

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Amanda Emanuella Rocha de Souza

Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-
de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob estresse por radiação
ultravioleta B e seca

Recife
2015

Amanda Emanuella Rocha de Souza

**Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob estresse por
radiação ultravioleta B e seca**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Amanda Emanuella Rocha de
Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e seca/ Amanda
Emanuella Rocha de Souza– Recife: O Autor, 2015.

251 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Tercilio Calsa Junior

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2015.

Inclui bibliografia

1. Cana-de-açúcar 2. Proteína 3. Estresse (fisiologia) I. Calsa
Junior, Tercilio (orientador) II. Título

584.92

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 232

Amanda Emanuella Rocha de Souza

Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e seca

Aprovado em 27/08/2015

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dra. Andréa Chaves
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Prof. Dr. Djalma Euzébio Simões Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Profa. Dra. Maria Clara Pestana Calsa
Centro Universitário Maurício de Nassau**

**Recife
2015**

*À minha querida e estimada avó, Helena
Rocha de Souza, de saudosa memória,
pela incansável luta e amor devotado aos
seus filhos, netos e família - e constante
incentivo de coragem na busca de nossos
sonhos.*

DEDICO

Agradecimentos

Gostaria de agradecer inicialmente à Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado, que me capacitou a participar neste projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG) e UFPE pela oportunidade de estudar e desenvolver um projeto nesta instituição.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. *Tercilio Calsa Junior*, pela oportunidade, orientação, e confiança ao longo de todo o doutorado.

Agradeço à minha família querida, especialmente aos meus pais, *Lucileide Rocha* e *André Rocha*, por todo incentivo, apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Agradeço à minha irmã, *Helena Alcyra* e *Keila Soares* por sempre torcerem pela minha felicidade e à minha princesa *Maria Alice*, amor da titia. Obrigada por todo o amor que vocês me oferecem, pela confiança, carinho e suporte. Amo vocês!

Um agradecimento especial ao meu amigo, namorado e companheiro, *Nielton Araujo Souza*, pelo carinho, amor e incentivo durante toda a caminhada, mas, sobretudo pelas inumeráveis ajudas em todas as etapas do meu trabalho e, pela paciência e compreensão nos momentos de dificuldades.

Aos meus amigos de longa data e aos mais novos, *André Barbosa*, *Dheisy Melo*, *Gemima Melo*, *Luisa Lima*, *Kessyana Pereira* e *Regina Folha*, que sempre estiveram ao meu lado e na torcida pelas minhas conquistas.

Aos colegas e amigos do LGPP, atuais e egressos: *Adauto Neto*, *Celuza Santos*, *Cinthya Pacheco*, *Elton Pena*, *Fabiana Cavalcante*, *Marciana Bizerra*,

Juliana Souza, Luisa, Maria Clara, Melqui Oliveira, Nayara Santos, Raul Felipe, Regina Folha, Renata Almeida, Romel Vilela, Paulo Martins e Taciana Manso, pelo companheirismo e ajuda em diversas etapas do meu trabalho e, principalmente, pelos agradáveis momentos de convivência no laboratório e fora dele.

Aos colaboradores do meu trabalho: Profa. Dra. *Lilia Willadino, Wellington Oliveira, Marciana Bizerra e Gemima Melo*, pela disponibilidade e grande auxílio nas análises bioquímicas no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - LCTV/UFRPE; *Júlia Campos (CETENE)* pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas; Prof. Dr. *Edvan Souza e Jailson Cunha* pelo auxílio e disponibilidade dos equipamentos para coleta de dados fisiológicos; Prof^a Dra. *Roseane Cavalcante* e prof^o Dr. *Péricles Albuquerque* pela disponibilidade da casa-de-vegetação para o segundo experimento e, ao colega Msc. *Gerkson Alves*, pela grande ajuda na condução do experimento; Prof. Dr. *Mauro Guida* e mestrandia *Silvia Caroline* pela disponibilidade para as análises fisiológicas e, em especial à doutoranda *Gabriela Frosi* por todas as horas disponibilizadas me auxiliando nas análises fisiológicas e estatísticas do meu experimento no laboratório de Ecofisiologia Vegetal - UFPE; À Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC-UFRPE), em nome do Dr. *Djalma Euzébio*, Dr^a *Andrea Chaves*, colega '*Carpina*', *Evanilson* e a todos dessa instituição que sempre colaboraram e apoiaram na elaboração e condução do meu experimento na casa-de-vegetação, especialmente ao grande amigo *Fábio Vieira*, que desenvolveu com tamanha maestria a estrutura do experimento; À *Túlio Diego* pelo auxílio nas focalizações no laboratório de Biologia Molecular - UFPE; Ao prof. Dr. *Gerson Quirino* que sempre me incentivou no decorrer da minha luta e pela

disponibilidade da sua orientada *Amanda Wanessa* que muito me ajudou na condução do experimento em Carpina; Ao prof. Dr. *Fábio Gozzo* (UNICAMP) pela disponibilidade do uso de banco de dados de proteínas de *Saccharum*.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética, pela convivência, conversas, estudos e risadas. Agradeço especialmente a *Adiles, Pedro, Renata* e *João* por toda amizade e companheirismo.

A toda minha família, pela confiança depositada em mim e, em especial à minha avó, *Helena Rocha de Souza (in memorian)*, por nunca deixar de acreditar na minha capacidade.

Muito Obrigada!

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das principais fontes de açúcar e etanol do planeta. A planta é um híbrido de duas espécies de gramíneas C4, que tem alto desempenho fotossintético. Os efeitos das mudanças climáticas, como o aumento dos níveis de UVB e seca, junto com a elevação nos custos do petróleo aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia, impeliram ações em nível global para o desenvolvimento de pesquisas na área de combustíveis renováveis. Atualmente, a conversão de material lignocelulósico da parede celular de cana-de-açúcar em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. Do ponto de vista funcional, a parede celular é essencial para o crescimento e diferenciação, sinalização, resposta e defesa contra estresses bióticos e abióticos. Devido à importância da cultura e aos danos ocasionados pelos estresses ambientais UVB e seca, este trabalho apresentou três enfoques principais: o desenvolvimento de um protocolo para extração de proteínas enriquecida de parede celular em tecido foliar de cana-de-açúcar; o estudo em cana-de-açúcar da interação entre os fatores de estresse UVB e seca moderada; e o estudo da imposição dos estresses simultâneos UVB e estresse hídrico severo, em busca de uma melhor compreensão da interação desses estresses abióticos nos processos fisiológicos, enzimáticos e no proteoma diferencial em cana-de-açúcar. O desenvolvimento do protocolo para extração de proteínas com enriquecimento para parede celular de folhas de cana-de-açúcar foi eficiente e validou a utilização conjunta dos extratos com CaCl_2 e LiCl para maior representatividade do proteoma extracelular nesta espécie. De maneira geral, os estresses impostos nos dois estudos provocaram alterações significativas no proteoma da fração enriquecida de parede celular nas folhas de cana-de-açúcar, bem como, ocasionaram estresse oxidativo nas duas variedades. As proteínas diferencialmente acumuladas identificadas nos dois estudos podem estar associadas a mecanismos de regulação gênica, ligadas as variações fisiológicas, enzimáticas e metabólicas aqui detectadas, potencialmente responsáveis pela tolerância ao déficit hídrico e à radiação UVB. Na aplicação dos estresses simultâneos, seca moderada e UVB, a análise por espectrometria de massas identificou 14 proteínas responsivas a estresses, fotossíntese e enzimas da parede celular associados à biossíntese de ligninas e/ou flavonóides. Durante a interação simultânea com déficit hídrico severo e UVB, o proteoma da cana-de-açúcar em análise por espectrometria de massas identificou 42 proteínas especialmente envolvidas em defesa celular, resposta a estresse abiótico, biossíntese de lignina, síntese de flavonóides e algumas constituintes de parede celular. Os resultados obtidos compõem um conjunto de proteínas (e genes codificantes) promissoras como marcadores funcionais auxiliares no melhoramento genético, para desenvolvimento de variedades tolerantes ao estresse hídrico e UVB.

Palavras-chave: Proteoma extracelular, lignocelulósico, estresses ambientais, déficit hídrico, estresse oxidativo.

Abstract

Sugarcane is one of the main sources of sugar and ethanol in the world. The plant is a hybrid of two species of C₄ grasses, which has high photosynthesis performance. The effects of climate change, such as increased levels of UVB and drought, along with rising oil costs together with strategic energy needs have lead to global actions for the development of research in the area of renewable fuels. Currently, the conversion of lignocellulosic material of the cell wall of sugarcane into fermentable sugars for ethanol production has been regarded as a promising alternative to increase ethanol production required to meet global demand. From the functional point of view, the cell wall is essential for growth and differentiation, signaling, response and defense against biotic and abiotic stresses. Due to the importance of culture and the damage caused by environmental stresses UVB and dry, this work focused three main approaches: the development of a protocol for protein extraction of enriched cell wall in foliar tissue of sugar cane; the study on sugar cane from the interaction between the factors of UVB and moderate drought stresses; and the the study of the charge of the simultaneous stressing factors UVB and severe water deficit, in search of a better understanding of the interaction of these abiotic stresses on physiological and enzymatic processes and on sugarcane differential proteome. The development of the protocol for protein extraction with enrichment of cell wall from sugarcane leaves was efficient and validated the use of extracts with CaCl₂ and LiCl for greater representativity of the extracellular proteome in this species. In general, the stresses imposed on two studies led to significant changes in the proteome of cell wall-enriched fraction in leaves of sugarcane, as well as caused oxidative stress in both varieties. Differentially accumulated proteins identified in both studies could be associated with genetic regulatory mechanisms, physiological variations and linked to enzymes detected potentially responsible for tolerance to water deficit and UVB radiation. On application of the simultaneous stresses, moderate drought and UVB, the analysis by mass spectrometry identified 14 stress-responsive proteins , photosynthesis and cell wall enzymes involved in the biosynthesis of lignins or flavonoids. During the simultaneous interaction with severe water deficit and UVB, the differential proteome of sugarcane in mass spectrometry analysis identified 42 proteins specially involved in cell defense response against abiotic stress, lignin biosynthesis, synthesis of flavonoids and some components of the cell wall. The results comprise a set of proteins (and coding genes) promising as markers in breeding, functionally useful to the development of tolerant varieties to water deficit and UVB.

Keywords: extracellular proteome, lignocellulosic, environmental stresses, water deficit, oxidative stress.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

Figura 1. Espectro de Radiação Ultravioleta (Fonte: theozonhole.com/uvrays.htm)	32
---	----

Capítulo I

Figura 1. Representação esquemática do processo de purificação e extração de proteína da fração enriquecida em parede celular de folhas de cana-de-açúcar - Protocolo A. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Feiz <i>et al.</i> , (2006).....	48
Figura 2. Representação esquemática do processo de isolamento e extração da fração enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar - Protocolo B. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Negri <i>et al.</i> , (2008).....	50
Figura 3. Representação esquemática do processo de isolamento e extração da fração enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar - Protocolo C. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Sultana <i>et al.</i> , (2014)	52
Figure 4. Gel 1D-SDS-PAGE de proteínas de fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar. A: Amostras obtidas através do protocolo A; 1- tampão contendo CaCl_2 ; 2- tampão contendo LiCl ; B: Amostras obtidas através do protocolo B; 1- tampão contendo CaCl_2 ; 2- tampão contendo LiCl ; 3- Fenol). MM: marcador de massa molecular (Kda).....	55
Figura 5. Gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular em folhas de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo B, com modificações. (MM - Marcador Molecular; 1- CaCl_2 ; 2- LiCl ; 3- Fenol; 4- $\text{CaCl}_2+\text{LiCl}$; 5- Fase Citosólica)	56
Figura 6. Fragmentação das bandas do gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, utilizando o protocolo B, com modificações. (MM - Marcador Molecular; 1- CaCl_2 ; 2- LiCl ; 3- Fenol; 4- $\text{CaCl}_2+\text{LiCl}$; 5- Fase Citosólica; 1-8: Numeração dos bandas do gel)	57
Figura 7. Localização subcelular das proteínas de cana-de-açúcar em diferentes extratos obtidos a partir da extração usando o protocolo B	61

Figura 8. Géis 2-DE de folha da fração enriquecida de parede celular de cana-de-açúcar da variedade RB867515 das amostras: CaCl_2 (A), LiCl (B), $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ (A) e Fenol (B)..... 62

Figura 9. Gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. MM: Marcador Molecular; 1- CaCl_2 (1x); 2- CaCl_2 seguido por LiCl (2x); 3- CaCl_2 mais LiCl (2x); 4- CaCl_2 (2x); e LiCl (2x)..... 64

Capítulo II

Figura 1. Imagens da implantação do experimento em casa de vegetação. A) Propagação por fragmentos de secção transversal. B) Plantio desses fragmentos em vasos de polietileno com 22 Kg de solo. C) Teste da Capacidade de Pote. D) Visão geral da disposição dos vasos com plantas aos 90 DAP 79

Figura 2. Esquema da transmissão e bloqueio das radiações UVA, UVB e UVC através dos filtros de poliéster e acetato de celulose 81

Figura 3. Imagens da coleta de folha de cana-de-açúcar sob condições de UVB e estresse hídrico em casa de vegetação para a análise proteômica. A) Coleta da folha +1; B) Armazenamento da folha +1; C) Material coletado imerso em nitrogênio líquido 86

Figura 4. A - Teores de clorofila A; B - teores de clorofila B; e B - teores de carotenóides (C) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade) 93

Figura 5. Potencial hídrico foliar em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)95

Figura 6. Valores médios de: A - condutância estomática (gs); B - fotossíntese líquida (A); C - transpiração foliar (E); e D - eficiência do uso da água (EUA) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)..... 98

Figura 7. Peroxidação lipídica expressa pelo teor de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) e pelo teor de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).....100

Figura 8. A - Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); B - Atividade de APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); e C - Atividade de SOD ($\text{U SOD mg prot.}^{-1}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).....103

Figura 9. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. A) 50% C.P. + BUVB; B) 50% C.P. + AUVB106

Figura 10. Diagrama de Venn representando os *spots* diferencialmente expressos nas folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos submetidos à suspensão parcial da rega com alta UVB (A), nos tratamentos submetidos à suspensão parcial da rega com baixa UVB (B) ou spots comuns no diagrama (C)109

Figura 11. Ontologia Gênica (GO) de peptídeos diferencialmente expressos em plantas de cana-de-açúcar expostas à seca e UVB111

Figura 12. Processo biológico, Função molecular e Localização subcelular por análise GO de DEPs up e down 112

Capítulo III

Figura 1. Plantas com 90 dias após o plantio recebendo aplicação dos tratamentos hídricos e de radiação ultravioleta B (UVB)139

Figura 2. Esquema da transmissão e bloqueio das radiações UVA, UVB e UVC através dos filtros de poliéster e acetato de celulose141

Figura 3. Teor de Umidade do Solo (% vol.) nos solos contendo as plantas de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após

o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; (Letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)..... 154

Figura 4. Teores de clorofila A (A), clorofila B (B), carotenóides (C) e Teor relativo de água (TRA%) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. pelo teste F; (Letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)..... 158

Figura 5. Potencial hídrico Foliar (MPa) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; (Letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)..... 160

Figura 6. A) condutância estomática aos 0 DAT, B) condutância estomática aos 7 DAT, C) transpiração aos 0 DAT, D) transpiração aos 7 DAT, E) eficiência do uso da água aos 0 DAT, F) eficiência do uso da água aos 7 DAT, em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).....166

Figura 7. A - Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); B - Atividade de APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); e C - Atividade de SOD ($\text{U SOD mg prot.}^{-1}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade)..... 169

Figura 8. Peroxidação lipídica expressa pelo teor de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) e pelo teor de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade) 170

Figura 9. Análise 1D-SDS-PAGE de proteínas extraídas a partir de fração enriquecida de parede celular de folhas da variedade RB867515 de cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. Quarenta microgramas de proteínas de cada tratamento (poços 1, 2, 3 e 4) foram carregadas no gel. As proteínas foram coradas com CBB R250. Os marcadores de massa molecular estão indicados em kDa (MM). 1- S.R. + BUVB; 2- 100% C.P. + BUVB; 3- S.R. + AUVB; 4- 100% C.P. + AUVB 173

Figura 10. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. As proteínas (150 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) S.R. + BUVB; B) 100% C.P. + BUVB; C) S.R. + AUVB; D) 100% C.P. + AUVB 174

Figura 11. Diagrama de Venn representando as proteínas anotadas de DEP's em folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos quatro tratamentos: S.R. + AUVB; S.R. + BUVB; 100% C.P. + AUVB e 100% C.P. + BUVB. As anotações comuns no diagrama referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas GS1A, ATPB, FRN e DUF-like) 182

Figura 12. Clusterização por padrão de expressão dos *spots* e das proteínas anotadas 191

Figura 13. Diagramas da análise de componente principal (PCA) 192

Figura 14. A - Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob seca com baixa UVB (S.R. + BUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento; B - Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob seca com baixa UVB (S.R. + BUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB)193

Figura 15. A - Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com baixa UVB (100%CP + BUVB) e irrigação plena com alta UVB (100% CP + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento; B - Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob expressas sob condições de irrigação plena com baixa (100%CP + BUVB) e irrigação plena com alta UVB (100% CP + AUVB)194

Figura 16. A - Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com alta UVB (100%CP + AUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento; B - Distribuição dos DEPs de acordo

com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob expressas sob condições de irrigação plena com alta (100%CP + AUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB)	195
--	-----

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Concentração e rendimento protéico da fração enriquecida de parede celular utilizando o Protocolo B, com modificações, empregando diferentes tampões de extração 56

Tabela 2. Distribuição da anotação presumível e localização subcelular das proteínas identificadas nas bandas coletadas após 1D-SDS-PAGE de amostras conforme protocolo B. As bandas correspondem àquelas indicadas na Figura 6.....58

Tabela 3. Concentração e rendimento protéico da fração enriquecida de parede celular, utilizando o Protocolo C, com diferentes tampões de extração 63

Capítulo II

Tabela 1. Diferentes tratamentos de Irrigação e UVB aplicados em plantas de cana-de-açúcar.....80

Tabela 2. Resumo da análise de variância para os parâmetros Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, aos 7 DAT 92

Tabela 3. Resumo da análise de variância para o parâmetro Potencial hídrico foliar analisado nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, com 7 DAT 94

Tabela 4. Resumo da análise de variância para os parâmetros de trocas gasosas analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa de vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UVB..... 96

Tabela 5. Resumo da análise de variância para os parâmetros de MDA e H₂O₂ analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa-de-vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UVB..... 99

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para os parâmetros de CAT, APX e SOD e analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa de vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UV...101

Tabela 7. Concentração e rendimento de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, submetidas à suspensão parcial da rega com baixa e alta UVB	106
Tabela 8. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento 50% C.P. + BUVB e 50% C.P. + AUVB	108
Tabela 9. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. <i>Ratio</i> refere-se à razão de variação entre as %vol do <i>spot</i> no tratamento de seca sob alta UVB e no tratamento de seca sob baixa UVB. ANOVA refere-se ao valor p calculado para significância estatística da diferença na %vol do <i>spot</i> entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada <i>spot</i> são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. BUVB: baixa radiação ultravioleta B; AUVB: alta radiação ultravioleta B. Expressão Tags admitindo BUVB como referência. * SC: spots comuns	110

Capítulo III

Tabela 1. Diferentes tratamentos de Irrigação e UVB plicados em plantas de cana-de-açúcar	140
Tabela 2. Comparações binárias realizadas com os quatro diferentes tratamentos.....	150
Tabela 3. Resumo da análise de variância para o parâmetro Umidade do Solo analisado nos solos dos vasos contendo as duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, aos 0 e 7 DAT	153
Tabela 4. Resumo da análise de variância para os parâmetros Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas à seca e UVB, simultaneamente, aos sete dias após o início dos tratamentos	156
Tabela 5. Resumo da análise de variância para o parâmetro Potencial hídrico foliar analisado nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 0 e 7 dias após o início dos tratamentos.....	159

Tabela 6. Resumo da análise de variância para os parâmetros Condutância estomática, Fotossíntese líquida, Taxa de transpiração e Eficiência do Uso da Água analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 0 e 7 dias após o início dos tratamentos.....	162
Tabela 7. Resumo da análise de variância para os parâmetros de CAT, APX e SOD e analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 0 e 7 dias após o início dos tratamentos	167
Tabela 8. Quantificação através do método 2D-Quant-Kit (GE HealthCare) de proteínas de fração enriquecida de parede celular de folha da variedade de cana-de-açúcar RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB	172
Tabela 9. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + AUVB e S.R. + BUVB.....	176
Tabela 10. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento 100% C.P. + AUVB e 100% C.P. + BUVB.....	177
Tabela 11. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + AUVB e 100% C.P. + AUVB.....	179
Tabela 12. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + BUVB e 100% C.P. + BUVB.....	180
Tabela 13. Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação	181
Tabela 14. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar por padrão de expressão, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. <i>Ratio</i> refere-se à razão de variação entre as %vol do <i>spot</i> no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor <i>p</i> calculado para significância estatística da diferença na %vol do <i>spot</i> entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada <i>spot</i> são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.....	183
Tabela 15. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme localização subcelular encontrada através do programa Mascot. <i>Ratio</i> refere-se à razão de variação entre as %vol do <i>spot</i> no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor <i>p</i> calculado para significância estatística da diferença na %vol do <i>spot</i> entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$	186

Tabela 16. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme os quatros contrastes entre os tratamentos. Proteínas encontradas através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$ 188

Tabela 17. Localização subcelular das proteínas identificadas 190

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
A	Taxa de fotossíntese líquida
APX	Peroxidase do Ascorbato
AUVB	Alta radiação ultravioleta B
BUVB	Baixa radiação ultravioleta B
CAT	Catalase
CP	Capacidade de Pote
DAP	Dias após o plantio
DAT	Dias após os tratamentos
DEPS	Proteínas diferencialmente expressas
E	Taxa de transpiração
EUA	Eficiência do Uso da Água
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Gs	Condutância estomática
GO	Ontologia Gênica
IEF	Focalização Isoelétrica
MDA	Malondialdeído
MM	Marcador Molecular
MS	Espectrometria de Massas
PAR	<i>Photosynthetically active radiation</i> ,
POD	Peroxidases
PC	Parede Celular
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio

SOD	Superóxido Dismutase
SR	Sem rega
TRA	Teor Relativo de Água
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C

Sumário

1. Introdução	24
2. Revisão da Literatura	27
2.1. A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR: ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NO BRASIL.....	27
2.2 ESTRESSES AMBIENTAIS E SEUS EFEITOS NAS PLANTAS.....	29
2.2.1 Déficit hídrico em plantas	30
2.2.2 Radiação ultravioleta B (UVB) em plantas	31
2.3 PROTEÔMICA VEGETAL	35
2.3.1 Composição e Proteômica da parede celular vegetal	37
3. Objetivos	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4. Capítulo I	41
5. Capítulo II	71
6. Capítulo III	130
7. Discussão Geral	239
8. Conclusões Gerais	242
9. Referências Bibliográficas	243
10. Curriculum vitae (<i>Lattes</i>)	247

1. Introdução

Plantas estão expostas a vários estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação ultravioleta B são alguns dos fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas. No Brasil, dentre estes fatores, o estresse hídrico é o que frequentemente mais limita a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas podem incluir redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática, e geralmente ocorre associado a outros estresses abióticos, tais como alta temperatura e radiação ultravioleta B.

