soca, são enzimas que atuam na metabolização de aldeídos e são superexpressadas quase que estritamente em condições de hipóxia e anóxia. Aldeídos são moléculas prejudiciais às células, devido a reatividade e sua tendência em formar adutos (ligações de alta afinidade) com proteínas e DNA (Tsuji et al., 2003; Sunkar et al., 2003). Os aldeídos são produzidos principalmente pela peroxidação de lipídios (em condições de estresse oxidativo) e pela degradação do piruvato pela piruvato descarboxilase (PDC). Em condições de baixa oxigenação a obtenção de energia pela planta ocorre quase que exclusivamente através de processos fermentativos.

A fermentação ocorre com a participação de algumas enzimas essenciais como a PDC, LDH e ADH. A enzima PDC produz acetaldeído que é utilizado pela ADH na formação de etanol (Wei et al., 2009). A quarta soca da cana-de-açúcar, analisada no presente estudo, não apresentou as enzimas LDH e ADH, apresentando apenas a PDC. Com a expressão de PDC e quantidades efêmeras de LDH e ADH pode ocorrer grande acúmulo de acetaldeído nas células das gemas axilares das plantas da quarta soca, promovendo a superexpressão das proteínas ALDH nesse corte. A enzima ALDH (proteínas **46** e **65**) catalisa a oxidação de aldeídos formando seus ácidos carboxílicos correspondentes e requer NAD ou NADP como cofator (Perozich et al., 1999; Sunkar et al., 2003). A síntese dessas proteínas (**46**, **56** e **65**) é consistente com as evidências de que as gemas axilares da quarta soca estão sobre efeito restritivo de oxigênio.

Sunkar et al. (2003) observaram que a superexpressão dos genes da ALDH em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* promovia a tolerância a estresses ambientais, através do incremento de mecanismos de detoxificação celular. Kirch et al. (2005) também estudando *Arabidopsis*, encontraram uma superexpressão de genes da ALDH controlada pelo ácido abscísico e por vias que afetam o metabolismo do açúcar e a composição de ácidos graxos das membranas lipídicas. Kotchoni et al. (2006) demonstraram que enzimas ALDH podem atuar não apenas como enzimas aldeído-oxidantes mas também como eliminadoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) e como enzimas inibidoras de peroxidação de lipídios, em reações de resposta a estresses abióticos. Nesse contexto, a proteína **56** da quarta soca é

um tipo especial de ALDH, sendo esta induzida em resposta ao estresse osmótico, catalisando a síntese do osmólito glicina betaína através do substrato betaína aldeído (Chen e Murata, 2002).

Muitas respostas locais ou sistêmicas a estresses bióticos e abióticos envolvem moléculas sinalizadoras conhecidas como Jasmonatos (JA), entre eles o ácido jasmônico e o metil jasmonato (Turner et al., 2002). As proteínas **64** (Cytochrome P450 CYP74A19 – AOS) e **143** (Allene oxide cyclase, chloroplastic – AOC) detectadas apenas na quarta soca, são moléculas chave na via de biossíntese do ácido jasmônico e metil jasmonato, como pode ser visto na Figura 23. Os jasmonatos são moléculas derivadas do metabolismo de ácidos graxos (Jalapour et al., 2014), amplamente distribuídos nas plantas e afetam grande variedade de processos, tais como maturação de frutos, produção de pólen viáveis, crescimento das raízes, respostas aos ferimentos das plantas, estresses bióticos e abióticos (Creelman e Mullet, 1997; Turner et al., 2002).

A via biosintética do ácido jasmônico foi descrita inicialmente por Vick e Zimmerman (1984) sendo amplamente estudada desde então em tomates e *Arabidopsis* (Ahmad et al., 2016). O ácido jasmônico e o metil jasmonato, são sintetizados a partir do ácido α -linoleico (α -LeA), presente nas membranas dos cloroplastos, sendo esses produzidos por fosfolipases. Através da adição de oxigênio a moléculas de α -LeA é formado o composto 13-hydroperoxy-9, 11, 15-octadecatrienoic acid (13-HPOT) sendo esta reação catalisada pela enzima lipoxigenase (LOX). O ácido 13-HPOT é oxidado a óxido de alleno pela enzima allene oxide synthase (AOS). O óxido de alleno é instável sendo então convertido a 12-oxo phytodienoic acid (12-OPDA) pela enzima allene oxide cyclase (AOC) (Ahmad et al., 2016). O 12-OPDA sofre 3 ciclos de β -oxidação nos peroxissomos produzindo assim o ácido jasmônico (Lu et al., 2014). A presença das enzimas da via biosintética do ácido jasmônico indica que a quarta soca da cana-de-açúcar esteve sobre influência de estresses bióticos e abióticos, incluindo ferimentos mecânicos, estresses hídrico, salino, osmótico, entre outros.

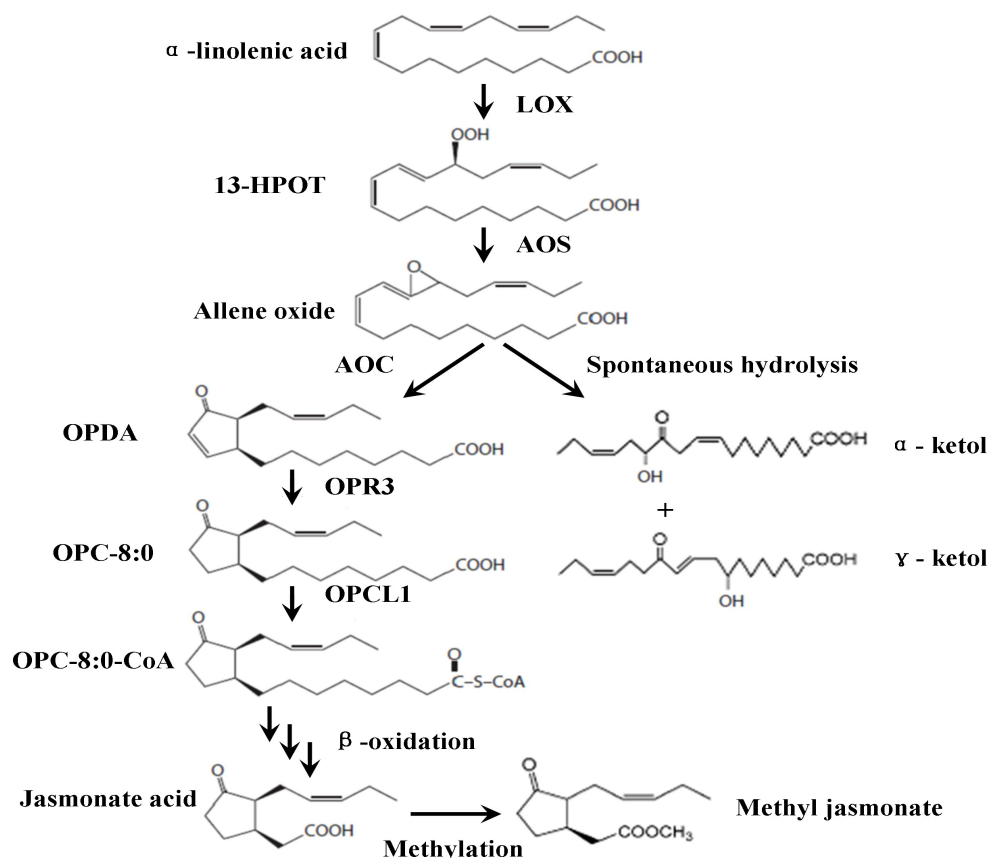


Figura 23 – Via biosintética do jasmonato em plantas (Lu et al., 2014). LOX, 13-lipoxygenase; AOS, allene oxide synthase; AOC, Allene oxide cyclase; OPR3, OPDA reductase 3; OPCL1, OPC-8:0 CoA ligase 1; 13-HPOT, 13-hydroperoxylinoleic acid; OPDA, (9S, 13S)-12-oxo-phytodienoic acid; OPC-8:0, 3-oxo-2(2'-[Z]-pentenyl)cyclopentane-1-octanoic acid; OPC-8:0-CoA, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl CoA.