Considerando os impactos ambientais, os efeitos do aumento da radiação ultravioleta B (UVB) sobre as plantas parece ser em função das respostas fotomorfogenéticas. Reduções da área foliar, expressão diferencial de genes e proteínas e, em alguns casos, a acumulação de biomassa têm sido detectadas em várias espécies em resposta aos níveis elevados da UVB solar. Para a maioria das espécies vegetais, reduções no crescimento podem resultar de danos fotoquímicos diretos às macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e carotenóides, ou como consequência indireta da maior produção de espécies reativas de oxigênio em plantas expostas à radiação UVB. Algumas espécies não são afetadas pela radiação supracitada enquanto outras, aparentemente, têm, por exemplo, sua taxa fotossintética aumentada, bem como, em outras, há uma redução nas taxas de fotossíntese. Esta sensibilidade diferencial é parcialmente explicada pela habilidade das espécies em responder à UVB por meio da indução

de mecanismos de defesa juntamente com aumento ou diminuição na concentração de pigmentos e compostos protetores, e também pode ser influenciada pelo regime hídrico e estado nutricional.

Os efeitos das mudanças climáticas, como o aumento dos níveis de radiação UVB e, a elevação nos custos do petróleo aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia, forçaram ações em nível global para o desenvolvimento de pesquisas na área de combustíveis renováveis. A produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar ocorre, atualmente, pela fermentação alcoólica da sacarose. O etanol celulósico produzido a partir dos polissacarídeos da parede celular vegetal é denominado etanol de segunda geração. Atualmente, a conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. Em cana-de-açúcar, um aspecto fundamental é saber quais as implicações e mecanismos envolvidos na bioquímica de parede celular promovidos pela interação dos raios ultravioleta B e seca.

Do ponto de vista funcional, a parede celular é essencial para o crescimento e diferenciação, sinalização, resposta e defesa contra estresses bióticos e abióticos. É uma estrutura complexa composta principalmente por polissacarídeos de elevada massa molecular, proteínas e lignina, este último somente encontrado em alguns tipos de células.

Uma vez que os agentes efetores principais da dinâmica da parede celular são proteínas, estruturais ou catalisadoras, é importante compreender melhor sua complexidade, e o desafio consiste na identificação destas proteínas e suas relações com estrutura/função. Neste contexto, nos últimos anos têm

surgido linhas de pesquisa em proteômica destinadas a analisar perfis de proteínas de parede celular em determinado momento e, em condições ambientais específicas de certos estresses abióticos.

Portanto, neste estudo foram analisadas respostas fisiológicas e enzimáticas de duas variedades de cana-de-açúcar, bem como, a caracterização de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar a fim de gerar informações sobre quais processos podem estar envolvidos na regulação das respostas aos fatores de estresse simultâneos seca e radiação UVB.

2. Revisão da Literatura

2.1. A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR: ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NO BRASIL

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, sendo este gênero composto, principalmente, pelas espécies: *Saccharum officinarum* que é conhecida por cana nobre, por apresentar elevado teor de açúcar. É considerada uma alopoliplóide com $2n=80$, e uma das espécies que mais contribuíram com genes para as cultivares atuais (Ming *et al.*, 1998); *S. spontaneum* ($2n=40$ a 128) embora não seja cultivada, é considerada uma autopoliplóide sendo uma espécie altamente polimórfica. O vigor, o perfilhamento, a capacidade de rebrota da soqueira e tolerância a estresses, doenças e pragas foram as principais contribuições dessa espécie para o melhoramento da cana-de-açúcar. Portanto, a rusticidade das cultivares atuais é, em grande parte, devida aos genes provenientes dessa espécie. *S. robustum* ($2n=60$ a 205) é bastante semelhante a *S. officinarum*, diferindo principalmente no tamanho dos colmos, que podem atingir até 10 m de altura. Cultivadas no passado, *S. sinense* ($2n = 111$ a 120), conhecida como cana da China, e *S. barberi* ($2n=81$ a 124) como cana da Índia, também contribuíram para a formação das variedades atuais (Segato *et al.*, 2006).

Segundo Barbosa (2000) e Cesnik e Miocque (2004), as variedades atuais são provenientes de hibridações interespecíficas entre *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. barberi*. A cana-de-açúcar classificada como *Saccharum* spp, em sua maioria é fértil, e possui número de cromossomos variando de 100 a 130.

É uma planta de reprodução sexuada, preferencialmente por alogamia, e quando cultivada comercialmente é propagada assexuadamente por meio vegetativo. Possui metabolismo fotossintético de carbono C4, apresentando alta eficiência fotossintética e elevado crescimento em regiões com maior temperatura (Larcher, 2004; Taiz e Zeiger, 2009).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Atualmente a área plantada compreende 9,0 milhões de hectares com estimativas da safra para 2015/16 de 663 milhões de toneladas, e uma produtividade média brasileira estimada em 73.214 kg/ha (CONAB, 2015).

O setor canavieiro passa atualmente por um processo de intenso crescimento, impulsionado principalmente pelo aumento na demanda de álcool combustível, tanto no mercado interno em função do avanço da tecnologia dos veículos bicompostíveis, como por um interesse mundial crescente na utilização do bioetanol em mistura à gasolina. Para preservar essa posição num cenário competitivo, o Brasil precisa manter investimentos compatíveis na geração de novas tecnologias e formação de competências (Machado, 2011). Atualmente, a conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada uma alternativa promissora para aumentar em mais de 1/3 a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial.

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é destaque para o cenário mundial em termos de exportação de seus principais produtos: o açúcar e o etanol. No entanto, para que se obtenha um desenvolvimento ideal de cultivo é necessário que haja um sincronismo entre a tecnologia aplicada e as condições edafoclimáticas favoráveis para aumento da produtividade.

2.2 ESTRESSES AMBIENTAIS E SEUS EFEITOS NAS PLANTAS

Estresse por definição corresponde a influência desvantajosa, sobre a planta, provocada por um fator externo (Taiz e Zeiger, 2009). Esses fatores externos podem ter sua origem em seres vivos como: herbivoria, patógenos, biota do solo entre outros; ou ambiental como: temperatura, umidade, radiação ultravioleta, ventos, compostos químicos e/ou estrutura do solo, disponibilidade hídrica entre outros (Bray *et al.*, 2000). O estresse causado por modificações ambientais é designado abiótico.

Plantas, ao contrário dos animais, são sésseis, exigindo que mudanças adversas em seu ambiente sejam rapidamente reconhecidas, distinguidas e respondidas com reações adequadas. Seca, frio, calor e salinidade estão entre os maiores estresses abióticos que afetam negativamente o crescimento das plantas e a produtividade. Em geral, o estresse abiótico muitas vezes provoca uma série de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que afetam desfavoravelmente o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas. Seca, salinidade, radiação, temperaturas extremas (frio ou calor) e estresse oxidativo são frequentemente concomitantes e inter-relacionados, fazendo com que a ocorrência combinada dessas condições induzam danos celulares. Para lidar com estresses abióticos, é de fundamental importância entender as respostas de plantas a estes fatores que perturbam o equilíbrio homeostático em nível celular e molecular, a fim de identificar mecanismos comuns para tolerância ao estresse múltiplo (Bray *et al.*, 2000).

2.2.1 Déficit hídrico em plantas

O estresse por déficit hídrico representa um importante problema para plantas cultivadas principalmente em regiões áridas e semi-áridas, sobretudo porque cerca de um terço da superfície terrestre emersa é árida, e essa porção tende a aumentar nas próximas décadas (Caruso *et al.*, 2009). As plantas precisam se adaptar a essas condições de estresse a fim de manter seu desenvolvimento e ciclo de vida (Pages, 2009).

A limitação do desenvolvimento provocada pela falta de água depende da disponibilidade deste recurso e da eficiência do uso pelo organismo. Algumas plantas apresentam mecanismos de aclimação que são ativados em resposta ao estresse. Assim, déficit hídrico é o conteúdo hídrico de célula ou tecido que se encontra abaixo do nível mais alto de água exibido no máximo de hidratação (Taiz e Zeiger, 2009).

Para sobreviver em situação de estresse hídrico, as plantas utilizam mecanismos de retardo ou tolerância à desidratação. O primeiro diz respeito às vias ativadas na planta para evitar a desidratação dos tecidos. O segundo corresponde aos mecanismos que permitem a planta continuar funcionando em situações de desidratação (Bray *et al.*, 2000; Taiz e Zeiger, 2009). Isso é possível através da ativação de complexas vias moleculares que culminam em alterações fisiológicas, morfológicas e metabólicas a fim de estabelecer a homeostase celular (Pages, 2009). Essas vias moleculares reagem ao estresse hídrico pela alteração da expressão gênica resultando em grandes modificações no proteoma e consequentemente em alterações funcionais (Caruso *et al.*, 2009; Jangpromma *et al.*, 2010; Ngamhui *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

Variedades de cana-de-açúcar de mesma classificação quanto à tolerância podem mostrar diferentes respostas ao nível morfológico, fisiológico e molecular, em virtude de caracteristicamente a cana-de-açúcar possuir controle multigênico para tolerância a estresses abióticos, diferentemente da tolerância a estresse biótico que pode ser considerado monogênico (Rodrigues *et al.*, 2009). Por isso se torna necessário entender as estratégias em nível de expressão gênica na cana-de-açúcar para tolerar os tipos de estresses, tais como os genes que estão envolvidos na sinalização e vias regulatórias, os genes que codificam proteínas que conferem tolerância ao estresse, ou enzimas presentes em vias que levam à síntese de metabólitos funcionais e estruturais (Vinocur e Altman, 2005).

Este cenário é um forte motivador de pesquisas para entender a base genética das defesas ativadas pelas plantas em condições de estresse por falta de água. Esses estudos são a base para a produção de novas variedades com maior tolerância à seca (Menossi *et al.*, 2011).

2.2.2 Radiação ultravioleta B (UVB) em plantas

Diversas culturas agrícolas já foram estudadas em relação às respostas ao aumento na concentração de dióxido de carbono de CO₂, aumento da temperatura e alterações no regime hídrico (Ghini *et al.*, 2011). No entanto, como as alterações atmosféricas envolvem não somente esses efeitos, mas também o aumento na incidência da radiação ultravioleta B devido às alterações climáticas esperadas, os efeitos de outros fatores de estresse devem ser estudados principalmente em conjunto.

Todos os elementos da biosfera estão expostos à radiação UVB sob intensidades que variam conforme o ângulo solar e a espessura da camada de ozônio no local onde se encontram (Figura 1). A camada estratosférica de ozônio é o principal agente atenuador da radiação ultravioleta na atmosfera terrestre e a redução desta camada, resultante da ação antrópica, conduziu a um consequente aumento da UVB (280-320 nm) incidente sobre a superfície terrestre com sérias consequências para todos os organismos vivos (Caldwell *et al.*, 2003).

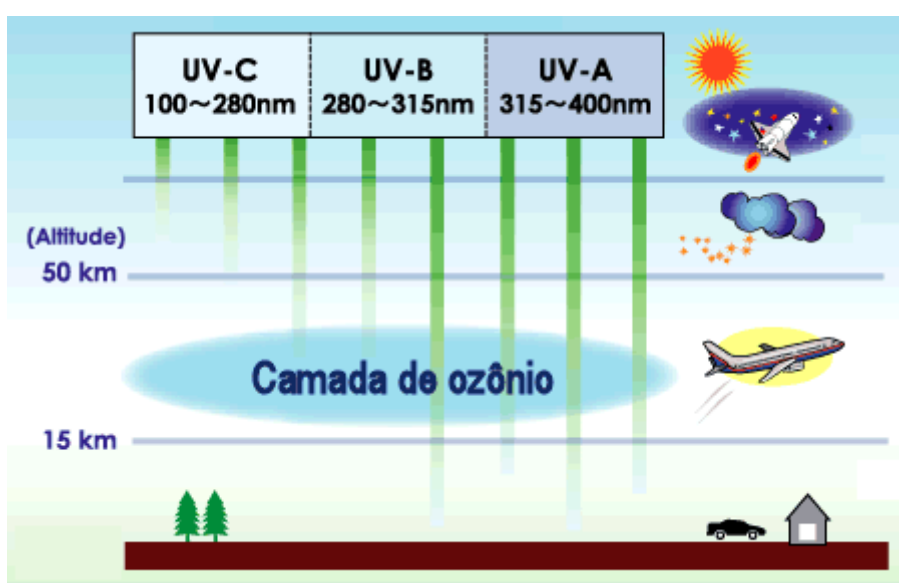


Figura 1. Espectro de Radiação Ultravioleta (Fonte: theozonehole.com/uvrays.htm).

Durante as últimas décadas, a comunidade científica e a população em geral têm demonstrado considerável preocupação acerca da redução da camada de ozônio (Yao e Liu, 2006). O ozônio é uma molécula capaz de absorver a radiação ultravioleta e está presente principalmente na estratosfera, entre 10 e 50 Km acima da superfície da terra. A camada de ozônio absorve grande quantidade da UVB e toda a radiação ultravioleta C (UVC), mas somente uma pequena quantidade da radiação ultravioleta A (UVA). Essa concentração de ozônio varia

naturalmente de acordo com o clima, temperatura, latitude e altitude (Bischof *et al.*, 2006).

As plantas, em geral, possuem folhas que devem estar física e bioquimicamente adaptadas para reter luz solar e servir como sítio de realização da fotossíntese. Contudo, para satisfazer ambos os critérios, a folha pode estar também exposta a níveis excessivos de PAR (*photosynthetically active radiation*, ou radiação fotossinteticamente ativa), com perda ou ganho de radiação infravermelha, e a fótons prejudiciais presentes no intervalo da radiação ultravioleta-B, entre 290 e 320 nm (Sullivan, 2003).

Embora represente apenas uma mínima fração do espectro eletromagnético solar, a UVB tem um efeito fotobiológico desproporcionalmente grande. Uma das razões é que a UVB é absorvida facilmente por macromoléculas importantes, tais como as proteínas e ácidos nucleicos (Bischof *et al.*, 2006).

O aumento na incidência de UVB promove diversas respostas mediadas por processos fotomorfogenéticos nas plantas. Devido a danos fotoquímicos ou por consequência indireta da maior produção de espécies reativas de oxigênio, as macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos podem sofrer danos estruturais. Concomitantemente, são observadas reduções da área foliar de plantas, alterações no crescimento, desenvolvimento, menor acúmulo de biomassa e mudanças no metabolismo vegetal. Muitas espécies de plantas respondem negativamente a ação da UVB, mas efeitos neutros ou positivos têm sido reportados na literatura. Esta sensibilidade diferencial é parcialmente explicada pela capacidade das espécies em responder à UVB por meio da indução de mecanismos de defesa, juntamente com aumento na concentração de

pigmentos e compostos protetores (Hidema *et al.*, 2001), e também é influenciada pelo regime hídrico e estado nutricional.

Quando expostas à elevada radiação UVB, as plantas exibem uma grande variedade de respostas, dependendo da espécie, cultivar, estágio de desenvolvimento e condições experimentais às quais são submetidas. Vários estudos realizados evidenciam as diferentes respostas das plantas ao aumento na exposição à UVB (Ries *et al.*, 2000; Day *et al.*, 2001; Hidema *et al.*, 2001; Frohnmeyer e Staiger, 2003; Zuk-Golaszewska, 2003; Casati *et al.*, 2005; Boeger e Poulson, 2006; Mpoloka, 2008; Newsham e Robinson, 2009; Du *et al.*, 2011). A partir desses estudos, foram reconhecidos efeitos diretos e indiretos da radiação UVB na planta inteira.

As plantas respondem a radiação UVB por meio de adaptações morfológicas e fisiológicas, mas os mecanismos celulares e moleculares que controlam essas adaptações são pouco conhecidos. Alguns estudos evidenciaram a expressão diferencial de genes relacionados à resposta vegetal ao estresse por radiação UVB (Frohnmeyer e Staiger, 2003; Ries *et al.*, 2000), mas sem definir se essas mudanças são refletidas na abundância de proteínas ou se atuam primeiramente na forma de modificações pós-traducionais. Assim, analisar as proteínas produzidas sob estes estresses, em amostras contrastantes, permite a identificação, bem como provê informações sobre a abundância de proteínas em condições adversas, além de informações sobre modificações pós-traducionais.

Estudos recentes têm mostrado que a UVB induz certo número de mecanismos de defesa, tais como aumento das enzimas antioxidantes e indução de proteínas relacionadas com patogênese, mediados ao nível de expressão do gene. As vias de transdução de sinais, através das quais a UVB regula a

expressão dos genes, são atualmente pouco compreendidos. Estudos realizados indicam um papel fundamental para as espécies reativas de oxigênio como principais mensageiros secundários agindo à montante de uma série de vias que envolvem hormônios vegetais como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (Soheila e Mackerness, 2000).

Em cana-de-açúcar, dois aspectos são fundamentais para a investigação dos efeitos da alta incidência de radiação UVB: i) se a redução da fotossíntese e o consequente menor acúmulo de biomassa já verificado em regiões temperadas/árticas também tende a ocorrer nas zonas tropicais e subtropicais, exatamente nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar brasileiras; e ii) quais as implicações da maior interação dos raios UVB e seca com a bioquímica de parede celular (ex. *cross-linking* de lignina).

2.3 PROTEÔMICA VEGETAL

Proteínas são as moléculas efetoras das funções biológicas e participam de cada uma das etapas de expressão gênica interagindo inclusive com o DNA e o RNA (Baerenfaller *et al.*, 2008). Dessa necessidade de entender funcionalmente o genoma, surge a proteômica que tem como objetivo a identificação, em larga escala, de todas as proteínas da célula ou tecido. Contudo, hoje é amplamente aplicada a análise de diversos aspectos funcionais como modificações pós-traducionais, localização subcelular, interação proteína-proteína (Chen e Harmon, 2006) e, a proteômica diferencial. Associada à eletroforese bidimensional, a espectrometria de massas é utilizada para identificação de diferenças no acúmulo de proteínas quando o tecido ou célula é exposto a diferentes condições (Komatsu e Yano, 2006).

Dentre as abordagens de proteômica diferencial mais aplicadas às plantas estão as modificações provocadas por estresse biótico e abiótico (Rossignol *et al.*, 2006). As plantas, durante todo seu ciclo de vida, estão constantemente expostas a ampla gama de estresses, que provocam diversas modificações fisiológicas, bioquímicas e metabólicas nesses organismos (Bray *et al.*, 2000; Taiz e Zeiger, 2009). Para sobreviver, as plantas utilizam principalmente mecanismos moleculares que alteram a expressão gênica em resposta ao estresse (Vitamvas *et al.*, 2007; Kosová *et al.*, 2011). Essa estratégia de sobrevivência as torna alvos desse tipo de abordagem de análise proteômica.

Estresses abióticos podem ser extremamente limitantes ao bom desenvolvimento das culturas agrícolas (Kosová *et al.*, 2011). Diversos tipos de estresses abióticos já foram abordados através da proteômica diferencial destacando-se: estresse por baixa e alta temperatura (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000), estresse por seca (Shinozaki *et al.*, 2003; Ali e Komatsu (2006); Caruso *et al.*, 2009), estresse por encharcamento (Dennis *et al.*, 2000; James *et al.*, 2011), estresse por excesso de radiação (Wu *et al.*, 2011; Casati *et al.*, 2005), estresse por excesso ou falta de nutrientes (Kang *et al.*, 2004) e excesso de sais (Abbasi e Komatsu, 2004; Aghaei *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2013).

Um dos objetivos de se traçar o perfil proteômico é a obtenção de proteínas que sirvam como marcadores moleculares funcionais relacionados ao estresse em questão. Os marcadores moleculares podem ser obtidos diretamente do DNA ou podem ser marcadores bioquímicos, como são chamados os marcadores de origem protéica (Kosová *et al.*, 2011). Como as proteínas são resultado final da expressão do gene e mais próxima do fenótipo, podem servir como sinalizadoras para seleção de certos fenótipos (Ramalho *et al.*, 2008).

Assim, essas proteínas são potenciais marcadores moleculares para identificar tolerância ou sensibilidade ao estresse por déficit hídrico.

A identificação de proteínas (genes) responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular podem proporcionar a obtenção de variedades bem sucedidas, reduzindo drasticamente as perdas na agricultura, além de permitir o aproveitamento de áreas até então não utilizáveis. Com a identificação de novos genes, pode-se acelerar o ritmo do melhoramento, que podem ser usados, de forma dirigida, para a obtenção de variedades mais produtivas e mais adaptadas a diferentes tipos de solo e clima e mais resistentes a pragas e doenças (Segato *et al.*, 2006).

2.3.1 Composição e Proteômica da parede celular vegetal

Uma estrutura dinâmica essencial que contribui para a morfologia geral das células, a parede celular está envolvida em processos fundamentais para a sobrevivência das plantas como o crescimento celular, divisão e diferenciação, mas também para a resposta a estresses ambientais (Kaczowski, 2003). Além disso, é uma importante fonte de sinais para reconhecimento molecular dentro da mesma célula ou entre diferentes organismos. Cada tipo de célula é envolvido por uma parede celular específica, levando a uma grande diversidade de estruturas da parede celular e composições (Pont-Lezica *et al.*, 2010).

A parede celular da planta é uma composição de polímeros interligados que envolvem as células de plantas. Entre estes polímeros, polissacarídeos são a maioria, sendo estas geralmente agrupadas em três classes: celulose, hemiceluloses e pectinas. Geralmente, os polissacarídeos constituem 80-90% da

parede, os outros componentes sendo compostos de proteínas e compostos fenólicos tais como a lignina. Proteínas da parede celular ou são do tipo estrutural (proteínas ricas em glicina e prolina) ou enzimas (Lima *et al.*, 2001).

A dimensão e complexidade do proteoma da parede celular ressaltam a sua natureza multifuncional e, de fato, a expressão regulada de proteínas da parede celular foi observada em associação com uma ampla gama de eventos de desenvolvimento, processos metabólicos e em resposta a estímulos externos. Estes incluem a expansão e diferenciação celular, em que a montagem da parede, a deposição, reorganização e desmontagem seletiva requerem as atividades de um complexo de enzimas localizadas na parede celular, incluindo hidrolases de polissacarídeos, liases, transglicosilases e outras proteínas que influenciam a estrutura de parede. Enzimas adicionais, tais como peroxidases, acredita-se, desempenham papel no *cross-link* de polissacarídeos com a cessação da expansão para enrijecer a parede. Expansão celular é regulada por diversos estímulos ambientais, tais como a gravidade, luz, anoxia, estresse hídrico, e os hormônios. Alguns relatos descrevem correlações entre esses fatores regulatórios e mudanças na estrutura de polissacarídeos da parede primária e na expressão de proteínas localizadas na parede, atividades enzimáticas ou genes correspondentes (Lee *et al.*, 2004).

As análises de proteínas a partir das frações enriquecidas de paredes celulares de órgãos e de tecidos de muitas plantas têm sido bastante relatadas (Lee *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004; Boudart *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Jamet *et al.*, 2006, 2008a,b; San Clemente *et al.*, 2009), em conjunto com metodologias detalhadas para otimizar a extração (Feiz *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2007; Jamet *et al.*, 2008b; Negri *et al.*, 2008; Sultana *et al.*, 2014). Estas resultaram em

catálogos de proteínas cuja identidade correspondem a funções conhecidas associadas a processos relacionados à parede, tais como a modificação do polissacarídeos, defesa e sinalização, e algumas com função desconhecida.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas produzidas diferencialmente em frações enriquecidas de parede celular de cana-de-açúcar e potencialmente associadas aos mecanismos de resposta por estresse de radiação ultravioleta B e seca, simultaneamente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer protocolo de extração de proteínas de fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar;
- Avaliar as respostas fisiológicas e antioxidantes de duas variedades de cana-de-açúcar sob condições adversas de estresse simultâneo por seca e radiação UVB;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas em fração enriquecida de parede celular em folhas de cana-de-açúcar expostas concomitantemente à radiação UVB e seca;
- Inferir possíveis funções das proteínas, através de anotação presumível, e determinar prováveis mecanismos envolvidos nas respostas à seca e radiação UVB.

4. Capítulo I

Isolamento e extração de proteínas da fração enriquecida de parede celular de
folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Amanda Emanuella Rocha de Souza¹, Tercilio Calsa Junior¹

¹Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética,
Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Brasil

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

.

Resumo

A parede celular é uma estrutura dinâmica essencialmente envolvida em diversos processos fundamentais para a sobrevivência das plantas, como o crescimento celular, divisão e diferenciação, mas também para a resposta a estresses ambientais. Além de suas diversas funções biológicas, os componentes polissacarídicos constituintes das paredes celulares vegetais são de vital importância como fonte natural de fibras, sendo consideradas as fontes principais de recursos renováveis do planeta, utilizados como matéria prima para diversos processos industriais, dentre eles a produção de papel e celulose, carvão vegetal e biocombustíveis. São vários os desafios encontrados ao estudar o proteoma extracelular de plantas. As paredes de células vegetais possuem dificuldades específicas, como a ausência de uma membrana circundante podendo resultar na perda de proteínas da parede celular durante o procedimento de isolamento, e redes de celulose and hemiceluloses, formando potenciais armadilhas que aprisionam contaminantes, tais como proteínas intracelulares. Um dos passos cruciais na proteômica é a obtenção da amostra protéica, sendo fundamental o processo de padronização e otimização do protocolo experimental. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de isolamento e extração de proteínas de fração enriquecida de parede celular para folhas de cana-de-açúcar. Dessa forma, nesse estudo foram avaliados e otimizados três protocolos (A, B e C) de isolamento e extração de proteínas de fração enriquecida de parede celular para cana-de-açúcar. Após a realização da extração de proteínas, os extratos protéicos obtidos pelos três protocolos foram analisados por SDS-PAGE (12,5%) e fragmentos do gel de amostras obtidas pelo protocolo selecionado por apresentar maior concentração e rendimento protéico, foram excisados e analisados através da espectrometria de massas. As proteínas identificadas foram classificadas conforme sua localização subcelular. O extrato protéico obtido a partir da extração utilizando o Protocolo B, contendo CaCl_2 + LiCl no tampão, foi o que obteve maior proporção de proteínas com localização subcelular relacionadas à parede celular. Os protocolos B e C, com modificações, utilizando os métodos de extração contendo os tampões combinados de CaCl_2 e LiCl foram os que apresentaram maior rendimento de proteínas e, portanto, se mostraram eficientes para estudos de análise proteômica diferencial em parede celular de folhas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: proteoma extracelular, estabelecimento de protocolo, polissacarídeos, CaCl_2 , LiCl.

Abstract

The cell wall is a dynamic structure mainly involved in several fundamental processes to the survival of plants such as cell growth, division and differentiation, but also for the response to environmental stresses. In addition to its various biological functions, polysaccharide components of plant cell walls are of vital importance as natural source of fiber, being considered the main renewable resource used as raw material for various industrial processes, including the production of pulp and paper, coal and biofuels. There are several challenges encountered when studying the extracellular proteome. The walls of plant cells have specific difficulties, such as the lack of a surrounding membrane which can result in the loss of cell wall proteins during the isolation procedure, and networks of cellulose and hemicelluloses forming potential pitfalls that trap contaminants such intracellular proteins. One of the crucial steps in proteomics is to obtain the protein sample, being fundamental to the process of standardization and optimization of the experimental protocol. This work aimed to establish a protocol for isolation and extraction of protein-enriched fraction of cell wall for leaves of sugarcane. Thus, in this study were evaluated and optimized three protocols (A, B and C) isolation and extraction of protein-enriched fraction of cell wall for sugarcane. After the completion of the extraction of proteins, protein extracts obtained by three protocols were analyzed by SDS-PAGE (12,5%) and gel fragments of samples obtained by the selected protocol for presenting greater concentration and protein yield, were excised and analyzed by mass spectrometry. The proteins identified were classified as their subcellular location. The protein extract obtained from the extraction using the Protocol B, containing LiCl CaCl₂ in the CAP, that's what obtained a higher proportion of protein subcellular location related to the cell wall. The protocols B and C, with modifications, using the extraction methods containing the combined caps of CaCl₂ and LiCl were those who had higher protein yield and, therefore, were efficient and enable the study of differential proteomics analysis in cell wall of leaves of sugarcane.

Keywords: extracellular proteome, establishing protocol, polysaccharides, LiCl, CaCl₂.

4.1 INTRODUÇÃO

As paredes celulares vegetais são estruturas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Keegstra, 2010). Além de suas diversas funções biológicas, os componentes polissacarídicos constituintes das paredes celulares (celulose, hemiceluloses e pectinas) são de vital importância como fonte natural de fibras, sendo consideradas as fontes principais de recursos renováveis do planeta, utilizados como matéria prima para diversos processos industriais, dentre eles, a produção de papel e celulose, carvão vegetal e biocombustíveis. Todos esses fatores têm despertado grande interesse no estudo da composição e biossíntese das paredes celulares (Venketachalam *et al*, 2013).

A parede celular da planta pode ser vista como a matriz estrutural que encapsula as células, formando a estrutura mecânica que define a arquitetura da planta. Neste contexto, paredes vegetais são frequentemente classificadas como primária ou secundária; a primeira está associada com tecidos jovens em crescimento e diferenciação, e a segunda com fases de desenvolvimento terminais em que o tamanho e forma da célula são permanentemente estabelecidos. A parede primária de grande parte dos vegetais é composta por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose, os polissacarídeos não-celulósicos - hemiceluloses e pectinas - e as proteínas estruturais. A investigação de diversos processos biológicos em plantas tem resultado em uma lista cada vez mais crescente de componentes de desenvolvimento direta ou indiretamente influenciados por interações moleculares localizadas na parede e vias de sinalização (Hoson, 1998; Lee *et al.*, 2004).

Diversas classes de proteínas localizadas na parede celular são frequentemente descritas como pertencendo a uma de duas categorias básicas:

proteínas estruturais, tipicamente imobilizadas dentro da parede e que compreendem cerca de 5-10% do peso seco da parede; ou proteínas apoplásticas solúveis, incluindo muitas enzimas que geralmente são mais facilmente extraídas de tecidos vegetais (Cassab e Vamer, 1988; Showalter, 1993).

São vários os desafios encontrados ao estudar o proteoma extracelular de plantas. Paredes de células vegetais possuem dificuldades específicas, como a ausência de uma membrana circundante podendo resultar na perda de proteínas da parede celular durante o procedimento de isolamento, e redes de polissacarídeos de celulose, hemiceluloses e pectinas, formando potenciais armadilhas que aprisionam contaminantes, tais como proteínas intracelulares. Vários procedimentos relatados para extrair o proteoma de parede celular para análise conduziram ao co-isolamento de uma elevada percentagem de proteínas intracelulares previstas (mais de 50%; Feiz *et al*, 2006), levando a uma série de abordagens experimentais desenvolvidas para reduzir essas dificuldades.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de isolamento e extração de proteínas de fração enriquecida de parede celular para folhas de cana-de-açúcar.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para seleção e estabelecimento de protocolo para folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), foram realizados testes com três protocolos de isolamento e extração protéica de parede celular de plantas. As amostras protéicas neste teste foram obtidas de folhas +1 de cana-de-açúcar (variedade RB962962), não submetidas a estresses ambientais. As proteínas da fração enriquecida de parede celular foram purificadas e extraídas pelo método proposto por Feiz *et al*, (2006) com algumas modificações (protocolo A); Negri *et al*, (2008) com algumas modificações (protocolo B) e, por fim, pelo método sugerido por Sultana *et al*, (2014), com modificações (protocolo C).

4.2.1 Protocolo A (Feiz *et al.*, 2006)

No protocolo A, proteínas foram extraídas por um processo sequencial que utiliza tampões contendo CaCl_2 (2x) ou LiCl (2x). Para o isolamento da fração enriquecida de parede celular, as amostras de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionadas de tampão de baixa força iônica [tampão de acetato 5 mM, pH 4,6 e 0,4 M sacarose (Figura 1)]. PVPP (polivinil-polipirrolidona) foi adicionada ao homogeneizado, e este foi centrifugado. O sedimento resultante foi ressuspenso em tampão de acetato 5 mM, pH 4,6, com o aumento das concentrações de sacarose (0,6 M e 1 M), e centrifugadas. O resíduo (PC3) foi lavado à vácuo em uma membrana de nylon (tamanho de poro 25 μm) com cerca de 500 mL de tampão 5 mM de acetato (pH 4,6) para 5 g de material vegetal fresco. A fração enriquecida de parede celular resultante foi macerada em almofariz com nitrogênio líquido para reduzir o tamanho das partículas até se obter um pó fino, auxiliando a extração subsequente de proteínas e, em seguida

foi liofilizada. O pó liofilizado (PC4) foi extraído sequencialmente com sais para remoção de proteínas ionicamente ligadas à matriz de polissacarídeos. Essas proteínas foram extraídas com duas etapas sucessivas de lavagens e centrifugações utilizando 6 mL de tampão contendo cloreto de cálcio (tampão acetato 5 mM, pH 4,6 e 0,2 M de CaCl_2), seguido por duas etapas sucessivas de lavagens e centrifugações utilizando 6 mL tampão contendo cloreto de lítio (tampão acetato 5 mM, pH 4,6 e 2 M de LiCl), conforme ilustrado na Figura 1.

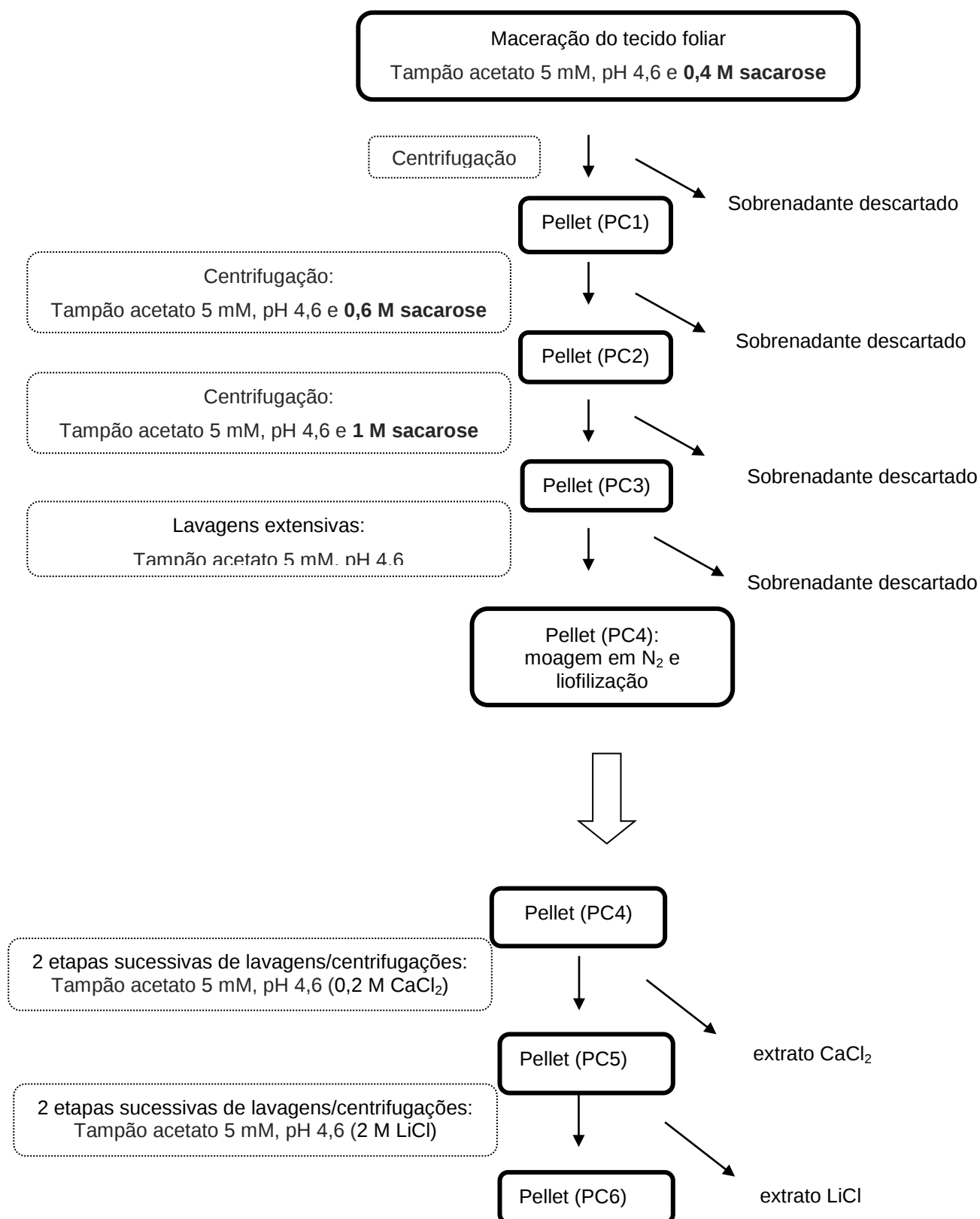


Figura 1. Representação esquemática do processo de purificação e extração de proteína da fração enriquecida em parede celular de folhas de cana-de-açúcar - Protocolo A. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Feiz *et al.*, (2006).

4.2.2 Protocolo B (Negri *et al.*, 2008)

No protocolo B a parede celular foi tratada utilizando dois procedimentos distintos: o primeiro foi tratado com tampões contendo CaCl_2 (2x) e LiCl (1x), em etapas sucessivas, ou, em alternativa, com a combinação dos dois extratos de CaCl_2 e LiCl . O segundo procedimento foi tratado com fenol seguido por precipitação com acetato de amônio em metanol (Hurkman e Tanaka, 1986). Amostras de folhas congeladas (5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido após a adição de 15% (w/w) PVPP e homogeneizados em 20 mL de tampão de extração [0,7 M de sacarose, 0,5 M de Tris-HCl, pH 8, 10 mM de sal dissódico de EDTA, ácido cítrico a 4 mM, 1 mM fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) e 0,4% (v/v) de β -mercaptoetanol 0,4%] em gelo, incubadas à 4°C sob agitação durante 30 minutos e depois centrifugado a 7.000 rcf durante 30 min. O pellet resultante correspondeu a fração enriquecida em parede celular (PC). Para remover os contaminantes, a PC foi lavada três vezes com 20 mL de 6% (w/v) de solução PVP-40 (Figura 2). As proteínas da fração enriquecida de parede celular foram extraídas utilizando dois procedimentos distintos. No primeiro, as proteínas foram extraídas por incubação da fração enriquecida de parede celular duas vezes com 10 mL tampão acetato de sódio 50 mM e 200 mM de CaCl_2 , durante 1 h a 4°C, seguido por uma extração com 10 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e 3M de LiCl , durante 1 h a 4°C. Depois de cada etapa, os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação a 13.000g durante 30 min. Os extratos de CaCl_2 foram combinados e, depois, as proteínas das frações de CaCl_2 e LiCl foram lavadas três vezes com acetona 80% (v/v). Os sedimentos finais obtidos foram secos, dissolvidos em Uréia e Tiouréia (8:2) e armazenados à -80°C. No segundo procedimento, o pellet final da fração enriquecida de parede celular (PC) foi

ressuspensão em 15 mL de tampão de extração e, em seguida, misturado com o mesmo volume de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5). As proteínas foram então extraídas utilizando o protocolo de Hurkman e Tanaka (1986), com modificações conforme Boaretto (2012).

Após a realização da extração de proteínas, os extratos protéicos obtidos pelos protocolos A e B foram quantificados pelo método de Bradford (1976), e analisados por SDS-PAGE (12,5%). Fragmentos do gel SDS-PAGE de amostras obtidas pelo protocolo B foram selecionados, por apresentar maior rendimento e perfil eletroforético diferente da amostra citoplasmática, excisados e analisados através da espectrometria de massas.

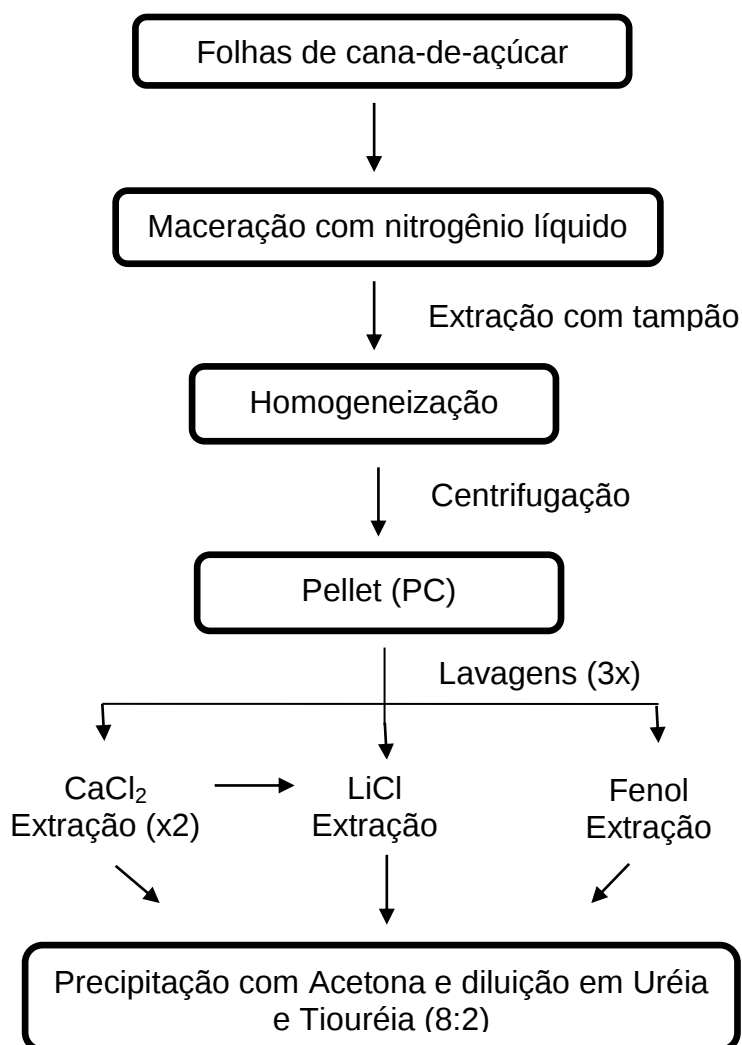


Figura 2. Representação esquemática do processo de isolamento e extração da fração enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar - Protocolo B. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Negri *et al.*, (2008).

4.2.3 Protocolo C (Sultana *et al.*, 2014)

No protocolo C, as proteínas foram extraídas utilizando extrações sequenciais alternativas com os tampões de CaCl_2 (2x) e LiCl (2x) e também com combinações alternativas desses extratos. As proteínas da fração enriquecida da parede celular foram extraídas de acordo com a metodologia sugerida por Sultana *et al.*, (2014) com algumas alterações, que por sua vez, é uma variação do protocolo de Feiz *et al.*, (2006). Cerca de 1 g de folha de amostra foliar foi triturada em nitrogênio líquido e extraído com 5 ml de tampão [acetato de potássio 5 mM (pH 4,6), sacarose 0,5 M, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM de PMSF e 0,4% (v/v) de β -mercaptoetanol]. O homogeneizado foi centrifugado a 7.000 rcf durante 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foi descartado e o pellet foi lavado e centrifugado (7.000 rcf durante 20 min) seis vezes com 5 ml de tampão de acetato de potássio 5 mM (pH 4,6) para remover a sacarose e inibidores da protease. O sobrenadante foi descartado e as proteínas da fração enriquecida de parede celular foram extraídas com duas extrações sequenciais com 2,5 mL de tampão acetato de potássio contendo 0,2 M de CaCl_2 , seguido de duas extrações com 2,5 mL de tampão acetato de potássio contendo de 2 M de LiCl (Figura 3). A concentração protéica foi determinada pelo kit 2D-Quant (GE HealthCare), conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

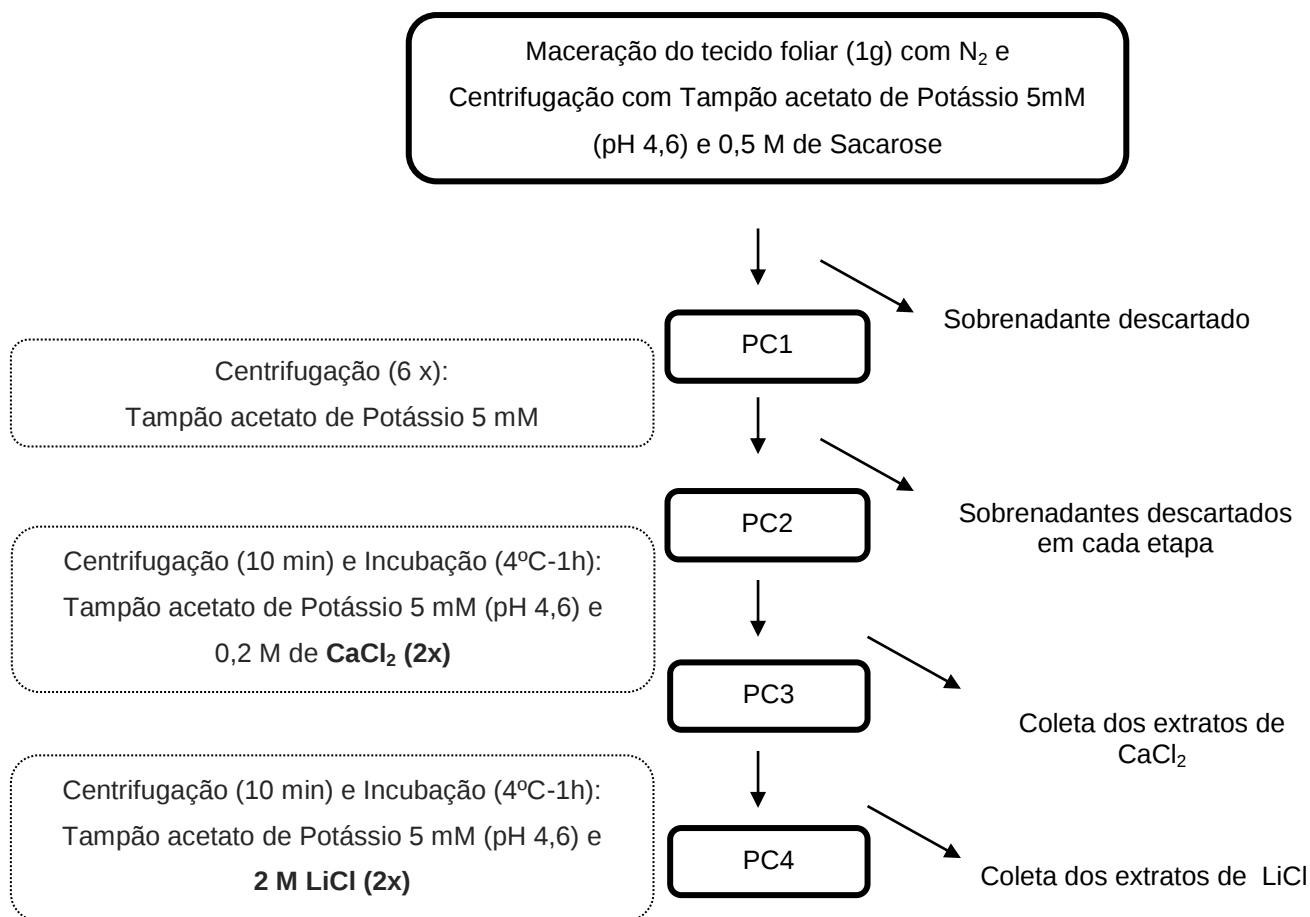


Figura 3. Representação esquemática do processo de isolamento e extração da fração enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar - Protocolo C. PC: pellet enriquecido com parede celular. Adaptado de Sultana *et al.*, (2014).