O ácido jasmônico confere efeitos morfo-fisiológicos interessantes que podem contribuir com a queda da produtividade observada no decorrer dos cortes da cana-de-açúcar. Adams e Turner (2010) e Liu et al. (2010) demonstraram que o ácido jasmônico causa a inibição do crescimento de raízes em *Arabidopsis thaliana*, acompanhado da superexpressão de genes indutores de JA. Outra resposta fisiológica atribuída ao JA é a senescência (Ueda e Kato, 1980; Ahmad et al., 2016). Muitos estudos foram realizados evidenciando o aumento da biossíntese de JA e a regulação positiva de genes relacionados a senescência em *Arabidopsis thaliana*. Segundo van der Graff et al. (2006), a expressão de AOS e OPR3 na via biosintética do ácido jasmônico e o incremento do JA, são indicativos de senescência por jasmonatos.

Os jasmonatos podem ter papel também no controle da proliferação celular e na morte celular, fato esses, evidenciado em células cancerosas humanas (Ahmad et al., 2016). Efeitos positivos também podem estar relacionados ao JA. Sanches et al. (2017) observaram

que o JA induz a emissão de compostos voláteis atrativos para o parasitóide (*Cotesia flavipes*) da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e também com efeitos antixenóticos na cana-de-açúcar para a broca-da-cana e lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

As proteínas **80** (*Topless-related proteins* – TPR) e **134** (*Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein*) juntas atuam como co-repressores transcricionais e modulam vários processos biológicos nas células (Neer et al., 1994; Causier et al., 2012). Proteínas TPR interagem com fatores de transcrição específicos, muitas vezes envolvidos na repressão transcricional. Esses fatores de transcrição apresentam várias sequências de domínio de repressão curto (RD), sendo estes necessários para o recrutamento das TPRs (Causier et al., 2012). A repressão transcricional pelas proteínas TPR tem papel importante nos mais diversos processos biológicos através da interação com complexos de transcrição, atuando na destinação do meristema axilar (Gallavotti et al., 2010), resposta imune (Zhu et al., 2010) e transdução de sinal de auxina e jasmonatos (Pauwels et al., 2010).

Proteínas pertencentes a superfamília WD40 apresentam um domínio com unidades repetidas, geralmente terminadas com sequências Trp-Asp (WD) (Gachomo et al., 2014). Os domínios WD-repeat também são conhecidos como β -transducin repeat, WD-40 repeat ou GH-WD repeat; essas denominações surgiram dos primeiros estudos onde foram encontradas as WD-repeat em proteínas G (GTP-binding) que transduzia sinais através da membrana plasmática (Neer et al., 1994). Os domínios WD40 atuam como sítios de interação proteína-proteína ou como plataformas de multi-interação, dirigindo a montagem de complexos de proteínas ou como mediadores de interação transitória entre outras proteínas. Nesse contexto, muitos integrantes da superfamília WD40 atuam como reguladores chaves de eventos específicos em plantas, em funções biológicas importantes e na sinalização de estresses (Gachomo et al., 2014).

A proteína **127** (Putative oxidoreductase GLYR1) encontrada apenas na quarta soca, está presente no citosol das células e reduz o glioxilato a glicolato e o semialdeído succínico (SSA) a γ -hydroxybutyrate (Hoover et al., 2007). Conforme descrito previamente no presente estudo, plantas sob estresses bióticos e abióticos podem acumular aldeídos, como o glioxilato e semialdeído succínico; esses por sua vez podem reagir com o DNA, oxidar lipídios de membrana, modificar proteínas e até mesmo interferir na transcrição de genes relacionados a estresses, provocando problemas celulares e de desenvolvimento (Weber et al., 2004; Kotchoni et al., 2006; Allan et al., 2009). Allan et al. (2012) encontraram um aumento de transcritos para a GLYR1 em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetida a submersão e

descreveu a importância da enzima GLYR1 em processos de estresses oxidativo causado por situação de anóxia e hipóxia. A identificação de GLYR1 apenas na quarta soca (ausente na cana planta), é consistente com a proposta de que a compactação do solo dos talhões onde se encontrava as plantas fontes de gemas axilares, utilizadas no presente estudo, conferiu estresse oxidativo às gemas axilares.

A proteína **132** (14-3-3-like protein) encontrada apenas na quarta soca, pode estar envolvida em importantes vias de sinalização e processos fisiológicos em plantas (Denison et al., 2011). As proteínas 14-3-3s tem a propriedade de se ligar a outras proteínas regulando sua atividade, propriedade esta que a torna importante na regulação de complexos de vias de sinalização ambiental (Denison et al., 2011). Yan et al. (2004) encontraram uma superexpressão de 14-3-3 (proteína GF14 lambda) em algodão submetido a seca moderada, correlacionando a 14-3-3λ com a tolerância a estresse hídrico nessa espécie.

A tolerância a estresses ambientais pode estar relacionada com a regulação de canais iônicos (importantes para regulação de estômatos e outros eventos celulares), visto que canais H⁺ATPase já foram caracterizados como proteínas clientes das 14-3-3s, assim como diferentes canais de K⁺ (Denison et al., 2011). Além de estresses abióticos, as proteínas 14-3-3s podem estar envolvidas em diversos outros processos biológicos, como pode ser visto na Figura 24. Segundo Kuramae et al. (2001), as proteínas 14-3-3 foram expressas em quase todas as bibliotecas de cana-de-açúcar construídas a partir de cDNA obtidas de diversos órgãos e tecidos (meristemas, calos, flores, gemas, folhas, raízes, caules e sementes) e de plântulas infectadas pelas bactérias *Glucoacetobacter diazotrophicans* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Apesar de vários fatores influenciarem na maior expressão das proteínas 14-3-3, a presença dessa proteína apenas na quarta soca pode indicar sua superexpressão devido a incidência de estresses abióticos, principalmente estresse hídrico, o que reforça a tese de compactação do solo na quarta soca, restringindo a entrada de água nas regiões de absorção das raízes da cana-de-açúcar.

A proteína **163** (Chitinase- CHI) foi descrita pela primeira vez em 1911 por Bernard em bulbos de orquídeas como sendo um agente antifúngico termotolerante (Sharma et al., 2011); a partir de então foram detectadas quitinases em diversas espécies de plantas, fungos e outros organismos. A quitinase é uma proteína ubíqua com atividade de endoglicosil-hidrolases, hidrolisando quitina a N-acetyl glucosamine (Van Aalten et al., 2000). Sua atuação na resposta imune ocorre devido suas propriedades de degradar paredes celulares de fungos e componentes do exoesqueleto de insetos (Sharma et al., 2011). A expressão de quitinases é

aumentada em condições de estresses bióticos (fungos, bactérias, vírus, etc) e abióticos (etileno, ácido salicílico, UV, etc), atuando na resposta de defesa das plantas (Takenaka et al., 2009; Cletus et al., 2013). Sua detecção apenas na quarta soca é mais uma evidência de estresses bióticos e abióticos condicionada às gemas axilares da cana-de-açúcar, principalmente em idade de corte avançado.

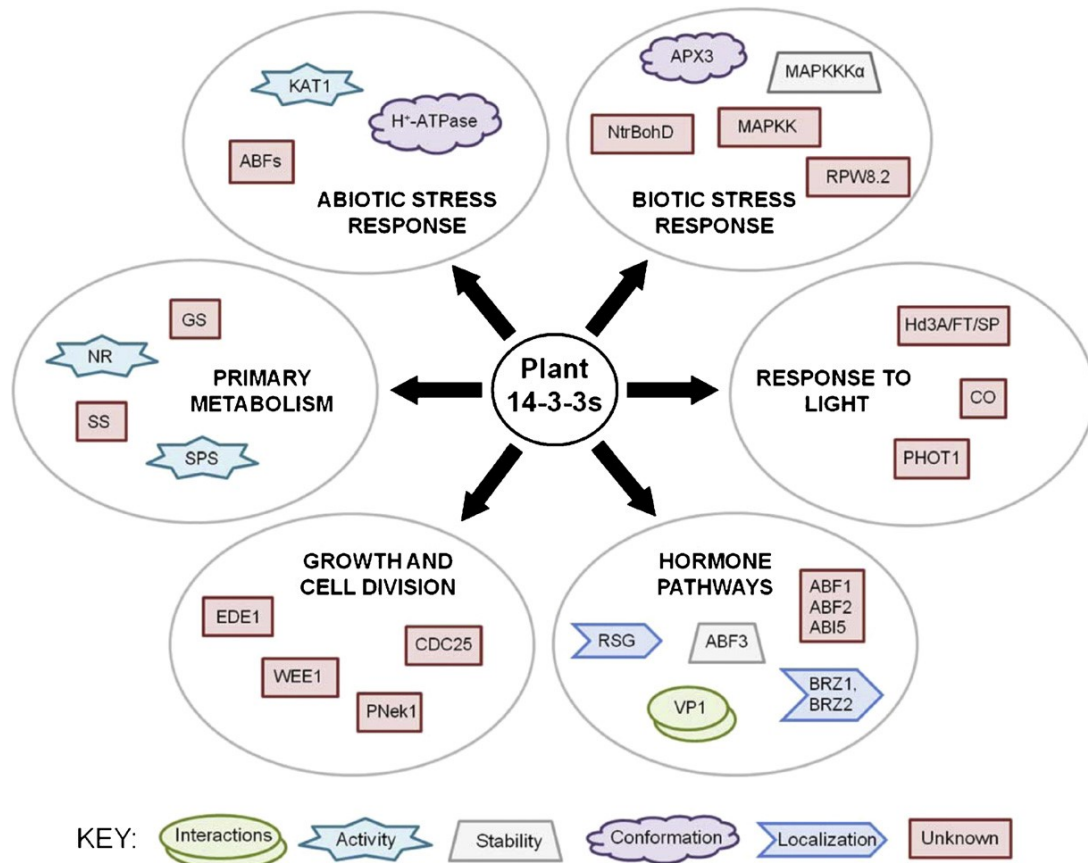


Figura 24 – Diversidade funcional das proteínas 14-3-3s (Denison et al., 2011). Foram representados pelo autor os principais processos fisiológicos e algumas proteínas clientes das 14-3-3s, sendo a cada uma atribuída um formato geométrico correspondente a mecanismos (KEY) de atuação nos processos fisiológicos.

A cana-de-açúcar é uma planta cultivada como semiperene com safra que dura de 12 meses a 18 meses. Durante esse longo período no campo as plantas ficam expostas a diversos tipos de fatores bióticos e abióticos, causando os mais diversos tipos de estresses à planta. Neste contexto, a expectativa é de uma grande quantidade de proteínas envolvidas nas respostas celulares a essas variáveis. No presente estudo ficou evidente que muitas proteínas atuantes na resposta a estresses bióticos e abióticos, assim como proteínas reguladoras da expressão gênica, detectadas nas gemas axilares da cana-planta, não foram mais detectadas

nas gemas axilares da quarta soca, podendo assim contribuir para tornar o canavial mais suscetível ao declínio em estágios de corte avançados, como é observado em praticamente todos os sistemas de plantio da cana-de-açúcar no mundo, com drástica redução da produtividade agrícola no decorrer dos cortes. Embora a não detecção de determinada proteína na quarta soca não significa total supressão dos respectivos genes para as proteínas não encontradas, é possível inferir que há uma redução drástica de sua expressão.

Além da influência dos fatores bióticos e abióticos, alguns estudos já indicaram a ocorrência de mutações somáticas e alterações em nível de DNA (aumento ou diminuição de alelos) durante a propagação vegetativa em diversas espécies de plantas (Vouillamoz et al., 2003; Vezzulli et al., 2012) inclusive em cana-de-açúcar (Augusto et al., 2017). A influência de eventos genéticos como a recombinação somática e ação de elementos transponíveis podem afetar o genótipo e a expressão gênica de alguns genes ou todo genoma (Rossi et al., 2001). Além disso, a detecção de grande quantidade de proteínas de resposta a estresses bióticos e abióticos, mesmo com a utilização gemas axilares não submetidas a essas condições estressantes, pode indicar a atuação de eventos epigenéticos como a remodelagem da cromatina, código de histonas e processos de metilação que tornam as respostas celulares persistentes, mesmo quando as condições estressantes não estão mais presentes. De acordo com Paun et al. (2010), os processos epigenéticos tem um importante papel na adaptação das plantas, regulando a expressão de genes e atuando na interface entre a genética e o ambiente. Em organismos poliploides (a exemplo da cana-de-açúcar) acredita-se que os mecanismos epigenéticos devem ser acentuados, uma vez que as alterações na composição do genoma são esperadas, como resultado da reestruturação e silenciamento de genes transcritos, eventos estes que são necessários para regular a dosagem de genes (Adams et al., 2003; Mayfield et al., 2011). A estabilidade do padrão de metilação induzida por fatores ambientais foi descrita por Mathieus et al. (2007) como estando envolvida com o padrão de herança epigenética.

Para elucidar a redução/ausência de proteínas diferentemente expressas entre a cana-planta e quarta soca na produção comercial de cana-de-açúcar, observados no presente estudo, seriam necessários estudos complementares como análises quantitativas do proteoma (utilização de marcadores isobáricos e/ou outras técnicas) e o estudo do transcriptoma das gemas-axilares da cana-de-açúcar da cultivar RB867515, para identificar se as mudanças na expressão proteica ocorre por alterações estruturais no DNA ou se está sendo controlada por mecanismos de regulação gênica, como a inativação e/ou degradação de mRNAs. Além disso, é sugerido a realização dos mesmos tipos de análises deste trabalho em outras cultivares de

cana-de-açúcar e em diferentes estágios de cortes, para confirmar a importância das proteínas identificadas, na longevidade do canavial. Com os estudos complementares, poderia existir a possibilidade de desenvolvimento de diagnósticos moleculares (*qPCR*, *microarray*, entre outros) para serem utilizados pelos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar no desenvolvimento de novas cultivares.

A análise do proteoma total e diferencial de gemas axilares da cana-planta e quarta soca da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar realizada no presente estudo, foi importante para identificar as proteínas comumente e particularmente expressas em gemas axilares dessa cultivar, e para registrar procedimentos mais adequados e vários resultados pontuais decorrentes desta análise, tais como:

i) O método de extração de proteínas denominado TCA/acetona (Shen e Matsubae, 2002; Riffel et al., 2012) utilizado para diversos vegetais, inclusive para extração de proteínas totais de folha e raiz de cana-de-açúcar, não foi eficiente para extração de proteínas totais das gemas axilares, quando utilizado 100 mg e 200 mg de material;

ii) O método de extração TCA/acetona (Shen e Matsubae, 2002; Riffel et al., 2012) modificado para extração de gemas axilares de cana-de-açúcar, foi eficiente para extração de proteínas quando utilizado 200 mg de gemas;

iii) O método de eletroforese PAGE-Nativo não foi eficiente na separação das diferentes proteínas extraídas pelo método TCA/acetona modificado, para gemas axilares de cana-de-açúcar;

iv) A ausência de Triton X-100 no processo de extração das proteínas das gemas axilares de cana-de-açúcar, não interferiu significativamente na qualidade e quantidade de proteínas totais extraídas pelo método TCA/acetona modificado no presente estudo;

v) O perfil de bandas obtido pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante mostra diferenças na expressão proteica entre as amostras das gemas axilares de cana-de-açúcar de cana-planta e quarta soca;

vi) Nas gemas axilares de cana-planta e quarta soca foram identificadas um total de 235 proteínas diferencialmente expressas, destas, 71 foram particularmente expressas na cana-planta, 52 na quarta soca e 112 foram expressas em ambos os cortes;

vii) Nas gemas axilares de cana-planta e quarta soca foram detectadas diversas proteínas, inclusive diferencialmente expressas nos cortes, em regiões do gel SDS-PAGE onde não eram visíveis bandas proteicas, evidência esta que recomenda, portanto, a utilização

dessas regiões sem bandas definidas em estudos proteômicos e elaboração de proteomas totais de plantas;