4.2.4 Espectrometria de massas e Identificação presumível

Os fragmentos do gel SDS-PAGE contendo bandas de proteínas (protocolo B) foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 50% de metanol e 2,5% de ácido acético durante 18 h, em temperatura ambiente, seguido de desidratação com solução de acetonitrila (100%). Em seguida, as proteínas foram reduzidas com solução de 10 mM de DTT (Ditiotreitol) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min à 60°C. Em seguida, o excesso de líquido foi retirado e foi adicionado 30 µL de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio para serem

alquiladas, também por 30 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido excedente foi removido e os fragmentos lavados com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratados com acetonitrila (100%) por três vezes. Finalizadas estas etapas, foi adicionada cerca de 30 a 50 μL a solução contendo tripsina na concentração de 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e incubado a 37 °C em banho seco, overnight (16h), garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao fragmento foi adicionada a solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila] e após 40 minutos em banho de gelo, a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

Os espectros MS foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE, usando matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - *peptide mass fingerprinting*; método refletido positivo RP_Proteomics_HPC). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

Para MS, os espectros foram identificados através da análise dos arquivos peaklist.xml no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra o banco de dados de plantas (Viridiplantae) disponível na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de

dados: Swissprot; taxonomia: Viridiplantae; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância 200 ppm. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior que o valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a $-10.\log(P)$, sendo P a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância estatística ($p < 0,05$). Os acessos significativamente identificados foram submetidos à busca na ferramenta Retrieve ID na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>), para detalhes dos descritores das proteínas anotadas.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise comparativa - Protocolos A e B

Foi observado um padrão de migração não uniforme para amostras de folha nos dois protocolos, sendo detectadas no protocolo A (Figura 4A) algumas bandas entre 14,4 e 40,2 kDa enquanto que, no protocolo B (Figura 4B) foram observadas algumas bandas entre 20,1 e 66 kDa. As amostras apresentaram concentração média distinta na extração protéica de fração enriquecida de parede celular, conforme o protocolo e tampão utilizado, de acordo com a concentração final do extrato obtido. No protocolo A, a concentração média observada foi de 1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (tampão contendo CaCl_2) e 0,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (tampão contendo LiCl). Já no protocolo B, foram verificadas as concentrações de 1,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando utilizada a extração com tampão contendo CaCl_2 , 1,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando utilizada a extração com tampão contendo LiCl e, 2,35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando utilizada a extração fenólica.

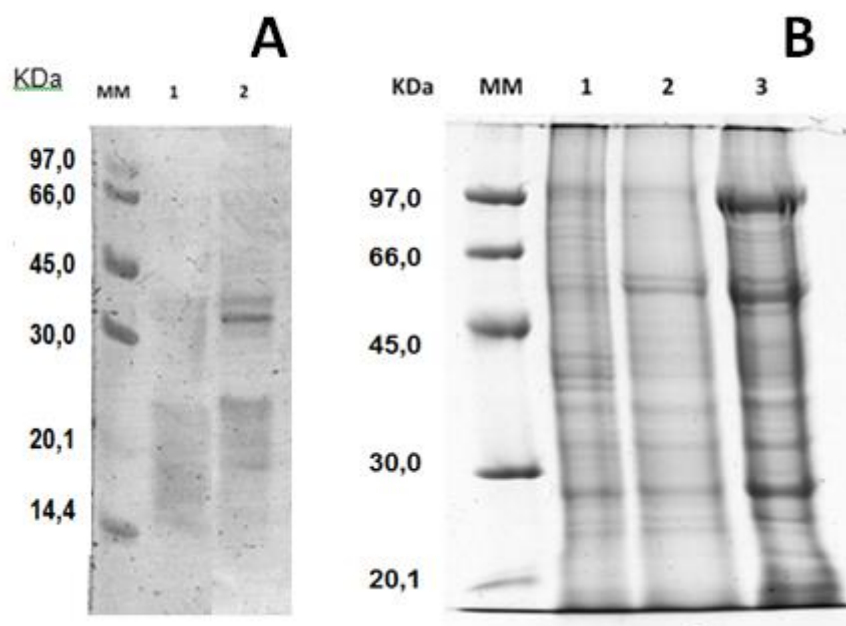


Figura 4. Gel 1D-SDS-PAGE de proteínas de fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar. A: Amostras obtidas através do protocolo A; 1- tampão contendo CaCl_2 ; 2- tampão contendo LiCl ; B: Amostras obtidas através do protocolo B; 1- tampão contendo CaCl_2 ; 2- tampão contendo LiCl ; 3- Fenol. MM: marcador de massa molecular (kDa).

A partir desses resultados obtidos anteriormente, foi decidido utilizar o protocolo B (Negri *et al.*, 2008; com modificações) para a realização de um novo teste de isolamento e extração de proteínas de fração enriquecida de parede celular para combinar os sobrenadantes de CaCl_2 e LiCl , com o intuito de obter um melhor resultado na quantidade e qualidade de proteínas, bem como para realizar posteriormente análise 2-DE e identificação das proteínas via espectrometria de massas desse teste de protocolo. As proteínas apresentaram massa molecular entre de 14,4 e mais de 97,0 kDa (Figura 5).

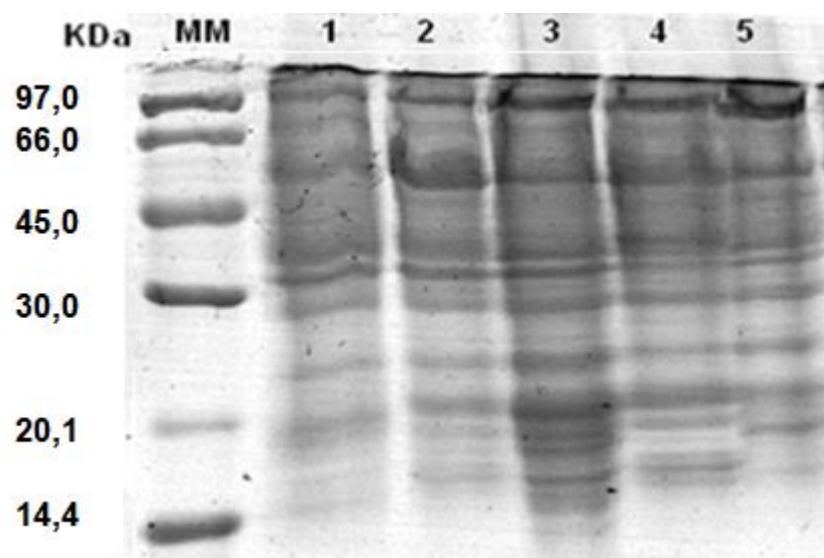


Figura 5. Gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular em folhas de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo B, com modificações. (MM - Marcador Molecular; 1- CaCl_2 ; 2- LiCl ; 3- Fenol; 4- $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$; 5- Fase Citosólica).

Os valores médios da concentração e rendimento de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha em cana-de-açúcar são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração e rendimento protéico da fração enriquecida de parede celular utilizando o Protocolo B, com modificações, empregando diferentes tampões de extração.

Tampão de Extração	Concentração protéica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimento protéico ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Tampão contendo CaCl_2	1,87	56,4
Tampão contendo LiCl	1,81	54,6
Fenol	1,84	55,5
Tampão contendo $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$	1,90	57,0
Citosol	2,02	60,6

4.3.2 Identificação de proteínas de 1D-SDS-PAGE - Protocolo B

Fragmentos do gel SDS-PAGE foram selecionados (Figura 6), excisados, analisados através da espectrometria de massa e identificados, presumidamente, para análise qualitativa das proteínas. Foram excisados oito bandas de cada amostra, totalizando a análise de 40 bandas.

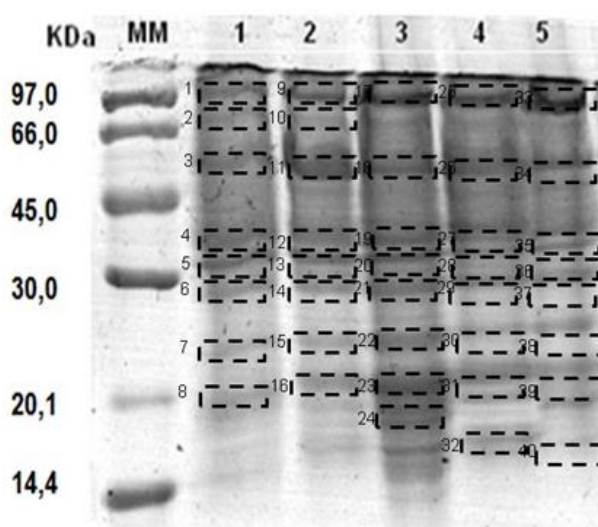


Figura 6. Fragmentação das bandas do gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, utilizando o protocolo B, com modificações. (MM - Marcador Molecular; 1- CaCl_2 ; 2- LiCl ; 3- Fenol; 4- $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$; 5- Fase Citosólica; 1-8: Numeração dos bandas do gel).

As proteínas identificadas foram classificadas conforme sua localização subcelular (Tabela 2; Figura 7). O extrato protéico obtido a partir da extração utilizando o Protocolo B, contendo $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ no tampão, foi o que obteve uma maior proporção de proteínas com localização subcelular relacionadas à parede celular.

Sendo assim, o protocolo B, com modificações, utilizando o método de extração contendo os tampões combinados de CaCl_2 e LiCl se mostrou eficiente e, portanto, é considerado vivável para as análises de amostras enriquecidas de parede celular de folhas de cana-de-açúcar.

Tabela 2. Distribuição da anotação presumível e localização subcelular das proteínas identificadas nas bandas coletadas após 1D-SDS-PAGE de amostras conforme protocolo B. As bandas correspondem àquelas indicadas na Figura 6.

Banda	Proteína	Anotação presumível	Espécie ortóloga	S	PC	MP	G	V	C	P	M	RE	N	RPC(%)	
CaCl ₂															
1	Q9ZSA2	Proteína quinase 21 dependente de cálcio	Arabidopsis thaliana		X	X			X						
2	Q8LFD5	Proteína desconhecida At4g13230	Arabidopsis thaliana						X						
3	Q93ZG7	RNA helicase/DEAD-box 38 dependente de ATP	Arabidopsis thaliana			X			X				X		
4	Q8LFD5	Proteína desconhecida At4g13230	Arabidopsis thaliana						X						
5	P52838	Flavonol sulfotransferase	Flaveria bidentis						X						
6	Q9SVI0	Proteína secretora 41 com repetição rica em Cys	Arabidopsis thaliana	X	X										
7	P49087	Subunidade A da ATPase tipo V/H ⁺	Zea mays					X							
8	Q41373	Subunidade menor da RuBisCO	Saccharum hybrid							X					
				%	7,7	15,4	15,4	0,0	7,7	38,5	7,7	0,0	0,0	7,7	38,5
LiCl															
9	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
10	Q8S8U4	Subunidade H da NAD(P)H-quinona oxidoreductase	Atropa belladonna							X					
11	P00827	ATP sintase beta	Zea mays							X					
12	Q9M365	Proteína com domínio F-box At3g61730	Arabidopsis thaliana										X		
	Q9LSQ6	Proteína de ligação ao cálcio	Arabidopsis thaliana		X	X									
13	B4FHF0	Fator de alongação Ts	Zea mays								X				
14	Q9M365	Proteína com domínio F-box At3g61730	Arabidopsis thaliana										X		
15	Q9FX60	Histona H3	Arabidopsis thaliana										X		
16	P28582	Proteína quinase dependente de cálcio	Daucus carota			X									
				%	0,0	8,3	16,7	8,3	0,0	8,3	25,0	8,3	0,0	25,0	33,3

CaCl₂: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio; LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de lítio; CaCl₂ + LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio mais o Cloreto de lítio; S: secretada, extracelular; PC: de parede celular, apoplasto; MP: de membrana plasmática; G: das vesículas do aparelho de Golgi; V: vacuolar; C: citoplasmática, citossólica; P: cloroplastidial; M: mitocondrial; RE: do retículo endoplasmático; N: nuclear; RPC(%): porcentagem de localizações subcelulares associadas à parede celular (S+PC+MP+G).

CaCl ₂ +LiCl				S	PC	MP	G	V	C	P	M	RE	N	RPC(%)	
17	Q9FH13	Regulador da proteína ribonuclease 3	Arabidopsis thaliana						X					X	
18	P33154	Proteína relacionada à patogênese 1	Arabidopsis thaliana	X	X										
19	P00827	ATP sintase beta	Zea mays							X					
20	Q06GS5	ATP sintase alfa	Piper cenocladum							X					
21	Q9FH57	Fator de transcrição GATA 5	Arabidopsis thaliana											X	
	O82772	Beta-glucosidase 25 inativa	Arabidopsis thaliana									X			
22	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
	Q9SSX0	Proteína 1 de ligação ao GTP similar à Rac	Oryza sativa			X			X						
23	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
24	Q56WK6	Patelina 1	Arabidopsis thaliana		X	X	X	X							
	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
	P92554	Proteína desconhecida AtMg01240	Arabidopsis thaliana									X			
	Q94AA9	Xilogalacturonana beta-1,3-xilosiltransferase	Arabidopsis thaliana			X	X								
	P83171	Proteína antifúngica ginkbilobina 1	Ginkgo biloba		X	X									
	Q39096	Proteína 15 de resposta precoce à desidratação	Arabidopsis thaliana						X						
	Q9FH57	Fator de transcrição GATA 5	Arabidopsis thaliana											X	
	Q9LV45	Proteína com domínio F-box At3g24580	Arabidopsis thaliana											X	
				%	3,2	9,7	12,9	16,1	3,2	19,4	16,1	3,2	3,2	12,9	41,9
Fenol															
25	Q5YK50	Maturase K	Ceratonia siliqua							X					
26	F4JN05	Proteína 4 de transporte de guanina-nucleotídeo	Arabidopsis thaliana			X			X						
27	P00827	ATP sintase beta	Zea mays							X					
28	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
29	P31191	Subunidade maior da RuBisCO	Ilex aquifolium							X					
30	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
31	C6TAY1	Flavonóide 4'-O-metiltransferase	Glycine max			X			X						
32	Q41811	Histona H4.3	Zea mays											X	
				%	0,0	0,0	14,3	14,3	0,0	28,6	35,7	0,0	0,0	7,1	28,6

CaCl₂: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio; LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de lítio; CaCl₂ + LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio mais o Cloreto de lítio; S: secretada, extracelular; PC: de parede celular, apoplasto; MP: de membrana plasmática; G: das vesículas do aparelho de Golgi; V: vacuolar; C: citoplasmática, citossólica; P: cloroplastidial; M: mitocondrial; RE: do retículo endoplasmático; N: nuclear; RPC(%): porcentagem de localizações subcelulares associadas à parede celular (S+PC+MP+G).

Solúvel				S	PC	MP	G	V	C	P	M	RE	N	RPC(%)	
33	P04711	PEP carboxilase 1	Zea mays						X						
34	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
35	Q9ZR26	Antocianidina 3-O-glucosídeo 5-O-glucosiltransferase 2	Perilla frutescens						X						
	P30709	Inibidor de tripsina A	Momordica charantia	X	X										
36	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
37	Q03194	ATPase 4	Nicotiana plumbaginifolia			X									
38	Q6AUR2	Proteína P-II regulatória de nitrogênio	Oryza sativa				X		X	X					
	Q85V01	Proteína ribossômica S18 30S	Larix decidua							X					
39	A2Y720	Proteína tardia da embriogênese 3	Oryza sativa						X						
40	Q9M316	Proteína com repetição pentatricopeptídeo At3g61520	Arabidopsis thaliana								X				
				%	5,9	5,9	5,9	17,6	0,0	35,3	23,5	5,9	0,0	0,0	35,3

CaCl₂: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio; LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de lítio; CaCl₂ + LiCl: Tampão de extração contendo Cloreto de cálcio mais o Cloreto de lítio; S: secretada, extracelular; PC: de parede celular, apoplasto; MP: de membrana plasmática; G: das vesículas do aparelho de Golgi; V: vacuolar; C: citoplasmática, citossólica; P: cloroplastidial; M: mitocondrial; RE: do retículo endoplasmático; N: nuclear; RPC(%): porcentagem de localizações subcelulares associadas à parede celular (S+PC+MP+G).

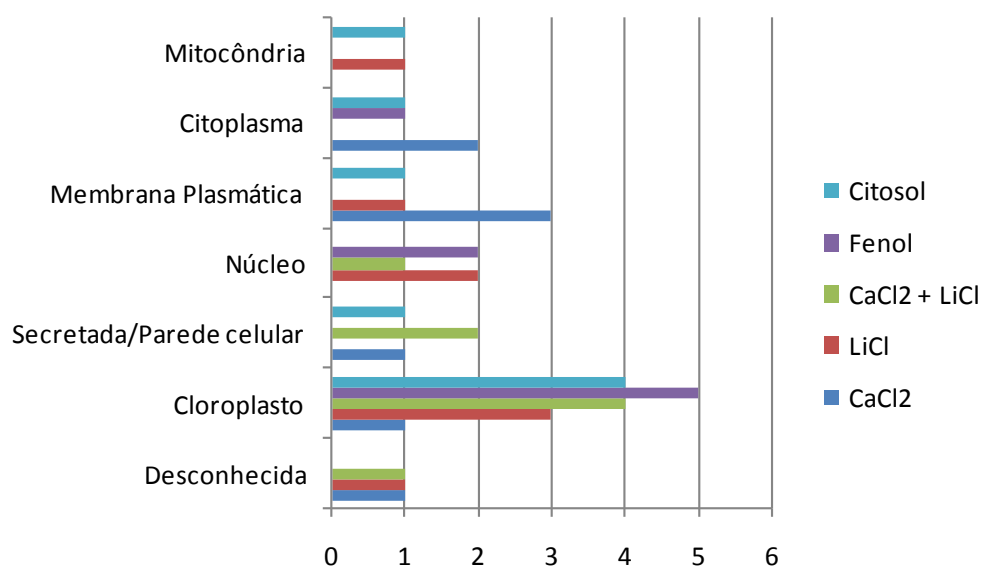


Figura 7. Localização subcelular das proteínas de cana-de-açúcar em diferentes extratos obtidos a partir da extração usando o protocolo B

4.3.3 Análise do gel 2-DE - Teste (Protocolo B)

As proteínas dos extratos obtidos no teste de Protocolo B foram separadas por eletroforese bidimensional, possibilitando a visualização das mesmas de acordo com o peso molecular e o pH, usando pH imobilizado em gradiente de 3 a 10. Ocorreu separação eletroforética adequada nas duas dimensões e a 2-DE resultou em quatro géis (Figura 8).

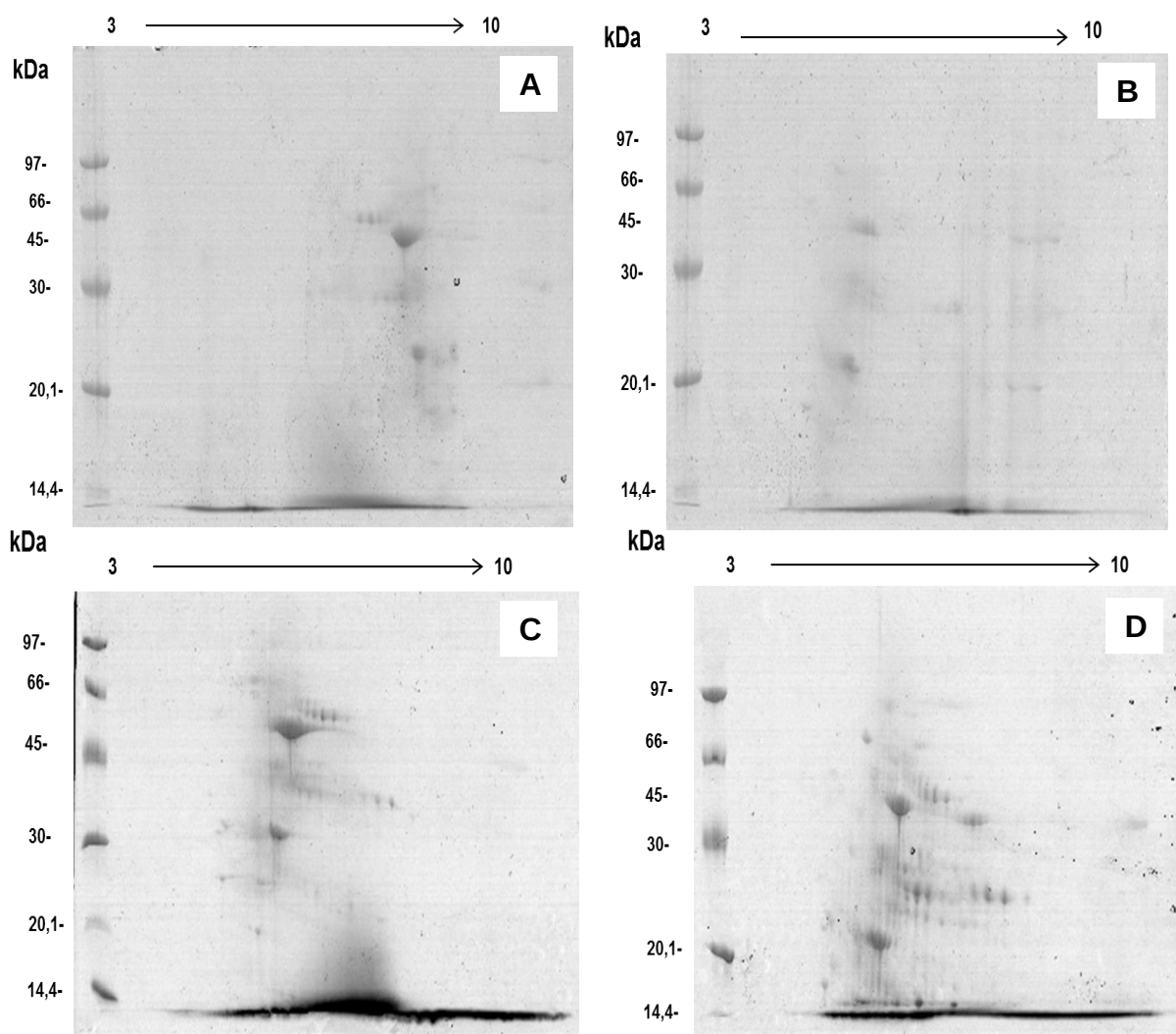


Figura 8. Géis 2-DE de folha da fração enriquecida de parede celular de cana-de-açúcar da variedade RB867515 das amostras: CaCl_2 (A), LiCl (B), $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ (C) e Fenol (D).