viii) As proteínas encontradas nas gemas axilares de cana-planta e quarta soca fazem parte de estruturas celulares, enzimas, fatores de transcrição, fatores de tradução, reguladores da expressão gênica, reguladores da tradução, proteínas relacionadas a respostas de defesa a estresses bióticos e abióticos, entre outras diversas funções celulares;

ix) Na cana-planta destacam-se 15 proteínas, estando estas relacionadas principalmente a estresses bióticos e abióticos, reguladores da expressão gênica, vias de sinalização e biossíntese de moléculas biológicas;

x) Na quarta soca destacam-se 13 proteínas, estando estas relacionadas principalmente a estresses bióticos e abióticos, reguladores da expressão gênica, vias de sinalização, degradação de compostos tóxicos à planta e biossíntese de moléculas biológicas;

xi) A cultivar RB867515 apresenta em suas gemas axilares uma grande diversidade de proteínas de defesa aos mais diversos tipos de estresses, principalmente ambientais (hídrico, salino, oxidativo, luminoso, etc.), justificando sua recomendação a solos arenosos e ambientes de produção entre tipo C e E;

xii) A quarta soca (quinto corte) da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar utilizada comercialmente na região de Araçatuba-SP tem redução considerável na expressão de proteínas importantes relacionadas na defesa a condições de estresses, desenvolvimento das gemas, regulação da expressão gênica entre outros processos fisiológicos que podem ocasionar a redução da produtividade geral e longevidade do canavial.

5. CONCLUSÕES

5.1 Durante os estágios de corte e ciclos de rebrota da cana-de-açúcar ocorrem alterações na expressão de genes das gemas axilares, que levam a uma redução do número de proteínas comumente encontradas nas gemas da cana-planta (1º. corte), e a síntese de proteínas específicas não encontradas na cana-planta, na cana quarta soca (5º. corte);

5.2 A redução da produtividade agrícola, brotação e perfilhamento em estágios avançados da cultura de cana-de-açúcar, é acompanhada por alterações na expressão de genes das gemas axilares, onde menos de 50% das proteínas (47,65%) são detectadas no 1º (cana planta) e no 5º. estágio de corte (quarta soca) e mais de 50% (52,35%) foram diferentemente expressas nas gemas axilares da cana-planta e gemas axilares da quarta soca;

5.3 A detecção de proteínas diferentemente expressas na quarta soca indica que as gemas axilares utilizadas no presente estudo estavam sob condições de estresse hídrico, anóxia e/ou hipóxia, evidência esta que é consistente com a tese de que a compactação do solo geralmente atribuída a colheita mecanizada e intensificada nas idades de cortes mais avançadas, induz uma expressão diferencial de genes nas gemas axilares de cana-de-açúcar nos intervalos entre o primeiro (cana-planta) e quinto estágio de corte (quarta soca);

5.4 A Chalcone synthase (CHS: proteína **105** detectada na cana-planta), por exemplo, é uma das enzimas candidatas a estar relacionada com a garantia de produtividade e perfilhamento nas gemas axilares da cultivar RB867515, uma vez que a baixa expressão ou ausência de expressão do gene *CHS* nas gemas axilares da quarta soca pode explicar uma redução no transporte de auxinas, redução do tamanho das plantas e redução no diâmetro do caule, comprometendo assim, a produtividade e longevidade do canavial;

5.5 As alterações na expressão dos genes que ocorrem em resposta a possíveis condições de estresses bióticos e/ou abióticos nas gemas axilares da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar durante os estágios de corte subsequentes (do 1º. corte ao 5º. corte) são pronunciadas e persistentes, uma vez que são detectadas nas gemas axilares não expostas a condições de estresse.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, K.L.; CRONN, R.; PERCIFIELD, R.; WENDEL, J.F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the national Academy of Sciences of USA*, v. 100, p. 4649-4654, 2003.
- ADAMS, E.; TURNER, J. COI1 a jasmonate receptor, is involved in ethylene-induced inhibition of *Arabidopsis* root growth in the light. *Journal of Experimental Botany*, v. 61, p. 4373–4386, 2010.
- AGATI, G.; MATTEINI, P.; GOTI, A.; TATTINI, M. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, v.174, p. 77-89, 2007.
- AHMAD, P.; RASSOL, S.; GUL, A.; SHEIKH, S.A.; AKRAM, N.A.; ASHRAF, M.; KAZI, A.M.; GUCEL, S. Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1-15, 2016.
- ALLAN, W.L.; BREITKREUZ, K.E.; WALLER, J.C.; SIMPSON, J.P.; HOOVER, G.J.; ROCHON, A.; WOLYN, D.J.; RENTSCH, D.; SNEDDEN, W.A.; SHELP, B.J. Detoxification of succinate semialdehyde in *Arabidopsis* glyoxylate reductase and NAD kinase mutants subjected to submergence stress. *Botany*, v. 90, p. 51-61, 2012.
- ALLAN, W.L.; CLARK, S.M.; HOOVER, G.J.; SHELP, B.J. Role of plant glyoxylate reductase during stress: a hypothesis. *Biochemical Journal*, v. 423, p. 15-22, 2009.
- ALFENAS, A.C. *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos*. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- ALMARAJ, R.S., SELVARAJ, N.; VELUSWAMY, G.K.; RAMANUJAN, R.P.; MUTHURAJAN, R.; PALANIYANDI, M.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; VISWANATHAN, R. *Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map*. *Eletrophoresis*, v. 31, p. 1959 – 1974, 2010.
- ALVIM, F.C.; CAROLINO, S.M.; CASCARDO, J.C.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P. Enhanced accumulation of BIP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, v. 126, p. 1042-1054, 2001.
- AMARAL, A.M.; REIS, M.S.; SILVA, F.R. O programa *BLAST*: guia prático de utilização. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 2007.
- AUGUSTO, R.; MARANHO, R.C.; MANGOLIN, C.A.; BESPALHOK FILHO, J.C.; MACHADO, M.F.P.S. Changes on microsatellites of expressed sequence tag of sugarcane (*Saccharum spp*) during vegetative propagation. *Genetics and Molecular Research*, v.16, p. 1 – 10, 2017.

BARNABAS, L.; RAMADASS, A.; AMALRAJ, R.S.; PALANIYANDI, M.; RASAPPA, V. Sugarcane proteomics: Na update on current status, challenges, and future prospects. *Proteomics*, v. 14, p. 1658-1670, 2015.

BARNABAS, L.; ASHWIN, N.M.R.; KAVERINATHAN, K.; TRENTIN, A. R.; PIVATO, M.; SUNDAR, A.R.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; ROSANA, O.B.; NEETHUKRISHNA, P.C.; ARRIGONI, G.; MASI, A.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum*. *Proteomics*, v. 16, p. 1111-1122, 2016.

BARRETO, A.; SIMONS, J.P. Identification de progenies y progenitors por el analisis del numero cromosomico en *Saccharum*. Turrialba, v. 32, p. 169-180, 1982.

BENEDINI, M.S.; DONZELLI, J.L. Desmistificando a colheita mecanizada da cana crua. *Revista Coplana*, v.42, p. 26 – 28, 2007.

BEN-NISSAN, G.; SHARON, M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, v. 4, p. 862-884, 2014.

BHUYAN, A.K. On the mechanism of the SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers*, v. 93, p. 186-199, 2009.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. *Melhoramento de Plantas*. 6 ed. Viçosa, MG: UFV, 2013, 523 p.

BORGES, J.C.; PEROTO, M.C.; RAMOS, C.H.I. Molecular chaperone genes in sugarcane expressed sequence database (SUCEST). *Genetics and Molecular Biology*, v. 24, p. 85-92, 2001.

BROWN, D.E.; RASHOTTE, A.M.; MURPHY, A.S.; NORMALY, J.; TAGUE, B.W.; PEER, W.A.; TAI, L.; MUDAY, G.K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 126, p. 524-535, 2001.

CAGLIARI, T.C.; SILVA, V.C.H.; BORGES, J.C.; PRANDO, A.; TASIC, L.; RAMOS, C.H.I. Sugarcane HSP101 is a hexameric chaperone that binds nucleotides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, p. 1022-1030, 2011.