4.3.4 Análise do gel SDS-PAGE - Teste (Protocolo C)

Com o objetivo de aperfeiçoar os resultados, a partir dos testes anteriores, foi realizado um novo teste de extração protéica da fração enriquecida de parede celular utilizando um novo protocolo que empregava elementos dos dois protocolos testados anteriormente (Protocolos A e B), com algumas modificações, com a vantagem adicional de utilizar quantidade bastante reduzida de material vegetal, facilitando a execução da extração de proteínas. Os valores

médios da concentração e rendimento de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha em cana-de-açúcar são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração e rendimento protéico da fração enriquecida de parede celular, utilizando o Protocolo C, com diferentes tampões de extração.

Tampão de extração	Concentração protéica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimento ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Tampão contendo CaCl_2 (1x)	0,33	49,5
Tampão contendo CaCl_2 seguido de LiCl (2x)	1,04	156
Tampão contendo CaCl_2 mais o LiCl (2x)	1,83	274,5
Tampão contendo CaCl_2 (2x)	3,46	519
Tampão contendo LiCl (2x)	1,46	219

As análises em SDS-PAGE (Figura 9) mostraram que os extratos protéicos de folhas obtidos com os diferentes tampões apresentaram bandas que variaram de 20,1 a 66 kDa. Comparando-se os padrões das bandas, pode-se observar que as amostras obtidas com o extrato protéico contendo o tampões CaCl_2 (2x) e $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ apresentaram um maior número de bandas.

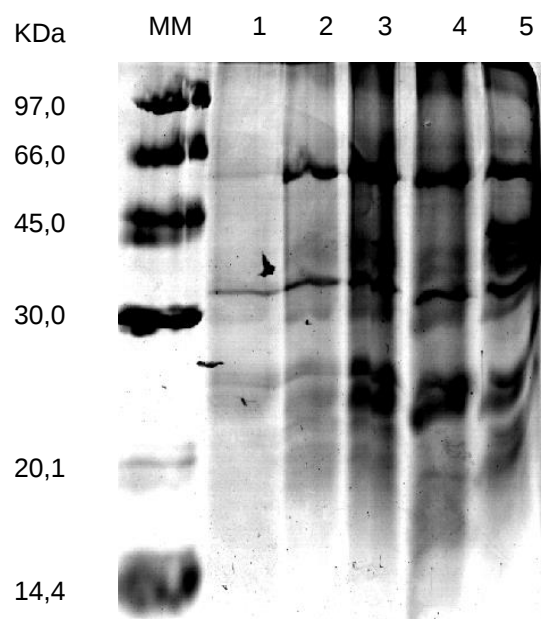


Figura 9. Gel SDS-PAGE das proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. MM: Marcador Molecular; 1- CaCl_2 (1x); 2- CaCl_2 seguido por LiCl (2x); 3- CaCl_2 mais LiCl (2x); 4- CaCl_2 (2x); e LiCl (2x).

4.4 DISCUSSÃO

Análise comparativa - Protocolos A e B

A partir da quantificação e visualização, observou-se que em amostras de folhas de cana-de-açúcar, o método do protocolo B permitiu extração de maior quantidade de proteínas. No Protocolo A, a quantificação foi eficiente, entretanto as proteínas não se encontraram íntegras no gel, sugerindo degradação, e poderiam conter interferentes que possuem afinidade pelo reagente de Bradford, podendo alterar os valores da quantificação.

A análise de SDS-PAGE revelou a integridade das proteínas obtidas nesse processo de extração e que os subconjuntos de proteínas de fração enriquecida de parede celular obtidos com lavagens sucessivas, são distintos para cada reagente empregado (Figura 4). As extrações de proteínas recuperadas e as bandas de gel tiveram boa resolução. Além disso, mesmo nesta dimensão, é possível observar grupos diferenciados de proteínas em cada tampão ou método de extração utilizado.

Os resultados demonstram que entre os diferentes tipos de extrações, o tampão contendo $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ foi o que obteve um maior rendimento de proteínas. As proteínas da fase citosólica também foram extraídas, uma vez que, durante a extração alguns resíduos da parede celular podem se ligar a outros compartimentos celulares (Lee *et al.*, 2004; Jamet *et al.*, 2006).

Identificação de proteínas de 1D-SDS-PAGE - Protocolo B

Dos 40 fragmentos do gel SDS-PAGE selecionados (Figura 6) e excisados, foram obtidos espectros de massa identificados presumidamente que permitiram análise qualitativa das proteínas. Visualmente foi possível identificar variações entre padrões de bandas de proteínas em cada fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar conforme o extrato utilizado, demonstrando eficiências diferentes entre os principais componentes extratores (Ca, Li e fenol) e também entre possíveis contaminantes de frações intracelulares.

A Tabela 2 apresenta a distribuição da anotação presumível das proteínas identificadas nas bandas coletadas, a partir dos espectros de massa obtidos para os peptídeos produzidos pela digestão *in gel* das amostras com tripsina. Apesar de provavelmente haver um grande número de proteínas diferentes em cada fragmento de gel, apenas em 6 das 40 bandas (15%) foi possível identificar peptídeos derivados de mais de uma proteína diferente, o que enfatiza o aspecto qualitativo desta análise.

As proteínas identificadas foram agrupadas conforme sua localização subcelular (Tabela 2; Figura 7) e extrato, de modo a inferir a eficiência da metodologia utilizada em extrair proteínas de parede celular. Como esperado, em todas as frações com os extratores houve presença considerável de “contaminantes” intracelulares, principalmente de proteínas citossólicas e cloroplastidiais. Em todos os extratos foi identificado entre 28 e 41% de proteínas associadas à parede celular ou a estruturas física e funcionalmente relacionadas à parede celular (membrana plasmática e aparelho de Golgi). A única fração sem nenhuma proteína especificamente de parede celular ou secretada foi àquela obtida com fenol.

Considerando, em cada extrato, o conjunto de proteínas com localização associada à parede celular, a extração utilizando o Protocolo B contendo CaCl_2 + LiCl no tampão foi a que obteve maior proporção de proteínas com localização subcelular relacionadas à parede celular. Dada a dificuldade experimental na purificação de proteínas de parede celular de plantas já descrita inclusive para espécies modelo (Feiz *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2014), com órgãos menos lignificados e com menor teor de silício que cana-de-açúcar, o enriquecimento para parede celular no proteoma extraído de folhas desta espécie foi adequado, uma vez que aumentou de aproximadamente 1% para até 41,9% a fração de proteínas extraídas de parede celular.

Assim, o protocolo B, com modificações, utilizando o método de extração contendo os tampões combinados de CaCl_2 e LiCl se mostrou eficiente e, portanto, viabiliza os estudos de análise proteômica diferencial em amostras enriquecidas de parede celular de folhas de cana-de-açúcar.

Análise do gel 2-DE - Teste (Protocolo B)

As proteínas dos extratos obtidos no teste de Protocolo B foram separadas por eletroforese bidimensional para visualização dos perfis diferenciais entre os extratos (Figura 8), os quais sugeriram que CaCl_2 apresenta capacidade extratora maior que LiCl , e a extração fenólica leva ao co-isolamento de proteínas não-extraídas por Ca e/ou Li e, portanto, possivelmente intracelulares.

Análise do gel SDS-PAGE - Teste (Protocolo C)

Com o objetivo de obter melhor eficiência, realizou-se um novo teste de extração protéica da fração enriquecida de parede celular utilizando um novo protocolo sugerido por Sultana *et al.* (2014), publicado mais recentemente que os demais, e que utiliza elementos dos Protocolos A e B, com modificações, a partir de uma menor quantidade de material vegetal.

De acordo com os resultados obtidos, os tampões contendo CaCl_2 (2x) e o tampão contendo CaCl_2 mais o LiCl (2x) foram os que proporcionaram maior rendimento na extração de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar, quando comparados com os demais tampões. A extração desse método, utilizando o tampão contendo CaCl_2 (2x) se mostrou mais eficaz, com uma concentração e rendimento protéico de 3,46 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 519 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente. A extração utilizando o tampão com CaCl_2 mais o LiCl foi eficiente e obteve uma concentração e rendimento protéico de 1,83 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 274,5 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente. Entretanto, diversos estudos de extração de proteínas de parede celular utilizam os dois sais para este fim. Diante deste fato, o protocolo C, utilizando o método de extração com o tampão contendo $\text{CaCl}_2 + \text{LiCl}$ também se mostrou eficiente para o isolamento e extração de proteínas da fração enriquecida de parede celular e, portanto, pode ser utilizado para amostras foliares de frações enriquecidas de parede celular de cana-de-açúcar.

4.5 CONCLUSÕES

A purificação e extração de proteínas com enriquecimento para parede celular de folhas de cana-de-açúcar foi viável para o aumento em até 41% no

proteoma foliar, e validou a utilização conjunta dos extratos com CaCl_2 e LiCl para maior representatividade do proteoma de parede celular nesta espécie.

A identificação presumível por espectrometria de massas de proteínas associadas a parede celular confirmou o enriquecimento desta fração subcelular, viabilizando os estudos de proteômica diferencial em parede celular de cana-de-açúcar.

4.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES-DS e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boaretto LF (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose. Doutorado (Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba 177p.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:48-254.
- Cassab GI, Varner JE (1988) Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 39:321-353.
- Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H, Jamet E (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant Methods* 2:10.
- Hoson T (1998) Apoplast as the site of response to environmental signals. *J Plant Res* 111:167-177.
- Hurkman WJ and Tanaka CK (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol* 81:802-806.
- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11:33-39.
- Keegstra K (2010) Plant Cell Walls. *Plant Physiology* 154:483-486.
- Lee S-J, Saravanan RS, Damasceno CMB, Yamane H, Kim B-D, Rose JKC (2004) Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:979-988.

- Negri AS, Prinsi B, Scienza A, Morgutti S, Cocucci M, Espen L (2008) Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *Journal of Plant Physiology* 165:1379-1389.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.
- Sultana N, Florance HV, Johns A, Smirnoff N (2014) Ascorbate deficiency influences the leaf cell wall glycoproteome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 38(2):375-84.
- Venketachalam S, Pattathil S, Kandemkavil S, Sharma S (2013) Analyses of Cell Wall Glycans Using Glycome Profiling in Two Commercially Important Lignocellulosic Fiber Raw Materials. *J Textile Sci Eng* S1:001.

5. Capítulo II

Fisiologia e Proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e estresse hídrico
moderado

Amanda Emanuella Rocha de Souza¹, Tercilio Calsa Junior¹

¹Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética,
Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Brasil

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e no cenário atual, em que a crescente demanda por energia renovável é visível, o aumento na produtividade da cana em meio às mudanças climáticas previstas é de extremo interesse para o setor sucroalcooleiro. As plantas estão expostas a diferentes estresses ambientais que podem afetar direta ou indiretamente o estado fisiológico de um organismo, alterando o seu metabolismo, crescimento, desenvolvimento e produtividade. Seca e radiação ultravioleta B são alguns dos fatores de estresse mais importantes que podem limitar a produtividade das culturas como a cana-de-açúcar e, sendo assim, estudos relacionados com a tentativa de diminuir esses impactos na produtividade são de grande importância. Dessa forma, as análises fisiológicas e enzimáticas, bem como, a análise das proteínas envolvidas na resposta a fatores bióticos devem auxiliar no entendimento dos mecanismos de defesa da cana-de-açúcar quando exposta ao estresse simultâneo de restrição hídrica e UVB. Plantas de cana-de-açúcar (variedade RB867515 e RB92579) com três meses de idade foram submetidas ao estresse hídrico moderado concomitante a dois níveis de UVB. No presente trabalho, foi analisado o comportamento fisiológico, enzimático e o proteoma da fração enriquecida de parede celular da cana-de-açúcar submetida à UVB e seca moderada por 2-DE (Eletroforese bidimensional) seguida de MS (Espectrometria de massa). Diante dos resultados obtidos, se verificou que o estresse hídrico moderado associado à UVB, não foi suficiente para promover efeitos significativos em algumas das variáveis fisiológicas e enzimáticas, como no conteúdo de Clorofilas e Carotenóides, Potencial Hídrico Foliar e, no conteúdo das enzimas Catalase e Ascorbato Peroxidase. A alta radiação UVB promoveu processo lipoperoxidativo nas membranas foliares avaliado como o conteúdo de MDA, independente do regime hídrico. Os resultados da eletroforese bidimensional mostraram que 69 spots apresentaram nível de expressão alterado. A análise por espectrometria de massa identificou 14 proteínas. Essas proteínas diferencialmente expressas foram associadas principalmente com resposta a estresses ambientais, componentes de fotossistemas e biossíntese de lignina e flavonóides. Aproximadamente 22% das proteínas foram identificadas com localização na parede celular e/ou potencialmente envolvidas em estruturas extracelulares, exclusivamente sob alta UVB. Essas proteínas identificadas especialmente envolvidas na resposta aos estresses ambientais e constituintes da parede celular se revelam como promissoras para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares funcionais para a identificação e desenvolvimento de variedades tolerantes ao estresse hídrico e UVB.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, restrição hídrica, proteoma extracelular, Malondialdeído.

Abstract

The Brazil is the largest producer of sugarcane and in the current scenario, in which the growing demand for renewable energy is visible, the increase in productivity of sugarcane amidst climate change envisaged is of extreme interest to the sugar-ethanol sector. The plants are exposed to different environmental stresses that may affect directly or indirectly the physiological state of an organism by changing your metabolism, growth, development and productivity. Drought and ultraviolet B radiation are some of the most important stress factors that can limit the productivity of crops like sugarcane and, therefore, studies related to attempt to mitigate these impacts on productivity are of great importance. Thus, the physiological and enzymatic analyses, as well as the analysis of proteins involved in response to biotic factors should assist in the understanding of the mechanisms of sugarcane tolerance when exposed to water restriction and the excessive UVB. Plants of sugarcane (varieties RB867515 and RB92579) with three months of age were subjected to moderate water deficit concomitant at two levels of UVB. In this work, the physiological/enzymatic behavior and the proteome of the enriched cell wall fraction of sugarcane submitted to UVB and moderate drought were analyzed by 2-DE (two-dimensional electrophoresis) followed by MS (mass spectrometry). It was found that moderate water deficit stress associated with UVB was not enough to promote significant effects on some of the physiological, enzymatic variables, nor on the content of chlorophylls and carotenoids, leaf water potential and activities of the enzymes catalase and ascorbate peroxidase. High UVB radiation promoted leaf membranes lipoperoxidative process as evaluated in the contents of MDA, independently of the water regime. Two-dimensional electrophoresis results showed that 69 *spots* showed expression level changes. Mass spectrometry analysis identified 14 differentially expressed proteins, which could be putatively associated with responses to environmental stresses, components of photosystems components and biosynthesis of lignin and flavonoids. Approximately 22% of proteins have been identified as located in the cell wall and/or potentially involved in extracellular structures exclusively under high UVB. The identified proteins specially involved in responses to environmental stresses and cell wall constituents may be useful for the development of functional molecular biomarkers and development of new varieties more tolerant to water deficit and UVB stresses.

Keywords: climate change, water restriction, extracellular proteome, malondialdehyde.

5.1 INTRODUÇÃO

A produção da cana-de-açúcar, assim como todas as culturas agrícolas, é influenciada por um grande número de fatores ambientais. A busca por altos rendimentos a baixos custos implica em conhecer mais detalhadamente a fisiologia e a genética da cultura, com o objetivo de racionalizar as relações entre os diferentes fatores de produção visando o máximo desempenho. O sucesso da indústria canavieira, indubitavelmente está atrelado ao desenvolvimento de cultivares que se adaptem bem ao clima, ao solo e às características intrínsecas de uma dada região de interesse. No Brasil, especialmente na região Nordeste, se destacam as variedades RB (Rebública Brasileira) lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-Açúcar, conduzido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro - RIDESA. Essas variedades RB caracterizam-se pela alta produtividade e adaptação às condições edafoclimáticas de cada região produtora (Simões Neto *et al.*, 2005).

Sob condições naturais de campo, as plantas estão frequentemente expostas a inúmeras variáveis ambientais que podem atuar adversamente em seu desempenho. Altas ou baixas temperaturas, inundação, poluentes, alta incidência de radiação ultravioleta B e excesso ou falta de água são alguns desses estresses ambientais que afetam negativamente o metabolismo das plantas (Lawlor, 2002).

A falta de água no solo é o que frequentemente mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática. O déficit hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de

respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Taiz e Zeiger, 2009).

As plantas também estão sujeitas aos efeitos das mudanças ambientais globais causadas pelas atividades antrópicas, tais como o aumento na incidência da radiação ultravioleta B em virtude da destruição da camada de ozônio, acarretando em um consequente aumento deste tipo de radiação. A radiação ultravioleta tem sido considerada potencialmente geradora de estresse oxidativo em plantas, principalmente na faixa de 280-320 nm, o que corresponde à radiação tipo UVB (Caldwell *et al.*, 2003; McKenzie *et al.*, 2003).

Alta radiação UVB pode ser potencialmente prejudicial para muitos organismos e tem recebido atenção considerável nos últimos anos. Aumento de UVB pode reduzir o crescimento de algumas plantas, mas, por outro lado, as plantas podem desenvolver mecanismos protetores contra o estresse UVB, tais como o reforço do sistema antioxidante e acumulação de pigmentos ou compostos que absorvem UVB (Brosche e Strid, 2003). Em plantas, os efeitos diretos incluem danos no DNA, alterações nas membranas e desnaturação das proteínas, o que muitas vezes pode causar mutações hereditárias que afetam vários processos fisiológicos, incluindo o aparato fotossintético. Dessa forma, estresses abióticos, como a seca e a UVB causam o estresse oxidativo gerado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (Zlatev e Lindon, 2012).

As plantas na natureza dificilmente são afetadas por um único fator de estresse isoladamente. Consequentemente, essas plantas respondem a diversos fatores atuando simultaneamente, tais como estresse hídrico, aumento da radiação UVB, aumento da concentração de CO₂, disponibilidade de nutrientes,

temperatura, entre outros. As alterações de outros fatores ambientais são susceptíveis de modificar os impactos da radiação UVB sobre as plantas, enquanto que, por sua vez as mudanças nos níveis de incidência de UVB podem alterar a maneira com que as plantas respondem aos outros fatores ambientais. Vários fatores têm sido relatados por modificar as respostas induzidas por UVB nas plantas, agravando ou atenuando os efeitos da radiação UVB. No entanto, as respostas simultâneas de plantas para a combinação de níveis elevados de radiação UVB e de outros fatores, tais como a seca são menos estudados e, portanto, bem menos compreendidos (Caldwell *et al.*, 1998).

Sob essas perspectivas de mudanças climáticas, com previsões de aumentos na falta de água e na incidência aos raios ultravioleta B e os possíveis efeitos prejudiciais promovidos pela interação desses estresses ambientais, juntamente com a crescente preocupação mundial com o esgotamento de energias não renováveis, vem impulsionando os estudos na área de energias limpas e renováveis. Nesse contexto, a cana-de-açúcar se apresenta como uma alternativa na conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico) e vem sendo considerada como uma opção promissora para aumentar a produção de bioetanol necessária para atender à demanda mundial.

A parede celular da planta é uma estrutura altamente dinâmica que, além de proporcionar suporte mecânico, precisa responder a vários estímulos ambientais e de desenvolvimento e cumpre funções importantes em eventos de sinalização, defesa contra estresses bióticos e abióticos, e crescimento através da expressão diferencial de genes/proteínas. A parede celular representa um grande compartimento de armazenamento de energia e, muito da energia solar captada

pelas plantas é fotossinteticamente convertida em energia química bloqueado nos polímeros da parede celular: celulose, hemicelulose, e lignina (Lewandowski *et al.*, 2003).

Conhecimentos sobre as proteínas da parede celular da cana-de-açúcar através de estudos utilizando proteômica diferencial contribuem para produzir mais informações sobre esse compartimento da célula, e, indiretamente, colaborar para a viabilização do etanol celulósico, eliminando resíduos e cooperando para a geração de energia. A proteômica da parede celular das culturas pode também fornecer mais informações dos mecanismos subjacentes da resposta das plantas a estresses ambientais, que podem ser úteis para a bioengenharia de plantas mais tolerantes (Komatsu e Yanagawa, 2013). No entanto, pesquisas realizadas até o momento sobre as alterações no proteoma da parede celular em resposta a estresses simultâneos são bastante resumido.

Portanto, a pesquisa sobre os efeitos da interação dos estresses UVB e seca no comportamento fisiológico, antioxidante e proteômico da fração enriquecida em parede celular é essencial para uma melhor compreensão do mecanismo das respostas das plantas de cana-de-açúcar aos múltiplos estresses, o que é benéfico para o desenvolvimento de futuras estratégias de melhoramento desta cultura. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou identificar o conjunto de proteínas ativadas ou inibidas durante a interação dos estresses seca e UVB em parede celular de cana-de-açúcar.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), Campus Avançado da UFRPE, localizada no município de Carpina, Zona da Mata Norte de Pernambuco, no período de dezembro de 2012 até o março de 2013.

As plantas utilizadas foram propagadas através de fragmentos de secção transversal do colmo, contendo uma gema lateral (Figura 1A). Os fragmentos foram plantados nos vasos contendo 22 Kg de solo adubado com níveis adequados de macro e micronutrientes, sob condições fotoperiódicas naturais durante o período experimental (Figura 1B).

Até 90 dias após o plantio (DAP) todos os vasos receberam água na mesma quantidade (até a drenagem da rega) a fim de proporcionar bom desenvolvimento a todas as plantas. Aos 90 DAP iniciaram-se a aplicação dos tratamentos hídricos associados aos tratamentos de radiação UVB (Figura 1D).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 3 repetições, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$ (tratamentos de estresse hídrico x tratamentos de radiação x variedades), totalizando vinte e quatro unidades experimentais). Foram utilizadas duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515), consideradas tolerantes à seca, que foram gentilmente cedidas pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro).

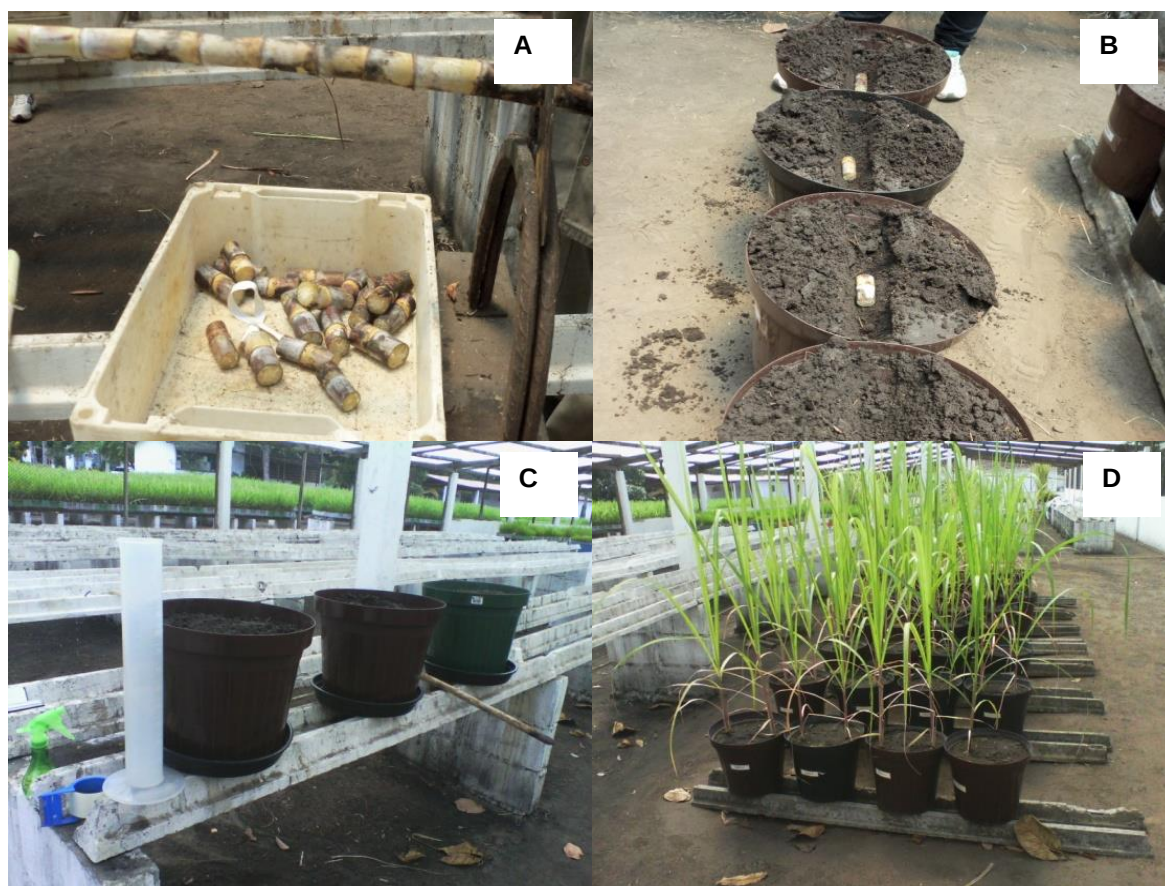


Figura 1. Imagens da implantação do experimento em casa de vegetação. A) Propagação por fragmentos de secção transversal. B) Plantio desses fragmentos em vasos de polietileno com 22 Kg de solo. C) Teste da Capacidade de Pote. D) Visão geral da disposição dos vasos com plantas aos 90 DAP.

5.2.2 Tratamentos

As plantas foram submetidas a quatro tratamentos: A) 50% C.P. + BUVB: 50% da capacidade de pote com baixa intensidade de radiação ultravioleta B; B) 100% C.P. + BUVB: 100% da capacidade de pote com baixa intensidade de radiação ultravioleta B; C) 50% C.P. + AUVB: 50% da capacidade de pote com alta intensidade de radiação ultravioleta B; D) 100% C.P. + AUVB: 100% da capacidade de pote com alta intensidade de radiação ultravioleta B (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes tratamentos de Irrigação e UVB aplicados em plantas de cana-de-açúcar.

ID	Irrigação	UVB	Tratamentos
A	Seca parcial	Baixa	50% C.P. + BUVB
B	Irrigado	Baixa	100% C.P. + BUVB
C	Seca parcial	Alta	50% C.P. + AUVB
D	Irrigado	Alta	100% C.P. + AUVB

5.2.3 Estresse hídrico

A capacidade de pote (Figura 1C) foi adotada como o conteúdo de água retida pelo substrato após sofrer saturação e consequente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem, segundo Souza *et al.* (2000). A reposição da água no substrato foi realizada em função da evapotranspiração diária, verificada por pesagem.

5.2.4 Estresse de Radiação Ultravioleta B (UVB)

Como fonte de radiação ultravioleta B (UVB) foram utilizadas dezesseis lâmpadas fluorescentes de 40 W (TL 40W/12 RS SLV da Philips) fixadas em uma estrutura de alumínio, com sistema de roldanas para regular a distância entre as lâmpadas e o topo das plantas, dispostas acima dos vasos que são separados com uma cortina de poliéster para impedir a passagem lateral de UVB para outros tratamentos (Figura 2). As lâmpadas que irradiaram as plantas com baixa intensidade de UVB foram envoltas com filtro de poliéster (0,125 mm de espessura; Metalgamica Produtos Gráficos Ltda.) para bloquear comprimentos de onda (λ) menores que 320 nm, enquanto aquelas sobre os vasos contendo as plantas submetidas à maior incidência de UVB foram envoltas com acetato de celulose (0,10 mm de espessura; Grafix Plastics) para bloquear a radiação UVC

($\lambda < 280 \text{ nm}$). Para medir a radiação incidente sobre as plantas foi utilizado um Luxímetro digital para medição de luz ultravioleta UVB. A distância entre as lâmpadas e o topo das plantas foi mantida constante a 40 cm do topo das plantas através do sistema de roldanas. A radiação média de UVB incidindo no topo das plantas foi de aproximadamente $9,7 \text{ W m}^{-2}$ e $1,8 \text{ W m}^{-2}$ para plantas tratadas com alta incidência e com baixa incidência, respectivamente. As plantas foram irradiadas com UVB por 7 h dia^{-1} centralizadas ao redor do meio dia. As coletas foram realizadas aos sete dias após o início da exposição simultânea à UVB e seca.

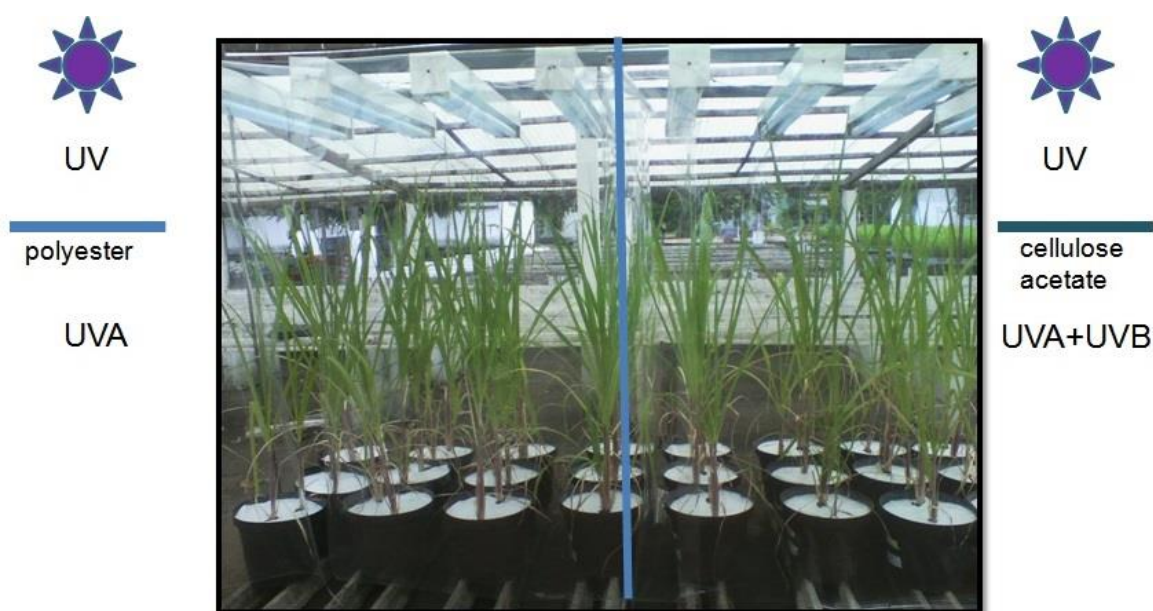


Figura 2. Esquema da transmissão e bloqueio das radiações UVA, UVB e UVC através dos filtros de poliéster e acetato de celulose.

5.2.5 Análises fisiológicas

5.2.5.1 Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides

A quantificação das clorofilas (A e B) e carotenóides foi realizada a partir de folhas cortadas em pequenos pedaços em acetona a 80% (v/v), de cada tratamento, conforme o método proposto por Lichtenthaler (1987). O teor de clorofilas e carotenóides foi determinado com base em leituras de absorbância de 663 nm para a clorofila a, 645 nm para a clorofila b, e a 480 nm para os carotenóides, realizado no espectrofotômetro. Os teores de clorofilas e carotenóides (g kg^{-1}) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$Chla = [(12,25 \times Abs_{663}) - (2,79 \times Abs_{645})] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chlb = [(21,5 \times Abs_{645}) - (5,1 \times Abs_{663})] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chl\ total = Chla + Chlb$$

$$Car = \left[\frac{[(1000 \times Abs_{480}) - (1,82 \times Chla) - (85,02 \times Chlb)]}{198} \right] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

5.2.5.2 Potencial hídrico foliar

A determinação do Potencial hídrico foliar foi realizada através do uso de câmara de pressão (Scholander *et al.*, 1965), com protocolo padrão.

5.2.5.3 Fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gs) e eficiência do uso da água (EUA)

As medições de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram realizadas com o analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA).

5.2.6 Análises Bioquímicas e Enzimáticas

5.2.6.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido foi quantificado segundo protocolo de Alexieva *et al.* (2001). As amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirado 200 µL ao qual foram adicionado 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

5.2.6.2 Quantificação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Health e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2 g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 min. Foi retirado do sobrenadante

0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo 20% de TCA e 0,5% de TBA. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C durante 30 min e, em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 min. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g.

5.2.6.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro.

5.2.6.4 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 M, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 50 µL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro.

5.2.6.5 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 µM de NBT, 5 µM riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 µl de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

5.2.7 Análise estatística

Os dados fisiológicos e enzimáticos obtidos nesse experimento foram submetidos à análise de variância fatorial e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade através do *software Statistica* versão 8.0. Foram testados os efeitos individuais do estresse hídrico, da variedade e da radiação ultravioleta B, assim como da interação entre eles.

5.2.8 Análise proteômica

5.2.8.1 Obtenção do material vegetal para a análise proteômica

As amostras foram colhidas sete dias após a aplicação dos tratamentos de radiação UVB e estresse hídrico, para as análises fisiológicas, enzimáticas, bem como, para a análise proteômica.

Para a análise proteômica, a folha +1 das amostras foram coletadas (Figura 3A) que, conforme Van Dillewijn e Waltham (1952), essa folha é a primeira de cima para baixo, completamente desenvolvida, que apresenta bainha visível.

Para as demais análises fisiológicas e enzimáticas, foram coletadas as folhas +2 das duas variedades de cana-de-açúcar. As amostras coletadas foram cortadas em frações menores com tesoura, previamente limpa com álcool 70%, depositadas em tubos cônicos (Falcon) de 50 mL (Figura 3B), e foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C (Figura 3C).



Figura 3. Imagens da coleta de folha de cana-de-açúcar sob condições de UVB e estresse hídrico em casa de vegetação para a análise proteômica. A) Coleta da folha +1; B) Armazenamento da folha +1; C) Material coletado imerso em nitrogênio líquido.

5.2.8.2 Extração de proteínas

Para realizar a extração de proteínas e as análises subsequentes de proteômica, foram escolhidos os dois tratamentos considerados mais responsivos aos estresses no proteoma: suspensão parcial da rega com alta UVB (50% C.P. + AUVB) e com baixa UVB (50% C.P. + BUVB). As proteínas da fração enriquecida de parede celular da folha +1 de cana-de-açúcar foram extraídas utilizando-se o protocolo sugerido por Negri *et al.* (2008), com algumas modificações.

5.2.8.3 Quantificação e integridade das proteínas

A quantificação das proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), que utiliza o Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente de coloração e para estabelecimento da curva padrão uma solução padronizada de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram utilizados $10,0 \text{ }\mu\text{L}$ dos extratos protéicos, adicionado de água deionizada e o reagente de coloração, compondo volume final de $1,0 \text{ mL}$. A integridade das proteínas foi visualizada através da imagem após SDS-PAGE a 12,5%.

As amostras foram aquecidas à 60°C por 10 minutos, e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5% - SDS-PAGE ($20 \times 20 \text{ cm}$), a uma voltagem constante de 300 V por 2 horas.

5.2.8.4 Eletroforese bidimensional

Focalização isoeletrica (IEF)

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no sistema Multiphor utilizando fitas de pH 3-10 linear (IPG), com 11 cm (GE Life Sciences) para $200 \text{ }\mu\text{g}$ de proteínas enriquecidas de parede celular das amostras de folhas. As tiras foram hidratadas por 18 horas em IPG-Box (GE Life Sciences) à temperatura ambiente, contendo tampão de reidratação, DTT, IPG buffer pH 3-10 e a amostra, completando $200 \text{ }\mu\text{L}$. Logo após o período de reidratação, a IEF foi realizada durante 3 etapas, utilizando as seguintes condições: $300 \text{ V} - 30 \text{ V/h}$, $3500 \text{ V} - 2900 \text{ V/h}$, $3500 \text{ V} - 6170 \text{ V/h}$. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (2 mA), 5 W de potência e temperatura de 10°C . Após a focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

Eletroforese (2D-PAGE)

Para a segunda dimensão (eletroforese), as fitas focalizadas anteriormente foram equilibradas em dois processos consecutivos. Inicialmente foi realizada a redução e, em seguida, a alquilação das fitas. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Posteriormente, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 minutos.

A segunda dimensão da eletroforese foi realizada no aparelho Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences), em gel de poliacrilamida 12,5%, ExcelGel homogêneo (GE Life Sciences) de 24 cm a 15 °C. A primeira etapa da eletroforese ocorreu a 120 V, 20 mA e 30 W, em condições constantes, com duração de aproximadamente 40 min. Esta etapa encerra-se quando a amostra se difunde da fita IPG para o gel. A segunda etapa da corrida foi realizada a 600 V, 50 mA e 30 W, constantes. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado. Os géis foram mantidos por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) e, posteriormente, imersos na solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de *coomassie* (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 24 h. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

5.2.8.5 Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados utilizando no ImageScanner III (GE Life Sciences). Os seguintes parâmetros foram utilizados para a calibração do scanner: modo de transparência, resolução de 150 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie*. O scanner foi previamente calibrado com uma fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences) o qual fornece informações dos spots como sua localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MM) e percentagem (%) de volume, além de informar as comparações e inferências estatísticas, como a razão da % de volume (Ratio), referente a razão entre dois spots correspondentes em um match, e o valor da ANOVA. Desta forma foram considerados spots com $\text{Ratio} \geq 1,5$ e $\text{ANOVA} \leq 0,05$, promovendo confiabilidade estatística aos dados.

Todas as triplicatas de géis de cada tratamento foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots*, com verificação visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado percentagem de volume (%vol) $\geq 1,5$ e $\text{ANOVA} \leq 0,05$. Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

5.2.8.6 Tripsinização dos spots

Os *spots* selecionados com variação significativa entre os tratamentos foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 50% de metanol e 2,5% de ácido acético durante 18 h, em temperatura ambiente, seguido de desidratação com solução de acetonitrila (100%). Em seguida, as proteínas foram reduzidas com solução de 10 mM de DTT (Ditiotreitol) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min à 60°C. Em seguida, o excesso de líquido foi retirado e foi adicionado 30 µL de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio para serem alquiladas, também por 30 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido excedente foi removido e os fragmentos dos spots foram lavados com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratados com acetonitrila (100%) por três vezes. Finalizadas estas etapas, foi adicionada cerca de 30 a 50 µL a solução contendo tripsina na concentração de 20 ng.µL⁻¹ e incubado a 37 °C em banho seco, overnight (16h), garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao spot foi adicionada a solução de extração (5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila) e após 40 minutos em banho de gelo, em seguida a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

5.2.8.7 Espectrometria de massas

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessecção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF), localizado no CETENE (Centro de Tecnologia de Nordeste). Para tanto, os peptídeos concentrados e secos foram eluídos em Solução de Matriz (1% ácido α -ciano-4-hidrocinâmico). Os espectros MS foram obtidos de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com m/z menor que 700 Da. Os espectros obtidos foram analisados no programa Flex Analysis (BRUKER).

5.2.8.8 Análise de Bioinformática

Identificação das proteínas

Os espectros de massa dos peptídeos foram submetidos à identificação presumível pelo programa online MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) utilizando como parâmetros: base de dados: SWISSPROT (<http://www.uniprot.org/>); organismo: Viridiplantae; modificações pós-traducionais: oxidação da metionina e carbamidomethyl. A partir da identificação foi realizado alinhamento de sequências aminoacídicas através do programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados de proteínas UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>), sendo considerado significativo alinhamento com e value < 0,05 e Max ident = 100%.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análises Fisiológicas

5.3.1.1 Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides

Como verifica-se no resumo da análise de variância (Tabela 2), para os parâmetros de Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides, não houve efeitos significativos promovidos por nenhum fator isolado, bem como, por nenhuma interação entre os fatores.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para os parâmetros Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, aos 7 DAT.

Fontes de Variação	Valores de F		
	¹ Clor A	² Clor B	³ Carot
Variedade (V)	0,0272 ^{NS}	1,1822 ^{NS}	0,5424 ^{NS}
Irrigação (I)	3,8648 ^{NS}	4,1284 ^{NS}	3,7951 ^{NS}
UVB (U)	0,6939 ^{NS}	0,9112 ^{NS}	0,7895 ^{NS}
Variedade x Irrigação	1,1699 ^{NS}	0,9229 ^{NS}	1,2585 ^{NS}
Variedade x UVB	3,4797 ^{NS}	4,0277 ^{NS}	3,9080 ^{NS}
Irrigação x UVB	3,1612 ^{NS}	3,5009 ^{NS}	2,7552 ^{NS}
V X I X U	1,9480 ^{NS}	2,1576 ^{NS}	2,0626 ^{NS}

¹Clor A - Clorofila A (g.Kg⁻¹ MF); ²Clor B - Clorofila B (g.Kg⁻¹ MF); ³Carot - Carotenóides (g.Kg⁻¹ MF); NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo (p<0,001) pelo teste F; ** - Significativo (p<0,01) pelo teste F; * - Significativo (p<0,05) pelo teste F.

Dessa forma, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, indicando que apresentaram basicamente o mesmo comportamento no acúmulo de pigmentos fotossintetizantes (Figura 4).

■ 100% C.P. + AUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + AUVB (RB92579) ■ 100% C.P. + BUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + BUVB (RB92579)
 ▨ 50% C.P. + AUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + AUVB (RB92579) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB92579)

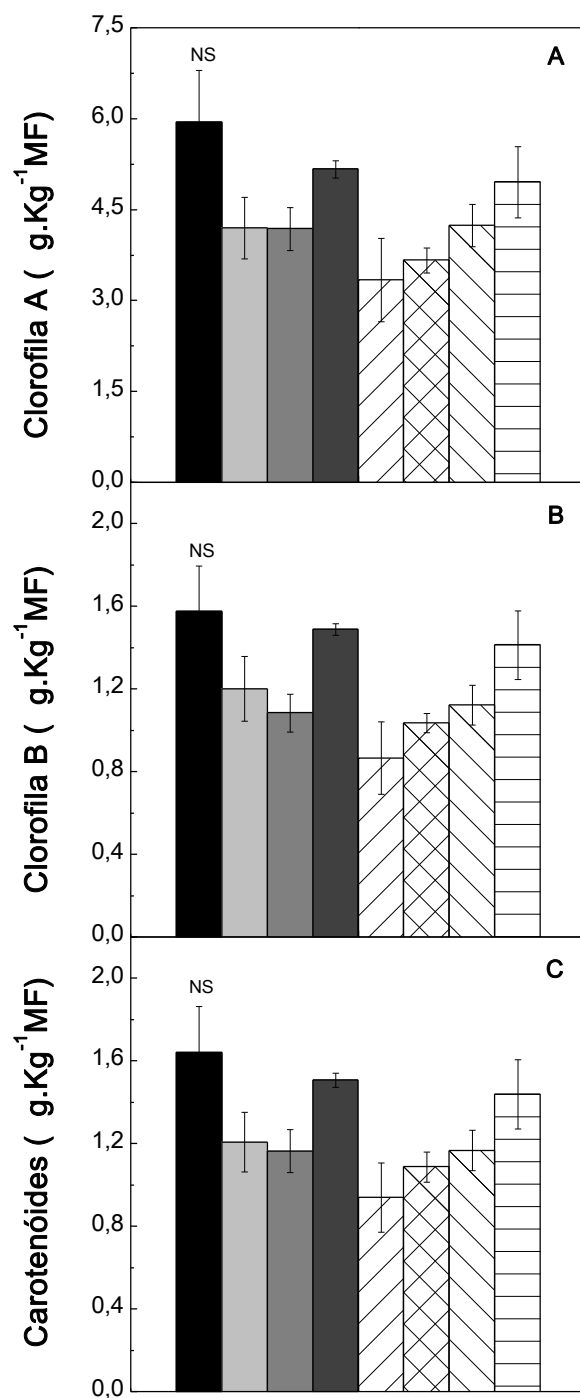


Figura 4. A - Teores de clorofila A; B - teores de clorofila B; e C - teores de carotenóides em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

5.3.1.2 Potencial hídrico foliar

De acordo com a análise de variância, nota-se que não houve efeito significativo no parâmetro potencial hídrico foliar, aos sete dias após o início da aplicação dos estresses (7 DAT), promovido por nenhum dos fatores isolados analisados, bem como também, por nenhuma das interações entre os fatores (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o parâmetro Potencial hídrico foliar analisado nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, com 7 DAT.

Fonte de Variação	Valores de F
	Potencial hídrico foliar
Variedade (V)	0,4547 ^{NS}
Irrigação (I)	0,2843 ^{NS}
UVB (U)	0,1245 ^{NS}
Variedade x Irrigação	0,8853 ^{NS}
Variedade x UVB	0,1997 ^{NS}
Irrigação x UVB	1,0231 ^{NS}
V X I X U	0,0271 ^{NS}

NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; * - Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

Os resultados obtidos para potencial hídrico foliar, referentes aos tratamentos irrigados e parcialmente irrigados, na presença de alta e baixa UVB podem ser verificados na Figura 5. O potencial hídrico das folhas de cana-de-açúcar das duas variedades (RB867515 e RB92579), nas condições irrigadas ou com suspensão parcial de rega, sob alta ou baixa UVB, foi mantido a cerca de - 1,1 MPa entre todos os tratamentos.