CALDERAN-RODRIGUES, M.J.; JAMET, E.; BONASSI, M. B.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; BEGOSSI, A.C.; SETEM, L.V.; FRANSCSCHINI, L.M.; FONSECA, J.G.; LABATE, C.A. Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteomics*, v. 14, p. 738–749, 2014.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T.L. *BLAST+*: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, v.10, p. 1-9, 2009.

CANAUFV. Variedades RB. Disponível em: <http://www.canaufv.com.br/cultivaresRB/RB867515%20.pdf>. Acesso em: 18/04/2016.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova*, v. 31, p. 669 – 675, 2008.

CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUSA NETO, E.R.; PITOMBO, L.M.; DUARTE-NETO, P.J.; VARGAS, V.P.; ANDRADE, C.A.; GAVA, G.J.C.; ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; NETO, A.E.; NETO, A.E.; MARTINELLI, L.A. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *Global Change Biology Bioenergy*, v.5, p. 267 – 280, 2012.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and mechanism of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, p. 642 – 655, 2009.

CASU, R.E., RAE, A.L.; NIELSEN, J.M.; PERROUX, J.M.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Tissue-specific transcriptome analysis within the maturing sugarcane stalk reveals spatial regulation in the expression of cellulose synthase and sucrose transporter gene families. *Plant Molecular Biology*, v. 89, p.607-628, 2015.

CAUSIER, B.; ASHWORTH, M.; GUO, W.; DAVIES, B. The TOPLESS Interactome: A framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.158, p. 423-438, 2012.

CAVALCANTE, E.P.; PRADO, H. Ambientes de produção de cana-de-açúcar de latossolos da região de Araxá-MG. *Nucleus*, v.7, p.115-124, 2010.

CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; PAES LEME, A.F.; CRESTE, S., MAZZAFERA, P. Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 62, p. 1–10, 2013.

CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; LISCHKA, J.; MAYER, S.; PAES LEME, A.F.; MAZZAFERA, P. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 55, p. 66–76, 2012.

CHAPOLA, R.G.; HOFMANN, H.P. Variedades RB, participação, uso e manejo. Disponível em: http://www.stab.org.br/palestra_iii_encontro_de_variedades/hermann_paulo_hoffman.pdf. Acesso em 18/04/2016.

CHEN, T.H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 250-257, 2002.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, v.1, p.1852–1858, 2006.

CLETUS, J.; BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; SAKTHIVEL, N. Transgenic expression of plant chitinase to enhance disease resistance. *Biotechnology Letters*, v. 35, p. 1719-1732, 2013.

Conselho de Informações sobre Biotecnologia – CIB. Guia da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/publicacoes/guia-da-cana-de-acucar/>. Acesso em 18/04/2016.

Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar – Primeiro Levantamento – Safra 2015/16. Brasília, 2015a.

Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar – terceiro Levantamento – Safra 2015/16. Brasília, 2015b.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 801-847, 1996.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 355-381, 1997.

CRUSCIOL, C.A.C.; SILVA, M.A.; ROSSETTO, R.; SORATTO, R. *Tópicos em Ecofisiologia da cana-de-açúcar*. FEPAF, Botucatu, SP, 2010, 111 p.

DAL-BIANCO, M.; CARNEIRO, M.S.; HOTTA, C.T.; CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; GARCIA, A.A.; SOUZA, G.M. Sugarcane improvement: how far can we go? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 265-270, 2011.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. (ed.). *Sugarcane Improvement through Breeding*. Elsevier Press, p. 7-84, 1987.

DENISON, F.C.; PAUL, A.L.; ZUPANSKA, A.K.; FERL, R.J. 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 22, p. 720-727, 2011.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D. ZIVY, M.; THIELLEMENTE, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, v. 7, p. 52-64, 1986.

DAO, T.T.H.; LINTHORST, H.J.M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, v. 10, p. 397-412, 2011.

DEINLEIN, U.; STEPHAN, A.B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J.I. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Science*, v. 19, p. 371-379, 2014.

DENNIS, E.S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F.U.; GROVER A.; ISMOND, K.P.; GOOD, A.G.; PEACOCK, W.J. Molecular strategies for improved waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, p. 89-97, 2000.

DONG, Q.; SCHLUETER, S.D.; BRENDEL, V. PlantGDB, plant genome database and analysis tools. *Nuclear Acids Research*, v. 32, p. 354 – 359, 2004.

DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; DE BRUXELLES, G.; TREVASKIS, B.; HOEREN, F.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. Strategies of gene action in *Arabidopsis thaliana* during hypoxia. *Annals of Botany*, v. 79, p. 21-31, 1997.

DOLFERUS, R.; JACOBS, M.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis adh* gene. *Plant Physiology*, v. 105, p. 1075-1087, 1994.

DOLFERUS, R.; WOLANSKY, M.; CARROL, R.; MIYASHITA, Y.; ISMOND, K.; GOOD, A. Functional analysis of lactate dehydrogenase during hypoxic stress in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, v. 35, p. 131-140, 2008.

DOWNARD, K.M. 1912: a titanic year for mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 47, p. 1034 – 1039, 2012.

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 223-250, 1997.

ELLIS, C.; TURNER, J.G. A conditionally fertile coil allele indicates cross-talk between hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta*, v. 215, p. 549-556, 2002.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JR., F.B. *Biotechnologia: estado de arte e aplicações na agropecuária*. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, p. 143-174, 2011.

FARONI, C.E. Sistema radicular de cana-de-açúcar e identificação de raízes metabolicamente ativa. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004, 68 p.

FERRARI, F. Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, Poaceae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010, 97 p.

FERREIRA, S.S.; HOTTA, C.T.; POELKING, V.G.C.; LEITE, D.C.C.; BUCKERIDGE, M.S.; LOUREIRO, M.E.; BARBOSA, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; SOUZA, G.M. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. *Plant Molecular Biology*, v. 91, p. 15-35, 2016.

FERREYRA, M.L.F.; PEZZA, A.; BIARC, J.; BURLINGAME, A.L.; CESATI, P. Plant L10 ribossomal proteins have different roles during development and translation under ultraviolet-B stress. *Plant Physiology*, v. 153, p. 1878-1894, 2010.

FERREL, K.; WILKINSON, C.R.M.; DUBIEL, W.; GORDON, C. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends in Biochemical Science*, v. 25, p. 83-88, 2000.

FINI, A.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; TATTINI, M. Strees-induced flavonoids biosynthesis and antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, p. 709-711, 2011.

FINK, A.L. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, v. 79, p. 425-449, 1999.

FREY, N.F.; MULLER, P.; JAMMES, F.; KIZIS, D.; LEUNG, J.; PERROT-RECHENMANN, C.; BIANCHI, M.W. The RNA binding protein Tudor-SN Is essential for stress tolerance and stabilizes levels of stress-responsive mRNAs encoding secreted proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 22, p. 1575-1591, 2010.

FROLOVA, L.; LE GOFF, X.; ZHOURAVLEVA, G.; DAVYDOVA, E.; PHILIPPE, M.; KISSILEV, L. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA*, v. 4, p. 334-341, 1996.

GACHOMO, E.E.; JIMENEZ-LOPEZ, J.C.; BAPTISTE, L.J.; KOTCHONI, S.O. GIGANTUS1 (GTS1), a member of Transducin/WD40 protein superfamily, controls seed germination, growth and biomass accumulation through ribosome-biogenesis protein interactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, v. 14, p. 1-17, 2014.

GALLAVOTTI, A.; LONG, J.A.; STANFIELD, S.; YANG, X.; JACKSON, D.; VOLLBRECHT E.; SCHMIDT, R.J. The control of axillary meristem fate in the maize ramosa pathway. *Development*, v. 137, p. 2849-2856, 2010.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). *Crop-water relations*. New York: Wiley Interscience, p. 445-479, 1983.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

GILBERT, R.A.; SHINE JR, J.M.; MILLER, J.D.; RICE, R.W.; RAINBOULT, C.R. The effect of genotype, environment and time of harvest on sugarcane yields in Florida, USA. *Field Crop Research*, v.95, p. 156-170, 2006.

GODFREY, D.; ABLE, A.; DRY, I. Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGFP3*) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, v. 20, p. 1112-1125, 2007.