■ 100% C.P. + AUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + AUVB (RB92579) ■ 100% C.P. + BUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + BUVB (RB92579)
 ▨ 50% C.P. + AUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + AUVB (RB92579) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB92579)

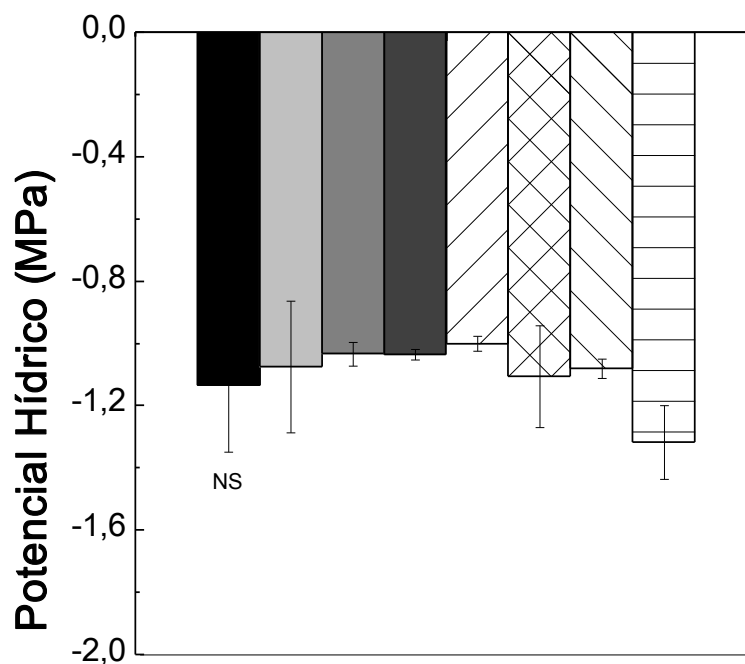


Figura 5. Potencial hídrico foliar em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

5.3.1.3 Trocas Gasosas: Fotossíntese (A), transpiração (E), Condutância estomática (gs) e Eficiência do uso da água (EUA)

Na análise estatística dos parâmetros de trocas gasosas, foi verificado que o estresse hídrico e UVB sofrido pelas duas cultivares de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a sete dias de supressão parcial da rega, provocou diferenças estatisticamente significativas em alguns parâmetros analisados promovidas pelos fatores: variedade, irrigação, UVB e pela interação Variedade x UVB. No entanto, para as interações Variedade x Irrigação, Irrigação x UVB e Variedade x Irrigação x UVB, não foi observada efeito significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F, para nenhum parâmetro estudado, provavelmente devido ao curto tempo ou ao tipo de supressão da rega (50% C.P.) sofrido pelas plantas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para os parâmetros de trocas gasosas analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa de vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UVB.

Fontes de Variação	Valores de F			
	¹ gs	² A	³ E	⁴ EUA
Variedade (V)	18,7272***	3,4008 ^{NS}	9,8716**	9,515**
Irrigação (I)	7,0210*	1,1819 ^{NS}	1,1819 ^{NS}	6,342*
UVB (U)	3,7266 ^{NS}	2,9215 ^{NS}	6,1696*	5,551*
Variedade x Irrigação	1,0074 ^{NS}	1,3480 ^{NS}	3,0163 ^{NS}	3,458 ^{NS}
Variedade x UVB	0,0728 ^{NS}	0,9548 ^{NS}	0,0665 ^{NS}	5,527*
Irrigação x UVB	0,1415 ^{NS}	1,9590 ^{NS}	3,9616 ^{NS}	4,487 ^{NS}
V X I X U	0,6145 ^{NS}	0,0431 ^{NS}	0,0411 ^{NS}	0,250 ^{NS}

¹gs - Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); ²A - Fotossíntese líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); ³E - Taxa de transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); ⁴EUA - Eficiência do Uso da Água; NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; * - Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

A Figura 6A e Tabela 4 mostram os efeitos do estresse hídrico e da UVB na condutância estomática (gs), fotossíntese (A), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA). Nota-se que tanto o regime hídrico quanto a variedade, isoladamente, apresentaram efeitos significativos sobre gs. Verificou-se que, para a condutância estomática houve um maior efeito significativo ($P < 0,001$) promovido pelo fator variedade e, não apresentou efeitos significativos proporcionados pelas interações entre os três fatores (variedade x irrigação x UVB). A variedade RB867515 apresentou o maior valor médio de gs ($0,063 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), enquanto que a variedade RB92579 apresentou o valor médio de gs ($0,044 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), uma redução de cerca de 30,2% na condutância estomática.

De acordo com a Tabela 4, os resultados obtidos pela análise de variância não houve efeito significativo no parâmetro taxa de fotossíntese líquida (A) promovido por nenhum dos fatores isolados ou interações. No entanto, verifica-se maior valor desta variável nas condições de 50% da capacidade de campo e elevada radiação UVB (50% C.P. + AUVB), na variedade RB867515, porém, sem diferenças significativas para os demais tratamentos (Figura 6B).

Pela análise de variância, foi observado efeito significativo no parâmetro taxa de transpiração (E) ocasionado pelos fatores variedade e UVB (Tabela 4). Semelhante ao que ocorreu com a condutância estomática, foi observada para a taxa transpiratória, um maior efeito significativo promovido pelo fator Variedade, onde a RB867515 se destaca da RB92579 com a maior média ($1,59 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$), cerca de 22% a mais que a taxa de transpiração da RB92579 ($1,24 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$), conforme verificado na Figura 6C.

Na Tabela 4 verificamos que houve efeito significativo na interação Variedade x UVB ($P < 0,05$). De maneira geral, a eficiência de uso da água (EUA) foi semelhante entre as variedades e entre os níveis de UVB. Nota-se que a variedade RB92579 sob baixa radiação UVB apresentou uma maior EUA (Figura 6D).

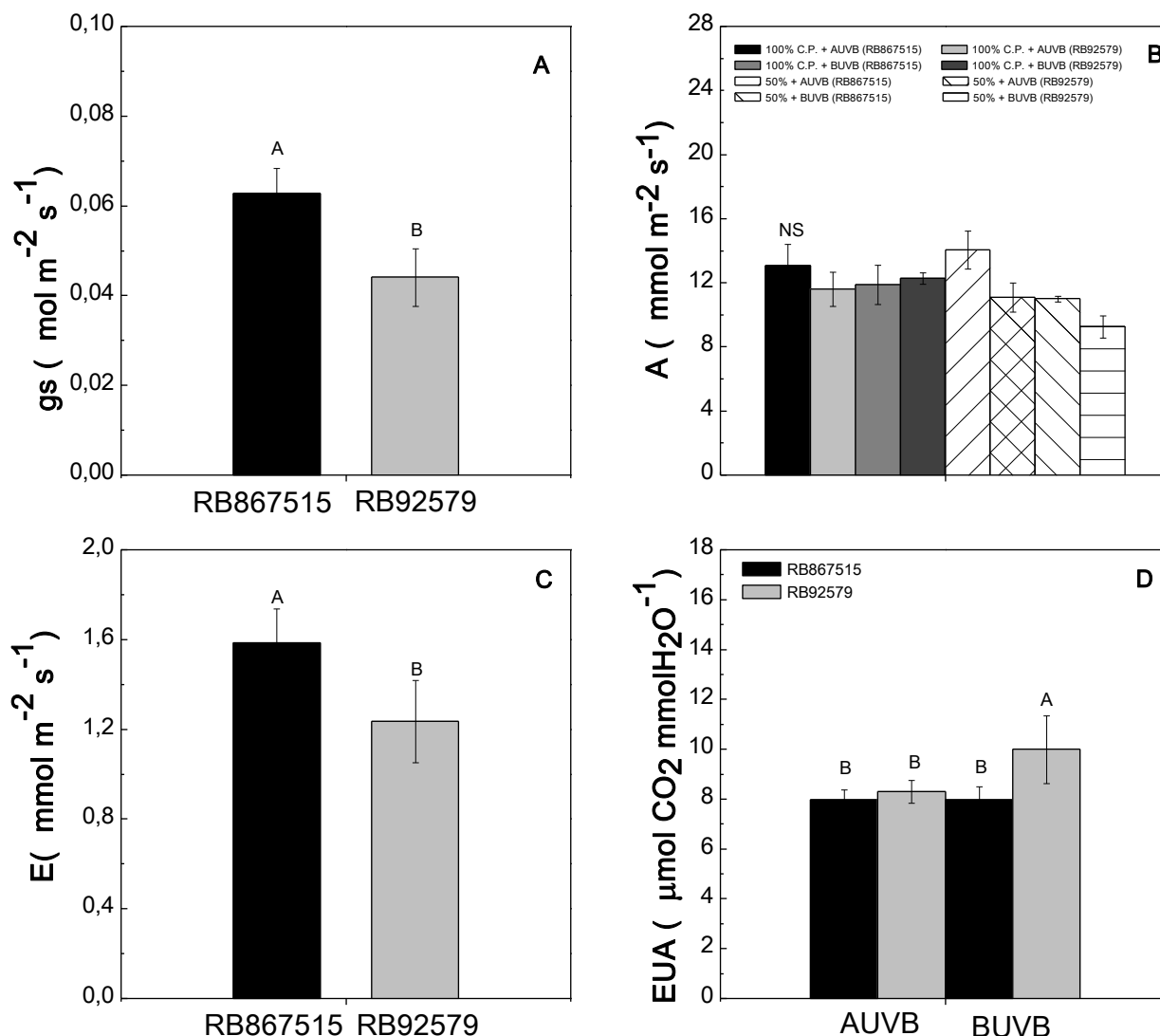


Figura 6. Valores médios de: A - condutância estomática (gs); B - fotossíntese líquida (A); C - transpiração foliar (E); e D - eficiência do uso da água (EUA) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

5.3.2 Análises Bioquímicas e Enzimáticas

5.3.2.1 Teor de Malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Na Tabela 5, verifica-se que houve efeito altamente significativo no conteúdo de MDA promovido pela radiação UVB e pela interação Variedade x UVB. A interação entre os três fatores (Variedade x Irrigação e UVB) também foi significativo ($p < 0,05$) no nível de peroxidação lipídica (MDA). Para o conteúdo de

Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), verifica-se que houve efeito altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as fontes de variação.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para os parâmetros de MDA e H_2O_2 analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa-de-vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UVB.

Fontes de Variação	Valores de F	
	¹ MDA	² H_2O_2
Variedade (V)	3,275 ^{NS}	76,39***
Irrigação (I)	2,463 ^{NS}	229,16***
UVB (U)	81,653***	23,67***
Variedade x Irrigação	0,002 ^{NS}	36,13***
Variedade x UVB	166,193***	188,60***
Irrigação x UVB	0,914 ^{NS}	81,99***
V X I X U	6,605*	144,05***

¹MDA- Teor de Malonaldeído ($\mu\text{mol/g MF}$); ² H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio ($\mu\text{mol/g MF}$); NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; * - Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

Nas condições de plantas bem hidratadas e com baixa UVB, a variedade RB867515 não apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) no conteúdo de lipoperóxidos quando submetida à elevada UVB. Já a variedade RB92579 nas condições de 100% da capacidade de campo no substrato e com baixa incidência de UVB apresentou um teor baixo de lipoperóxidos aos 7 dias de exposição aos estresses, tendo esse valor aumentado significativamente quando submetida à elevada radiação UVB. Verifica-se também que a peroxidação lipídica na variedade RB92579 foi substancialmente maior (cerca de 38,8%) comparada à variedade RB867515 quando bem irrigadas e sob alta UVB. No entanto, nas condições de supressão parcial de rega (50% C.P.) com alta e baixa radiação UVB, as duas variedades se comportaram de forma semelhante de quando bem hidratadas. Com o regime hídrico de 50% da capacidade de campo no substrato e

sob alta incidência de UVB, a variedade RB92579 novamente apresentou um alto teor de lipoperóxidos, aproximadamente 43% a mais do que sob baixa incidência de UVB e, cerca de 28,5% a mais do que na variedade RB867515 sob mesmas condições hídricas e de UVB (Figura 7A).

No geral, as plantas submetidas aos tratamentos com rega incompleta apresentam um maior teor de peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em relação às plantas bem hidratadas. Quando impostas à rega parcial e baixa incidência de UVB, as plantas da variedade RB92579, no presente estudo resultaram em uma acumulação de H_2O_2 significativamente superior aos demais tratamentos, conforme observados na Figura 7B.

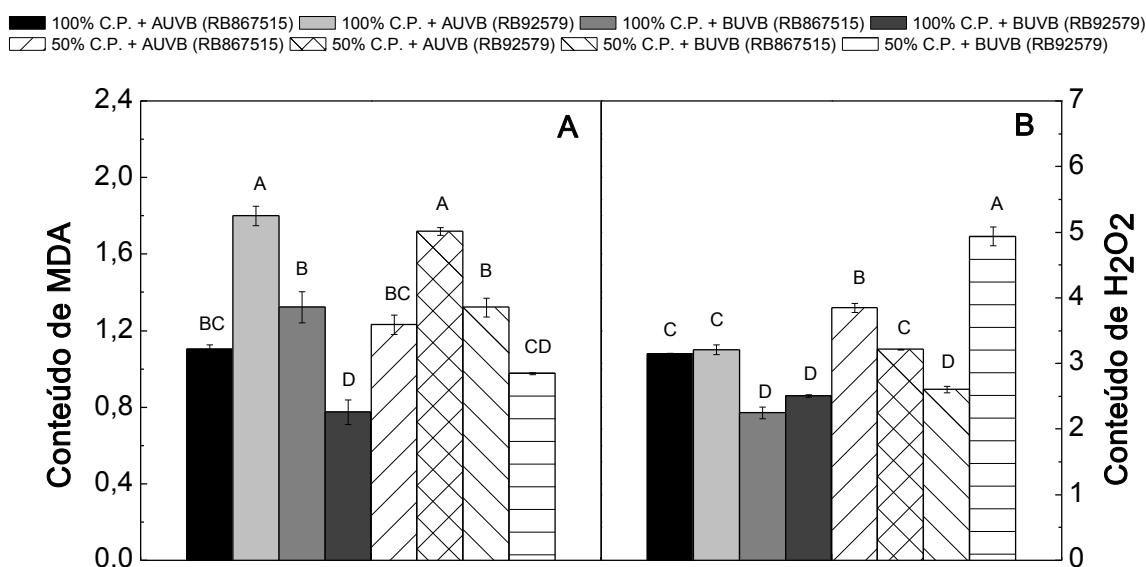


Figura 7. Peroxidação lipídica expressa pelo teor de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) e pelo teor de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

5.3.2.2 Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)

Na Análise de Variância dos parâmetros enzimáticos (Tabela 6), foi verificado que o estresse hídrico e UVB sofrido pelas duas cultivares de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega, provocou efeitos estatisticamente significativos em todos os parâmetros enzimáticos analisados nos fatores: Variedade, Irrigação, UVB e nas interações Variedade x Irrigação, Variedade x UVB, Irrigação x UVB e na interação dos 3 fatores Variedade x Irrigação x UVB.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para os parâmetros de CAT, APX e SOD e analisados nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, em casa de vegetação e submetidas a 7 dias de supressão parcial da rega e UVB.

Fontes de Variação	Valores de F		
	¹ CAT	² APX	³ SOD
Variedade (V)	162,142***	26,0786***	858,78***
Irrigação (I)	27,125***	2,5244 ^{NS}	36,30***
UVB (U)	7,812*	0,3751 ^{NS}	546,77***
Variedade x Irrigação	62,251***	21,5184***	300,51***
Variedade x UVB	25,749***	10,6669**	32,14***
Irrigação x UVB	8,499*	1,1453 ^{NS}	821,38***
V X I X U	13,926**	4,7944*	25,80***

¹CAT - Catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); ²APX - Ascorbato Peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); e ³SOD - Superóxido Dismutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; * - Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

As duas variedades apresentaram respostas semelhantes quanto à atividade de Catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Nos tratamentos com irrigação plena, observa-se que o aumento da UVB na variedade RB867515 não influenciou nos teores de CAT e APX, diferentemente do que foi verificado na RB92579, que sob alta UVB apresentou uma atividade superior dessas mesmas

enzimas. A variedade RB867515 bem hidratada sob alta e baixa UVB apresentou uma atividade bastante superior dessas duas enzimas, CAT e APX, comparada a RB92579 (Figura 8A e 8B).

No presente estudo, a atividade das enzimas APX e CAT nas folhas, não expressaram diferença entre os tratamentos nas plantas submetidas à rega parcial, independente do nível de UVB, em ambas as variedades. No entanto, nota-se que, em geral, as plantas submetidas a esses tratamentos de estresse hídrico apresentaram uma menor ou uma manutenção na atividade de APX e CAT, comparadas às atividades dessas enzimas quando as plantas estavam bem hidratadas, com exceção apenas da variedade RB92579 que, quando estava em condições de supressão parcial da rega e baixa UVB apresentou um aumento de APX e CAT em relação às plantas em condições de boa irrigação e baixa UVB, na mesma variedade.

Nas plantas bem hidratadas, a alta UVB promoveu uma atividade na enzima SOD significativamente superior quando comparadas as plantas nas mesmas condições hídricas sob baixa UVB, em ambas as variedades. Esse aumento proporcionado pela alta UVB foi de aproximadamente 62% na atividade de SOD nas folhas da variedade RB867515 e de aproximadamente 70% na variedade RB92579. Já nas plantas submetidas à rega parcial, a atividade de SOD foi significativamente superior nas plantas da variedade RB92579 comparada à atividade dessa enzima na RB867515, independente do nível de UVB (Figura 8C).

■ 100% C.P. + AUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + AUVB (RB92579) ■ 100% C.P. + BUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + BUVB (RB92579)
 ▨ 50% C.P. + AUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + AUVB (RB92579) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB867515) ▨ 50% C.P. + BUVB (RB92579)

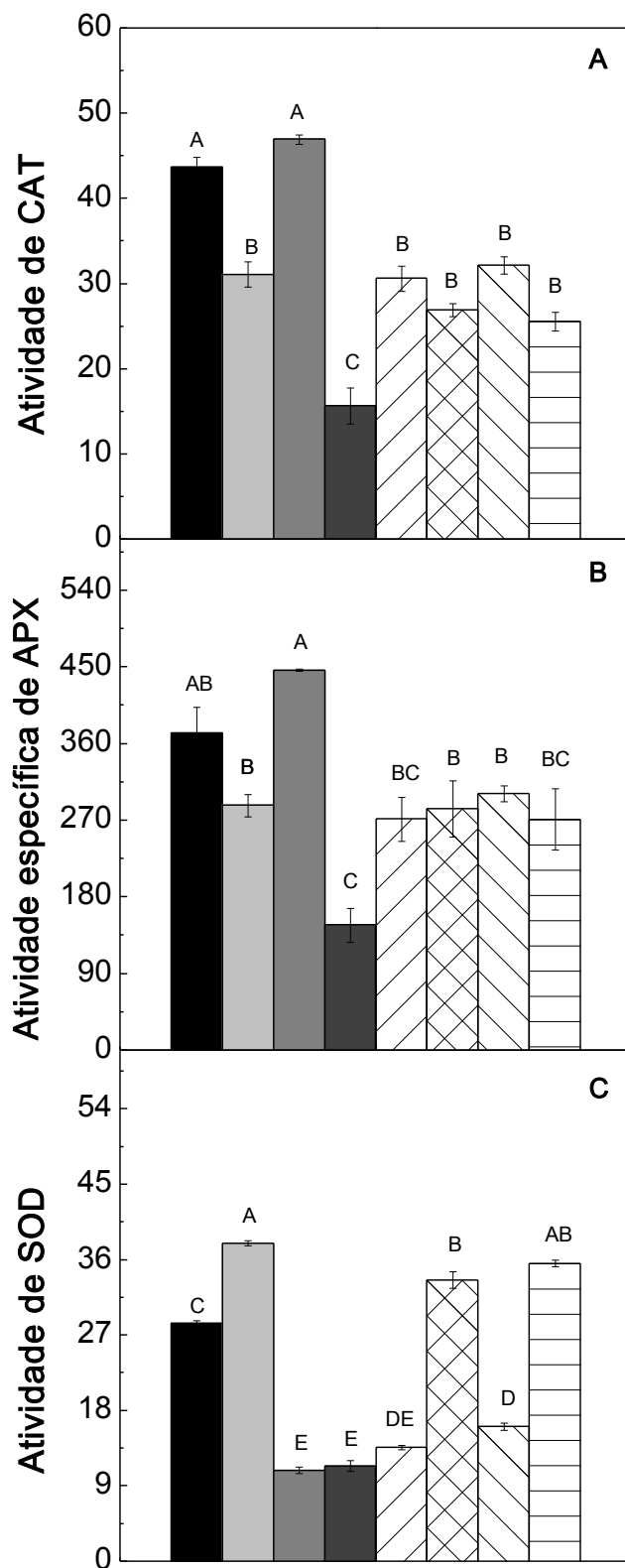


Figura 8. A - Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); B - Atividade de APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); e C - Atividade de SOD (U SOD mg prot^{-1}) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à suspensão parcial da rega e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Seleção da variedade de cana-de-açúcar para análise proteômica

Diante dos resultados obtidos nesse experimento, verificou-se que o estresse hídrico moderado promovido pela suspensão parcial da rega, associado com baixa ou alta radiação UVB, não foi suficiente para promover efeitos significativos em algumas variáveis como no conteúdo das Clorofilas e Carotenóides, bem como no Potencial hídrico foliar. As duas variedades quando submetidas à supressão parcial da rega simultaneamente à baixa ou alta UVB, não apresentaram diferença estatística no conteúdo das enzimas Catalase e Ascorbato Peroxidase. Ainda assim, com base nos parâmetros fisiológicos e enzimáticos analisados para as duas variedades de cana-de-açúcar, a variedade RB867515 foi a que apresentou, dentro deste estudo, respostas mais associada à tolerância ao estresse por UVB associado à seca, em comparação à variedade RB92579.

A variedade RB92579 apresentou maiores reduções significativas na condutância estomática e na taxa transpiratória com relação à variedade RB867515. Os danos às membranas, avaliado como o conteúdo de MDA foi superior na variedade RB92579, assim como, nessa mesma variedade o conteúdo das enzimas antioxidativas CAT e APX foi significativamente maior quando submetida à elevada radiação UVB. Portanto, a manutenção da atividade da CAT e da APX observada na variedade RB867515 sob estresse por alta UVB que associado a menor redução da condutância estomática, menor taxa transpiratória e menor peroxidação lipídica, caracterizaram esta variedade como mais tolerante à esses fatores de estresse do que a variedade RB92579, garantindo dessa forma, a manutenção dos processos fisiológicos e crescimento da planta.

Logo, com base nos parâmetros fisiológicos e enzimáticos, as etapas seguintes desse estudo se restringiram a variedade RB867515 contrastante em respostas associadas ao estresse por déficit hídrico em condições de alta e baixa radiação ultravioleta B. Os tratamentos com suspensão parcial da rega, associados à baixa ou alta UVB foram selecionados para a realização da análise proteômica.

5.3.3 Análise Proteômica

5.3.3.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas em condições de estresse por UVB e seca

O protocolo descrito por Negri *et al.* (2008), com algumas modificações para extração de proteínas da fração enriquecida de parede celular em folhas de cana-de-açúcar possibilitou recuperar e solubilizar proteínas em uma grande amplitude de massa molecular compatível com as análises posteriores. As concentrações e rendimentos das proteínas extraídas dos tratamentos são mostrados na Tabela 7. Realizou-se a extração de proteínas independentes, correspondendo a cada réplica biológica.

Tabela 7. Concentração e rendimento de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, submetidas à suspensão parcial da rega com baixa e alta UVB.

Tratamentos	Concentração de Proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimento de proteínas ($\mu\text{g}/\text{g}$)
50% C.P. + BUVB (R1)	1,66	199,2
50% C.P. + BUVB (R2)	2,44	292,8
50% C.P. + BUVB (R3)	2,12	254,4
50% C.P. + AUVB (R1)	2,51	301,2
50% C.P. + AUVB (R2)	2,55	306,0
50% C.P. + AUVB (R3)	2,67	320,4

50% C.P. + BUVB: 50% da capacidade de pote com baixa radiação ultravioleta B; 50% C.P. + AUVB: 50% da capacidade de pote com elevada radiação ultravioleta B.