GOOD, A.G.; CROSBY, W.L. Induction of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in hypoxically induced barley. *Plant Physiology*, v. 90, p. 860-866, 1989.

GOMATHI, R.; RAO, P.N.G.; RAKKIYAPPAN, P.; SUNDARA, B.P.; SHIYAMALA, S. Physiological studies on ratoonability of sugarcane varieties under tropical Indian condition. *American Journal of Plant Sciences*, v.4, p.274-281, 2013.

GRIFFITHS, A.J.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. *Introdução à genética*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 743 p.

GURLEY, W.B. HSP101: A key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *Plant Cell*, v. 12, p. 457-460, 2000.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 40, p. 347-369, 1989.

HAMMOND S.M.; BERNSTEIN E.; BEACH D; HANNON G.J. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v. 404, p. 293–296, 2000.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, v. 67, p. 425-479, 1998.

HOOVER, G.J.; VAN CAUWENBERGHE, O.R.; BREITKREUZ, K.E.; CLARK S.M.; MERRILL A.R.; SHELPS B.J. Characteristics of an *Arabidopsis* glyoxylate reductase: general biochemical properties and substrate specificity for the recombinant protein, and developmental expression and implications for glyoxylate and succinic semialdehyde metabolism in planta. *Canadian Journal of Botany*, v. 85, p. 883–895, 2007.

ISHIGURO, S.; WATANABE, Y.; ITO, N.; NONAKA, H.; TAKEDA, N.; SAKAI, T.; KANAYA, H.; OKADA, K. SHEPHERD is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 898-908, 2002.

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

JARILLO, J.A.; LEYVA, A.; SALINAS, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiology*, v. 101, p. 833-837, 1993.

JALAPOUR, Z.; SHABANI, L.; AFGHANI, L.; SHARIF-TEHRANI, M.; AMINI, S. Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalstatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture of yew. *Turkish Journal of Biology*, v. 38, p. 76-82, 2014.

KAWA, D.; TESTERINK, C. Regulation of mRNA decay in plant responses to salt and osmotic stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, p. 1165-1176, 2017.

KERBAUY, G.B. *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

KIMURA, S.; HIGASHINO, Y.; KITAO, Y.; MASUDA, TARO; URADE, REIKO. Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 1-16, 2015.

KIRCH, H.H.; SCHLINGENSIEPEN, S.; KOTCHONI, S.; SUNKAR, R.; BARTELS, D. Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 57, p. 315-332, 2005.

KOTCHONI, S.O.; KUHNS, C.; DITZER, A.; KIRCH, H.H.; BARTELS, D. Overexpression of different *aldehyde dehydrogenase* genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, v. 29, p. 1033-1048, 2006.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, v. 22, p. 541-563, 2010.

KURAMAE, E.E.; FENILLE, R.C.; ROSA JR, V.E. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 24, p. 43-48, 2001.

KUREPA, J.; WANG, S.; LI, Y.; SMALLE, J. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling e Behavior*, v. 4, p. 924-927, 2009a.

KUREPA, J.; WANG, S.; LI, Y.; ZAITLIN, D.; PIERCE, A.J.; SMALLE, J.A. Loss of 26S proteasome function leads to increased cell size and decreased cell number in *Arabidopsis* shoot organs. *Plant Physiology*, v. 150, p. 178-189, 2009b.

KUREPA, J.; TOH-E, A.; SMALLE, J.A. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *The Plant Journal*, v. 53, p. 102-114, 2008.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.41, p. 345 – 363, 2005.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? I. *Scientia Chromatographica*, v. 1, p. 35 – 61, 2009.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. *Scientia Chromatographica*, v. 5, p. 27– 46, 2013.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M.A.; ANJOS, I.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; SCARPARI, M.S.; GARCIA, J.C.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, D.N.; MENDONÇA, J.R.; KANTHACK, R.A.D.; CAMPOS, M.F.; BRANCALIÃO, S.R.; PETRI, R.H.; MIGUEL, P.E.M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2012, 16 p.

LEITE, L.G., FILHO, A.B.; TAVARES, F.M.; GINARTE, C.M.A.; ALMEIDA, L.C.A.; BOTELHO, P.S.M. *Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar*. *Revista Cultivar*, v. 83, p. 30 – 33, 2006.

LERY, L.M.; HEMERLY, A.S.; NOGUEIRA, E.M.; von KRÜGER, W.M.; BISCH, P.M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 562–576, 2011.

LI, C.; NONG, Q.; SOLANKI, M.K.; LIANG, Q.; XIE, J.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, W.; YANG, L.; LI, Y. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to draught stress. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-11, 2016.

LI, J.; OU-LEE, T.; RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LAST, R.L. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell*, v. 5, p. 171-179, 1993.

LI, Y.; YANG, L. Sugarcane agriculture and sugar industry in China. *Sugar Tech*, v. 17, p. 1-8, 2015.

LIJUAN, C.; HUIMING, G.; YI, L.; HONGMEI, C. Chalcone synthase EaCHS1 from *Eupatorium adenophorum* functions in salt stress tolerance in tobacco. *Plant Cell Reports*, v. 34, p. 885-894, 2015.

LINDSTRÖM, M.S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 379, p. 167-170, 2009.

LIPMAN, D.J.; PEARSON, W.R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, v. 227, p. 1435 – 1441, 1985.

LIU, F.; JIANG, H.; YE, S.; CHEN, W.P.; LIANG, W.; XU, Y.; SUN, B.; SUN, J.; WANG, Q.; COHEN, J.D.; LI, C. The *Arabidopsis* P450 protein CYP82C2 modulates jasmonate-induced root growth inhibition, defense gene expression and indole glucosinolate biosynthesis. *Cell Research*, v. 20, p. 539-552, 2010.

LORKOVIC, Z.J. Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Science*, v. 14, p. 229-236, 2009.

LU, X.; ZHANG, F.; SHEN, Q.; JIANG, W.; PAN, Q.; LV, Z.; YAN, T.; FU, X.; WANG, Y.; QIAN, H.; TANG, K. Overexpression of allene oxide cyclase improves the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Plos One*, v. 9, p. 1-8, 2014.

MANOSALVA, P.M.; DAVIDSON, R.M.; LIU, B.; ZHU, X.; HULBERT, S.H.; LEUNG, H.; LEACH, J.E. A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum diseases resistance in rice. *Plant Physiology*, v. 149, p. 286-196, 2009.

MARAFON, A.C. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2012.

MARRET, R.; CARPENIER, M.C.; FAVORY, J.J.; PICART, C.; DESCOMBIN, J.; BOUSQUET-ANTONELLI, C.; TILLARD, P.; LEJAY, L.; DERAGON, J.M.; CHARNG, Y.Y. Heat-shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock. *Plant Physiology*, v. 174, p. 1-35, 2017.

MANHÃES, C.M.C.; GARCIA, R.F.; FRANCELINO, F.M.A.; FRANCELINO, H.O.; COELHO, F.C. Factors that affect sprouting and tillering of sugar cane. *Vértices*, v. 17, p. 163-191, 2015.

MATHIEU, O.; REINDERS, J.; CAIKOVSKI, M.; SMATHAJITT, C.; PASZKOWSKI, J. Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, v. 130, p. 851-862, 2007.

MATTIELLO, L.; RIAÑO-PACHÓN, D.M.; MARTINS, M.C.M.; CRUZ, L.P.; BASSI, D.; MARCHIORI, P.E.R.; RIBEIRO, R.V.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A.; MENOSSI, M. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 1-21, 2015.

MAURINO, V.G.; ENGQVIST, M.K.M. 2-Hydroxy Acids in Plant Metabolism. *The Arabidopsis Book*, v. 13, p. 1-31, 2015.

MAYFIELD, D.; CHEN, Z.J.; PIRES, J.C. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 174-178, 2011.

MCLOUGHLIN, F.; BASHA, E.; FOWLER, M.E.; KIM, M.; BORDOWITZ, J.; KATIYAR-AGARWAL, S.; VIERLING, E. Class I and II small heat-shock proteins protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology*, v. 172, p. 1221-1236, 2016.

MEISTER, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, v. 14, p. 447-459, 2013.

MEIRELES, K.G.X. Aplicação da proteômica na pesquisa vegetal. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em: 06/04/2016.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.K.; D'HONT, A.; GLASMANN, J.C.; TEW, T.L. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. *Plant Breeding Reviews*, v.27, p.15-118, 2006.

MIKUNI, O.; ITO, K.; MOFFAT, J.; MATSUMARA, K.; MCCAUGHAN, K.; NOBOKINI, T.; TATE, W.; NAKAMURA, Y. Identification of the *prfC* gene, which encodes peptide-chain-release factor 3 of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 91, p. 5798-5802, 1994.

MITHRAN, M.; PAPARELLI, E.; NOVI, G.; PERATA, P.; LORETI, E. Analysis of the role of pyruvate decarboxylase gene family in *Arabidopsis thaliana* under low-oxygen conditions. *Plant Biology*, v.16, p. 28-34, 2014.

NEER, E.J.; SCHIMIDT, C.J.; NAMBU DRIPAD, R.; SMITH T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, v. 371, p. 297-300, 1994.

NOVACANA. Aspectos do Plantio da Cana-de-Açúcar. Disponível em: <https://www.novacana.com/cana/aspectos-plantio-cana-de-acucar/>. Acesso em: 11/04/2016.

NOVACANA. Safra 2017/28: Cana-de-açúcar. novaCana.com, v.1, p. 1-15, 2017.

ORTIZ-MOREA, F.A. Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010, 170 p.

ORTIZ-MOREA, F.A.; VICENTINI, R.; SILVA, G.F.F.; SILVA, E.M.; CARRER, H.; RODRIGUES, A.P.; NOGUEIRA, F.T.S. Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 2307-2320, 2013.

- OLIVER, S.C.; VENIS, M.A.; FREEDMAN, R.B.; NAPIER, R.M. Regulation of synthesis and turnover of maize auxin-binding protein and observations in its passage to the plasm membrane: comparisons to maize immunoglobulin-binding protein cognate. *Planta*, v. 197, p. 465-474, 1995.
- PACHECO, C.M.; PESTANA-CALSA, M.C.; GOZZO, F.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; MENOSSI, M.T.C. Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *Journal of Proteome Research*, v. 12, p. 5681–5695, 2013.
- PAUN, O.; BATEMAN, R.M.; FAY, M.F.; HEDRÉN, M.; CIVEYREL, L.; CHASE, M.W. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). *Molecular Biology and Evolution*, v. 27, p. 2465-2473, 2010.
- PAUWELS, L.; BARBERO, G.F.; GEERINCK, J.; TILLEMANN, S.; GRUNEWALD, W.; PÉREZ, A.C.; CHICO, J.M.; BOSSCHE, R.V.; SEWELL, J.; GIL, E.; GARCÍA-CASADO, G.; WITTERS, E.; INZÉ, I.; LONG, J.F.; JAEGER, G.D.; SOLANO, R.; GOOSSENS, A. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, v. 464, p. 788-791, 2010.
- PATADE, V.Y.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. *Plant Growth Regulation*, v. 55, p. 169-173, 2008.
- PATNAIK, D.; KHURANA, P. Germins and germin like proteins: An overview. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 39, p. 191-200, 2001.
- PEROZICH, J.; NICHOLAS JUNIOR, H.B.; WANG, B.C.; LINDAHL, R.; HEMPEL, J. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, v. 8, p. 137-146, 1999.
- PETSCH, K.A.; MYLNE, J.; BOTELLA, J.R. Cosuppression of eukaryotic release factor 1-1 in *Arabidopsis* affects cell elongation and radial cell division. *Plant Physiology*, v. 139, p. 115-126, 2005.
- PINTO, R.J.B. *Introdução ao Melhoramento Genético de Plantas*. 2.ed. Maringá, PR: UEM, 2009, 351 p.
- PRADO, H. *Pedologia fácil aplicações na agricultura*. 2. ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2008, 145 p.
- QUE, Y.; XU, L.; LIN, J.; RUAN, M.; ZHANG, M.; CHEN, R. Differential protein expression in sugarcane during sugarcane-*Sporisorium scitamineum* interaction revealed by 2DE and MALDI-TOF/MS. *Comparative and Functional Genomics*, v. 2011, 10 p., 2011.
- REINHECKEL, T.; SITTE, N.; ULLRICH, O.; KUCKELKORN, U.; DAVIES, K.J.A.; GRUNE, T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*, v. 335, p. 637-642, 1998.

RIBEIRO, I.L.A.C. Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010, 128 p.

RICHARD, S.; LAPOINT, G.; RUTLEDGE, R.G.; SÉGUIN, A. Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant Cell Physiology*, v. 41, p. 982-987, 2000.

RIDESA. Catálogo Nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. RIDESA, Curitiba, 2010.

RIFFEL, A.; VIANA, L.S.; COSTA, J.G.; SANT’ANA, A.E.G. Boletim de pesquisa e desenvolvimento: avaliação de métodos de extração de proteínas de tecido foliar e radicular de cana-de-açúcar para estudos de proteômica. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, 2012.

ROACH, B.T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. *Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologist*, v.11, p. 34-47, 1989.

ROACH, B.T. Nobilisation of sugarcane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology*, v.14, p. 206–216, 1972.

ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; VAN SLUYS, M.A. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). *Genetics and Molecular Biology*, v. 24, p. 147-154, 2001.

SANCHES, P.A.; SANTOS, F.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; BENTO, J.M.S. Direct and indirect resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* induced by jasmonic acid. *Bulletin of Entomological Research*, v. 1, p. 1-11, 2017.

SANTOS, F.; BORÉM, A. *Cana-de-açúcar – do plantio à colheita*. Viçosa, MG: UFV, 2013, 257 p.

SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural*, v. 40, p. 727-734, 2010.

SCHULZ, P.; HERDE, M.; ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiology*, v. 163, p. 523-530, 2013.

SCHIRMER, E.C.; GLOVER, J.R.; SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 21, p. 289-296, 1996.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (org.). *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 19-36.

SEVERIANO, E.C.; OLIVEIRA, G.C.; JUNIOR, M.S.; CASTRO, M.B.; OLIVEIRA, L.F.C.; COSTA, K.A.P. Compactação de solos cultivados com cana-de-açúcar: I- modelagem e

quantificação da compactação adicional após as operações de colheita. *Engenharia Agrícola Jaboticabal*, v. 30, p. 404-413, 2010.

SHARMA, N.; SHARMA, K.P.; GAUR, R.K.; GUPTA, V.K. Role of chitinase in plant defense. *Asian Journal of Biochemistry*, v. 6, p. 29-37, 2011.

SHEN, S.; MATSUBAE, M. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. *Journal of Biochemistry*, v. 132, p. 613-620, 2002.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 850-858, 1996.

SIDDIQUI, K.S.; POLJAK, A.; GUILHAUS, M.; FELLER, G.; D'AMICO, S.; GERDAY, C.; CAVICCHIOLI, R. Role of disulfide bridges in the activity and stability of a cold-active α -Amylase. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 6206–6212, 2005.

SILVA, M.A.; CARLIN, S.D.; PERECIN, D. Fatores que afetam a brotação inicial da cana-de-açúcar. *Revista Ceres*, v. 51, p. 457–466, 2004.

SILVA, R.S.; SOUZA, C.R.B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folha e raízes de *Piper tuberculatum*. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 255–260, 2009.

SILVA, J.P.N.; SILVA, M.R.N. *Noções da cultura da cana-de-açúcar*. Inhumas: IFG, 2012, 105 p.

SONG, X.; HUANG, X.; TIAN, D.; YANG, L.; LI, Y. Proteomic analysis of sugarcane seedling in response to *Ustilago scitaminea* infection. *Life Science Journal*, v. 10, p. 3026-3035, 2013.

SONG, H.; ZHAO, R.; FAN, P. WANG, X.; CHEN, X.; LI, Y. Overexpression of *AtHsp90.2*, *AtHsp90.5* and *AtHsp90.7* in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses. *Planta*, v. 229, p. 955-964, 2009.

SOUZA, G.M.; SIMOES, A.C.Q.; OLIVEIRA, K.C.; GARAY, H.M.; FIORINI, L.C.; GOMES, F.S.; NISHIYAMA-JUNIOR, M.Y.; SILVA, A.M. The sugarcane transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, v.24, p. 25-34, 2001.

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

SUNKAR, R.; BARTELS, D.; KIRCH, H.H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, v. 35, p. 452-464, 2003.

TAIZ, L.; ZEINGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819 p.

UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/> . Acesso em: 06/04/2016.

TANG, G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 30, p. 106-114, 2005.

TAKENAKA, Y.; NAKANO, S.; TAMOI, M.; SAKUDA, S.; FUKAMIZO, T. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 73, p. 1066-1071, 2009.

TENA, G.; BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 519-529, 2011.

TELLES, G.P.; BRAGA, M.D.V.; DIAS, Z.; LIN, T.-L.; QUITZAU, J.A.A.; DA SILVA, F.R.; MEIDANIS, J. Bioinformatics of the sugarcane EST project. *Genetics and Molecular Biology*, v. 24, p. 9-15, 2001.

TSUJI, H.; MEGURO, N.; SUZUKI, Y.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice. *FEBS Letters*, v. 546, p. 369-373, 2003.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, v. 14, p. 153-164, 2002.

UEDA, J.; KATO, J. Isolation and identification of senescence-promoting substrate from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*, v. 66, p. 246-249, 1980.

VAN ALTEN, D.M.F.; SYNSTAD, B.; BRURBEG, M.B.; HOUGH, E.; RIISE, B.W.; EIJSINK, V.G.H.; WIERENGA, R.K. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 97, p. 5842-5847, 2000.

VAN DER GRAAFF, E.; SCHWACKE, R.; SCHNEIDER, A.; DESIMONE, M.; FLUGGE, U.I.; KUNZE, R. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, v. 14, p. 776-792, 2006.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. *Chronica Botanica*, New York: Stechert-Hafner, 1952, 371 p.

VALENTE, M.A.S.; FARIA, J.A.Q.A.; SOARES-RAMOS, J.R.L.; REIS, P.A.B.; PINHEIRO, G.L.; PIOVESAN, N.D.; MORAIS, A.T.; MENEZES, C.C.; CANO, M.A.O.; FIETTO, L.G.; LOUREIRO, M.E.; ARAGÃO, F.J.L.; FONTES, E.P.B. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 533-546, 2009.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; SILVA, A.M.; FERRO, M.I.T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.F.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI-JR, M.; GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.A.; SIQUEIRA, W.J.; SLUYS, M.A.V.; THIEMANN, O.H.; KURUMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.P.N.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.S.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.M.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.A.; ROSA-JR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.Z.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.M.; BRAGA, M.D.V.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for a tropical crop sugarcane. *Genome Research*, v.13, p. 2725–2735, 2003.

VEZZULLI, S.; LEONARDELLI, L.; MALOSSINI, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; MOSER, C. Pinot blanc and Pinot gris arose independent somatic mutations of Pinor noir. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 6359-6369, 2012.

VISCHI FILHO, O.J. Indicadores físicos e mecânicos do solo sob cultivo de cana-de-açúcar em áreas comerciais. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014, 131 p.

VISCHI FILHO, O.J.; SOUZA, Z.M.; SILVA, R.B.; LIMA, C.C.; PEREIRA, D.M.G.; LIMA, M.E.; SOUSA, A.C.M.; SOUZA, G.S. Capacidade de suporte de carga de latossolo vermelho cultivado com cana-de-açúcar e efeitos da mecanização no solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, p. 322-332, 2015.

VILLAS-BÔAS, S.G., GOMBERT, A.K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente da era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.36, p. 58-69, 2006.

VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*, v. 75, p. 458-461, 1984.

VIVEK, P.J.; RESMI, M.S.; SREEKUMAR, S.; SIVAKUMAR, K.C.; TUTEJA, N.; SONIYA, E.V. Calcium-dependent protein kinase in ginger binds with importin- α through its junction domain for nuclear localization, and further interacts with NAC transcription factor. *Frontier in Plant Science*, v. 7, p. 1-13, 2016.

VOUILLAMOZ, J.; MAIGRE, D.; MEREDITH, C.P. Microsatellites analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. 'Cormalin du Valais'. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107, p. 448-454, 2003.

WANG, T.; CHEN, X.; ZHU, F.; LI, H.; LI, L.; YANG, Q.; CHI, X.; YU, S.; LIANG, X. Characterization of peanut germin-like proteins, AhGLPs in plant development and defense. *Plos One*, v. 8, p. 1-11, 2013.

WANG, Y.H.; LI, J.Y. Molecular basis of plant architecture. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, p. 253 – 279, 2008.

- WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2369–2375, 2003.
- WAKAZA, Y.; YASUDA, H.; OONO, Y.; KAWAKATSU, T.; HIROSE, S.; TAKAHASHI, H.; HAYASHI, S.; YANG, L.; TAKAIWA, F. Expression of ER quality control-related genes in response to changes in BiP1 levels in developing rice endosperm. *Plant Journal*, v. 65, p. 675-689, 2011.
- WEBER, H.; CHETELAT, A.; REYMOND, P.; FARMER, E.E. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, v. 37, p. 877–888, 2004.
- WEI, Y.; LIN, M.; OLIVER, D.J.; SCHNABLE, P.S. The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of *Arabidopsis*. *BMC Biochemistry*, v. 10, p. 1-10, 2009.
- WOOD, R.A. Cane deterioration as affected by billet size, delay in milling and other factors. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association*, p. 12- 17, 1976.
- WOLF, D.H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1695, p. 19-31, 2004.
- WILSON, K.; WALKER, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7ed. Cambridge University Press, 2010, 352 p.
- XU, X.; NIEBER, J.L.; GUPTA, S.C. Compaction effects on the gas diffusion coefficients in soil. *Soil Science Society of America Journal*, v. 56, p. 1743-1750, 1992.
- YAN, J.; HE, C.; WANG, J.; MAO, Z.; HOLADAY, S.A.; ALLEN, R.D.; ZHANG, H. Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 lambda in cotton leads to a “staygreen” phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant & Cell Physiology*, v. 45, p. 1007–1014, 2004.
- YAN, C.; YAN, Z.; WANG, Y.; YAN, X.; HAN, Y. Tudor-SN, a component of stress granules, regulated growth under salt stress by modulating GA20ox3 mRNA levels in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 5933-5944, 2014.
- YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 915-929, 1998.
- YONG, T.E.; LING, J.; GEISLER-LEE, C.J.; TANGUAY, R.L.; CALDEWELL, C.; GALLIE, D.R. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiology*, v. 127, p. 777-791, 2001.
- ZHANG, J.F.; YUAN, L.J.; SHAO, Y.; DU, W.; YAN, D.W.; LU, Y.T. The disturbance of small RNA pathways enhanced abscisic acid response and multiple stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*, v. 31, p. 562-574, 2008.

ZHANG, C.; PANG, Q.; JIANG, L.; WANG, S.; YAN, X.; CHEN, S.; HE, Y. Dihydroxyacid dehydratase is important for gametophyte development and disruption causes increased susceptibility to salinity stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 879-888, 2015.

ZHANG, Y.; FONSLow, B.R.; SHAN, B.; BAEK, M.C.; YATES, J.R. Protein analysis by shotgun/button-up proteomics. *Chemical Review*, v. 113, p. 2343-2394, 2013.

ZHOU, G.; YANG, L.T.; LI, Y.R.; ZOU, C.L.; HUANG, L.P.; QIU, L.H.; HUANG, X.; SRIVASTAVA, M.K. Proteomic analysis of osmotic stress responsive proteins in sugarcane leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 30, p. 349-359, 2012.

ZHOU, F.; ZHANG, Z.; GREGERSEN, P.L.; MIKKEELSEN, J.D.; NEERGAARD, E.; COLLINGE, D.B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiology*, v. 117, p. 33-41, 1998.

ZHU, Z.; XU, F.; ZHANG, Y.; CHENG, Y.T.; WIERMER, M.; LI, X.; ZHANG, Y. *Arabidopsis* resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 13960-13965, 2010.