5.3.3.2 Eletroforese bidimensional (2D)

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) de cada réplica biológica de cada tratamento analisado para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, submetidas aos estresses de estresse hídrico e UVB. Cada gel foi digitalizado em *scanner* de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05 (Figura 9).

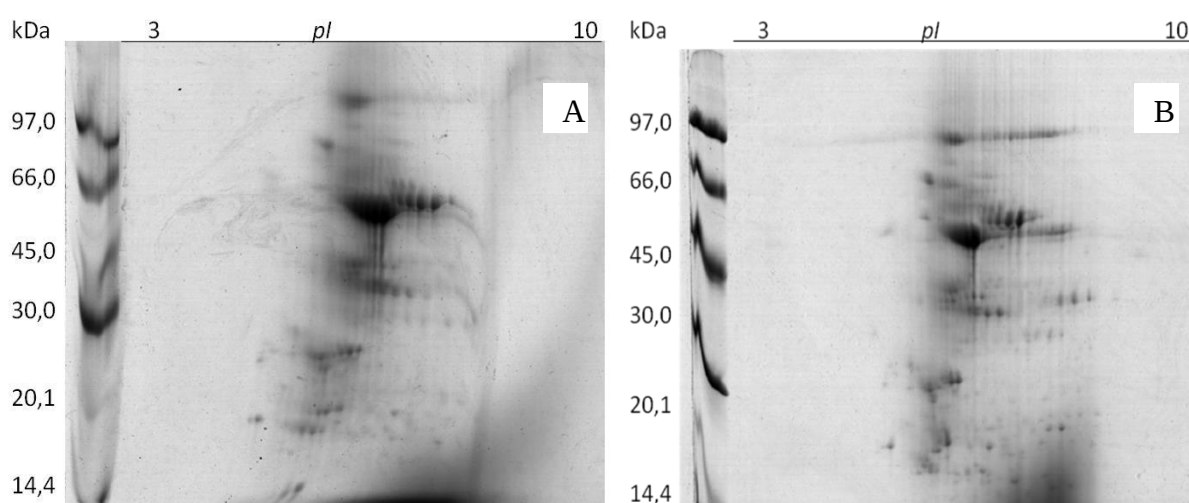


Figura 9. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. A) 50% C.P. + BUVB; B) 50% C.P. + AUVB.

5.3.3.3 Digitalização e análise de imagens

Os arquivos de imagem digitalizados foram analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. Foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,980 no tratamento 50% C.P. + BUVB e 0,899 no tratamento no tratamento 50% C.P. + AUVB.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 277 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 33 *spots*/gel (variando de 30 a 37) no tratamento 50% C.P. + BUVB e 59 *spots*/gel (variando de 52 a 63) no tratamento 50% C.P. + AUVB.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 9), foram detectados 69 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 15 foram detectados apenas no tratamento 50% C.P. + BUVB e 36 foram detectados apenas no tratamento 50% C.P. + AUVB (Tabela 8). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) entre tratamentos.

Os demais 18 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 11 tiveram maior acúmulo no tratamento 50% C.P. + BUVB e 7 apresentaram maior acúmulo em plantas do tratamento 50% C.P. + AUVB. Dos 11 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento com suspensão parcial da rega e baixa UVB, apenas 4 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) e, razão de variação (*ratio*) $\geq 1,5$. No tratamento 50% C.P. + AUVB, nenhum dos *spots* comuns foram significativamente variáveis. Deste modo, foram excisados dos géis 18 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.

Tabela 8. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento 50% C.P. + BUVB e 50% C.P. + AUVB.

Descrição	Tratamentos	
	50% C.P. + BUVB	50% C.P. + AUVB
Spots analisados	26	43
Média/réplica	33	59
Comuns	18	18
Maior acúmulo	11	07
Exclusivos ¹	ANOVA $\leq 0,05$	4
	e <i>ratio</i> $\geq 1,5$	4
		0
		0
	ANOVA $\leq 0,05$	06
DEPs ²	10	08

¹Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

²Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e Ratio $\geq 1,5$ + exclusivos com ANOVA significativa).

5.3.3.4 Espectrometria de massas (PMF)

Os DEPs selecionados a partir da análise comparativa em 2D-PAGE foram analisados em espectrometria de massas para sua identificação presumível em banco de dados de acesso público. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, apenas 4 amostras do total de 18 digeridas com tripsina não resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot.

5.3.3.5 Análises de Bioinformática

De acordo com o descrito anteriormente, os *spots* detectados e selecionados como significativamente variáveis entre tratamentos (DEPs) foram submetidos à análise por espectrometria de massas para obtenção de espectros com perfil *m/z* específicos, visando identificação presumível e anotação em bancos de dados, para inferências funcionais. Estas proteínas diferenciais mostraram distribuição entre os tratamentos (Figura 10).

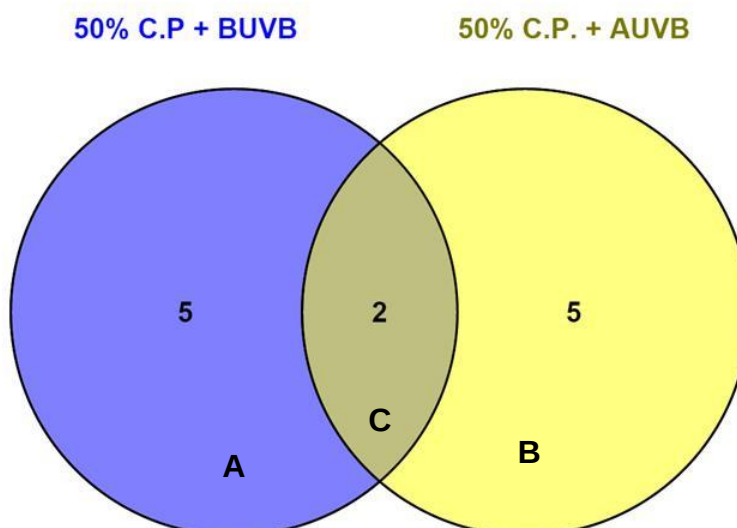


Figura 10. Diagrama de Venn representando as proteínas anotadas diferencialmente expressas nas folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos submetidos à suspensão parcial da rega com alta UVB (A), nos tratamentos submetidos à suspensão parcial da rega com baixa UVB (B) ou proteínas comuns no diagrama (C).

Identificação presumível e anotação dos DEPs

A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada na Tabela 9, obtida através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 9. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do spot no tratamento de seca sob alta UVB e no tratamento de seca sob baixa UVB. ANOVA refere-se ao valor p calculado para significância estatística da diferença na %vol do spot entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada spot são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

Spot ID	Comum ou Exclusivo/ Tratamento	Proteína	MM calc./ MM obs.	pI calc./ pI obs.	Score	ANOVA	Acesso	Localização subcelular
63	Excl/BUVB	LL- diaminopimelato aminotransferase	50225/62348	8.63/6.49	53	$1,9 \times 10^{-4}$	Q10MQ2	P
47	Excl/AUVB	Proteína associada a flavonóides	24387/35119	5.39/7.03	63	$1,1 \times 10^{-3}$	-	RE, MP, PC
13	SC*/BUVB	ATP sintase subunidade alfa cloroplastidial	55716/57312	5.87/6.36	95	$1,1 \times 10^{-5}$	Q6L3A1	P
45	Excl/AUVB	Proteína associada à lignina	27359/35242	5.29/6.83	58	$5,3 \times 10^{-1}$	-	MP, PC
59	Excl/BUVB	ATP sintase subunidade cloroplastidial	40107/44780	8.44/5.62	55	$1,1 \times 10^{-3}$	P0C1M0	P
51	Excl/AUVB	Ribulose Bifosfato carboxilase subunidade maior	53327/45673	6.22/6.52	85	$1,2 \times 10^{-4}$	B3TN59	P
44	Excl/AUVB	Gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase	37015/35151	7.70/7.23	62	$2,4 \times 10^{-3}$	P04796	C
42	Excl/AUVB	ATP sintase subunidade gama cloroplastidial	40107/32894	8.44/5.70	69	$4,4 \times 10^{-3}$	P0C1M0	C
36	Excl/AUVB	Proteína de choque térmico	71641/68038	5.15/5.46	61	$2,7 \times 10^{-2}$	-	M, P, C, RE, PC
7	SC*/BUVB	Nucleotídeo cíclico de canal iônico fechado 19	84680/61128	9.96/5.07	52	$2,3 \times 10^{-4}$	Q9LDR2	MP
28	Excl/AUVB	ATP sintase subunidade alfa, cloroplastidial	55773/52938	5.87/6.07	57	$7,3 \times 10^{-2}$	Q6L3A1	P
8	SC*/BUVB	ATP sintase subunidade beta cloroplastidial	53987/52938	5.31/5.66	189	$4,4 \times 10^{-15}$	Q6L392	P
61	Excl/BUVB	Ribulose bifosfato carboxilasesubunidades menor	19693/44551	8.98/5.72	57	$7,7 \times 10^{-1}$	Q40004	P
17	SC*/BUVB	ATP sintase subunidade alfa, cloroplastidial	55687/57797	5.95/5.89	118	$5,60 \times 10^{-08}$	Q6ENH7	P

BUVB: baixa radiação ultravioleta B; AUVB: alta radiação ultravioleta B. * SC: spots comuns; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Ontologia gênica (GO)

As sequências de aminoácidos, após serem comparadas com o banco de dados de proteínas do Uniprot, foram identificadas e distribuídas em categorias de acordo com o seu processo biológico ou função (Figura 11 e 12). As proteínas identificadas nas amostras foram classificadas em grupos, de acordo com suas funções, que incluíam a síntese de ATP, transporte de íons, fotossíntese, resposta à estresse, bem como, proteínas identificadas supostamente atribuídas a sinalização, transporte de membrana e enzimas da parede celular associados a biossíntese de ligninas e/ou flavonóides. Do total de proteínas identificadas, aproximadamente 22% estão localizadas e/ou envolvidas em mecanismos da parede celular, enquanto que as demais identificadas foram previstos como sendo originadas do cloroplasto e citoplasma.

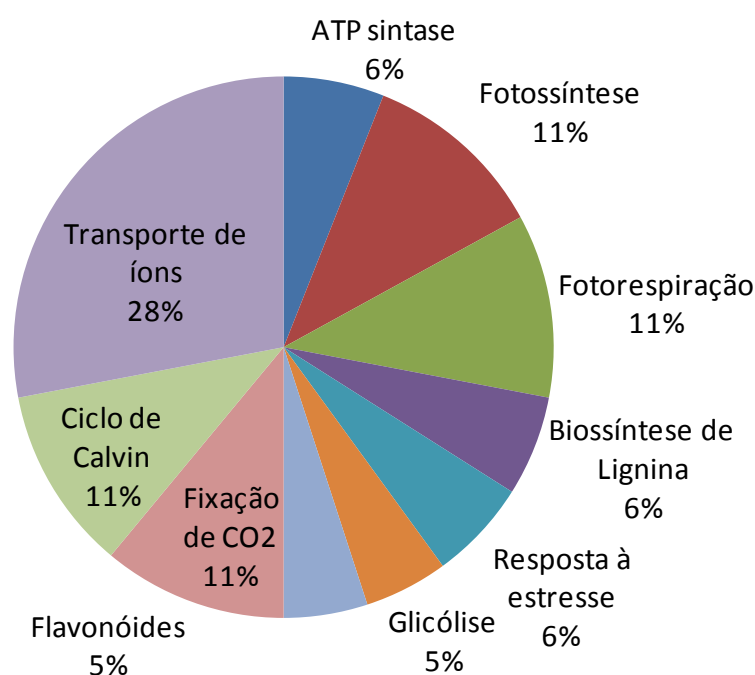


Figura 11. Ontologia Gênica (GO) de peptídeos diferencialmente expressos em plantas de cana-de-açúcar expostas à seca e UVB.

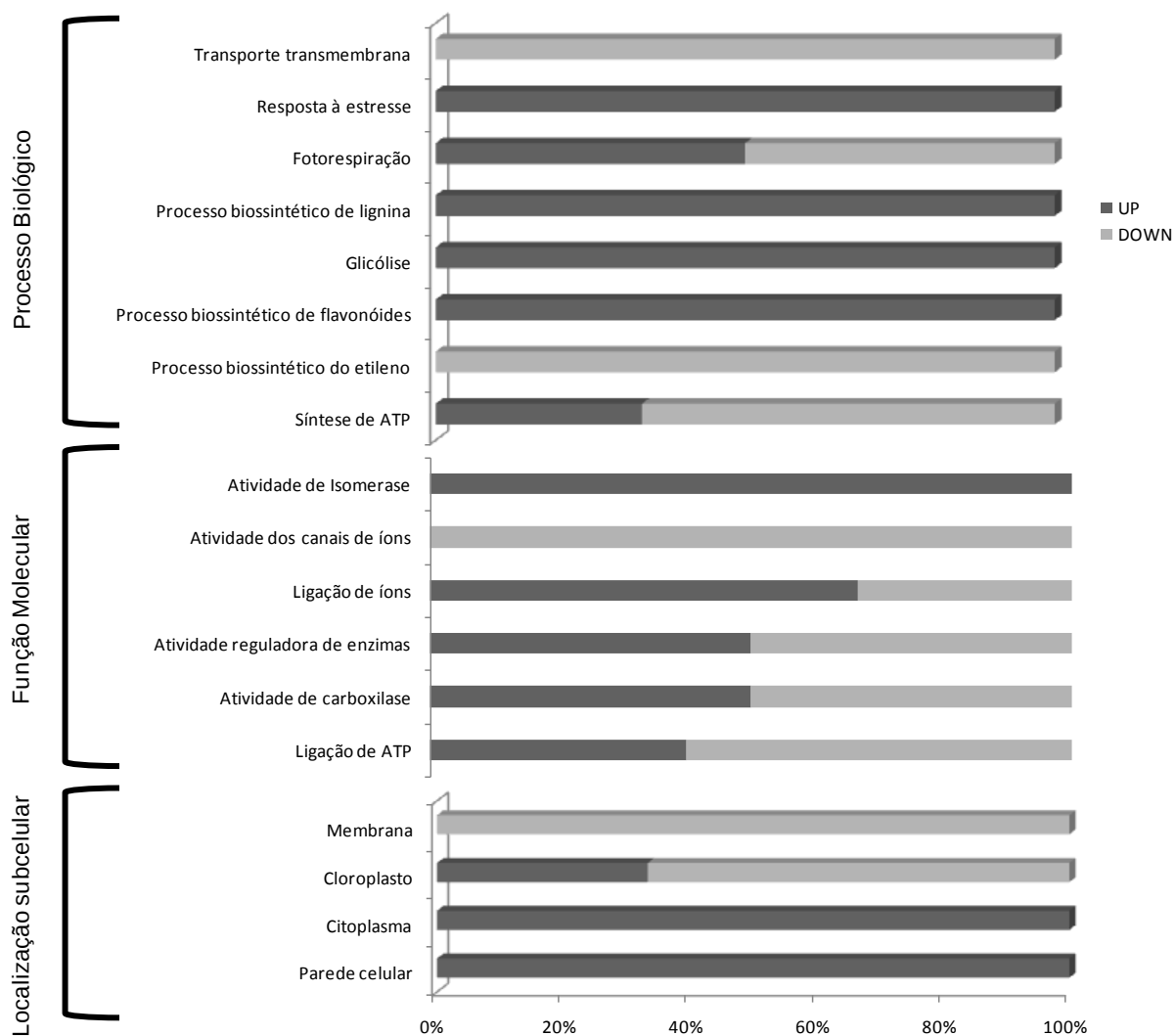


Figura 12. Processo biológico, Função molecular e Localização subcelular por análise GO de DEPs up e down.

5.4 DISCUSSÃO

Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides

Os resultados mostraram que em plantas de cana-de-açúcar (variedades RB867515 e RB92579) o período de sete dias de suspensão parcial do regime hídrico (50% C.P.) e implementação da radiação UVB não foram suficientes para promover alterações significativas nos teores dos pigmentos fotossintéticos, clorofila A, B e carotenóides.

O estresse por seca é normalmente caracterizado por perda de clorofila e um declínio progressivo na capacidade fotossintética das plantas. O que leva a análise dos pigmentos fotossintéticos a ser uma importante ferramenta para avaliação da sanidade e integridade dos aparatos internos da célula durante o processo de fotossíntese (Rong-Hua *et al.*, 2006).

Os pigmentos do aparato fotossintético podem também ser destruídos pela radiação UVB, com perda comparativa da capacidade fotossintética (Jordan *et al.*, 1994). Segundo Pfundel *et al.* (1992), clorofilas e carotenóides são afetados por radiação UVB elevada, onde os carotenóides são geralmente menos afetados do que as clorofilas. De acordo com Sangtarash *et al.* (2009) a exposição à UVB pode promover aumento, redução ou nenhum efeito no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Alexieva *et al.* (2001) verificaram em plantas de ervilha e trigo que o tratamento com UVB reduziu o conteúdo de clorofila.

Dessa forma, a imposição de um déficit hídrico moderado (50% da capacidade de pote) associado à UVB, pode ter sido uma das causas da ausência de efeitos significativos para estas variáveis.

Potencial hídrico foliar

As análises dos resultados mostraram que as duas variedades apresentaram respostas similares quanto ao potencial hídrico foliar. Esses resultados sugerem que o regime hídrico (intensidade e/ou durabilidade), independente do nível de radiação UVB, parecem não ter sido suficiente para manifestar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Para as duas variedades estudadas, o valor mínimo atingido para o potencial hídrico foliar em torno de -1,32 MPa foi observado no tratamento com suspensão parcial de rega com baixa UVB na variedade RB92579. A média geral obtida entre todos os tratamentos foi de -1,19 MPa.

Esses resultados corroboram com os relatados por Smit e Singels (2006) que notaram inicialmente reduções em outras variáveis, como na condutância estomática, em duas variedades de cana-de-açúcar, afirmando que tal variável apresenta maior sensibilidade que o potencial hídrico foliar à medida que o solo se torna mais seco. Conforme relatado por Pincelli (2010), as respostas morfofisiológicas da cana-de-açúcar a deficiência hídrica são mais pronunciadas e de fácil verificação após um maior período sob restrição hídrica.

De acordo com Nogueira *et al.* (2005), o efeito da deficiência hídrica sobre as plantas é complexo, não havendo um mecanismo universal de resistência à seca, pois as plantas respondem através de vários processos adaptativos à escassez de água como, por exemplo, através da capacidade de reduzir o potencial hídrico, aliada a adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas. Ainda, segundo esses autores, embora esses processos de resistência à seca sejam avaliados muitas vezes isoladamente, as espécies utilizam mecanismos

associados para a sua sobrevivência em condições desfavoráveis de disponibilidade de água.

Trocas Gasosas: Fotossíntese (A), transpiração (E) e Condutância estomática (gs)

A condutância estomática (gs) diminuiu consideravelmente na variedade RB92579 em comparação à variedade RB867515, independentemente dos regimes hídricos e dos níveis de radiação UVB aplicados, demonstrando uma maior resistência à difusão dos gases, conseqüentemente menor transpiração e fotossíntese.

A condutância estomática está relacionada com a abertura dos estômatos, ou seja, a resistência associada à difusão de CO₂ pela abertura estomática. As mudanças na resistência estomática são importantes para a regulação da perda de água pela planta e para o controle da taxa absorção de dióxido de carbono necessário a fixação contínua durante a fotossíntese. Sob condições de estresse hídrico, ocorre redução da concentração intercelular de CO₂, em razão do controle da abertura dos estômatos. Assim, também ocorre a diminuição da condutância estomática que é um componente de fundamental importância na manutenção da turgescência em resposta a decréscimos no potencial hídrico das plantas. Todavia, quando o estômato se fecha para proteger a planta da perda de água, ele, simultaneamente, restringe a difusão do CO₂ atmosférico e, conseqüentemente, provoca queda na taxa fotossintética (Damatta, 2003).

Ao comparar a taxa de fotossíntese (A) entre os diferentes tratamentos, foi observado que apesar de não significativo, a variedade RB867515 sob seca

parcial e alta UVB apresentou uma taxa fotossintética superior à RB92579. A resposta desta variedade à combinação dos estresses mais severos indica que, durante a exposição simultânea para vários estresses, uma forma de estresse pode minimizar o dano por outro. As plantas tendem a ser menos sensíveis à radiação UVB, sob a seca ou deficiência de minerais, enquanto aumenta a sensibilidade em baixos níveis de luz visível. As duas variedades demonstraram que os estresses por UVB e por estresse hídrico moderado não influenciaram na capacidade fotossintética das mesmas.

A radiação ultravioleta B tem sido demonstrada por reduzir a fotossíntese por alterações diretas no fotossistema II (Rozema *et al.*, 2002), enquanto que a seca pode reduzir a fotossíntese pelo fechamento dos estômatos e por efeitos bioquímicos (Bettaieb *et al.*, 2011). Portanto, as limitações específicas sobre a fotossíntese pode variar em resposta a estes estresses específicos, bem como pela intensidade dos mesmos.

Analisando o fator variedade sobre o parâmetro taxa de transpiração (E), a RB867515 obteve a maior média entre as variedades. A exposição de plantas de alface (Basahi *et al.*, 2014) e de girassóis (Chechin e Corniani, 2008) para os estresses por radiação UVB elevada e de seca afetou significativamente e negativamente a taxa de transpiração. No entanto, a amplitude dos efeitos de ambos os fatores de estresse eram dependentes das interações. Isto resultou no alívio dos efeitos negativos da seca sobre transpiração pela radiação UVB nos dois casos.

Sob condições de baixa disponibilidade hídrica, ocorre uma queda no potencial de água das folhas, levando à perda de turgescência e à redução da condutância estomática. É essa redução na condutância estomática que constitui

uma das primeiras estratégias utilizadas pelas plantas para diminuir a taxa de transpiração para manter a turgescência celular. Isso ocorre porque a planta pode vir a perder água a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte. Com isso, o potencial hídrico da folha diminui, ocorrendo o fechamento dos estômatos e consequente diminuição da fotossíntese. Entretanto, as cultivares onde a redução da transpiração ocorre posteriormente às demais cultivares, sob estresse hídrico, essa cultivar mantém a capacidade fotossintética por tempo mais prolongado, o que contribui para a formação de maior biomassa e, possivelmente uma maior produtividade (Farooq *et al.*, 2009).

A maior eficiência do uso da água verificada na variedade RB92579 é confirmada pela manutenção das taxas de fotossíntese líquida nos diferentes tratamentos e na baixa taxa de condutância estomática observadas nessa variedade, aumentando, portanto, a eficiência do uso da água nessas condições. A razão entre a taxa fotossintética e a taxa de transpiração resulta na eficiência do uso da água (EUA), que é mais um parâmetro fisiológico que expressa quantitativamente o comportamento momentâneo das trocas gasosas na folha e que varia entre e dentro das espécies vegetais (Larcher, 2004).

Teor de Malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

No presente estudo a exposição de plantas de cana-de-açúcar à alta UVB desencadearam o processo lipoperoxidativo nas membranas foliares. O presente trabalho mostra que na variedade RB92579, a exposição à elevada UVB causou mais danos à membrana, como avaliado pelo aumento da peroxidação lipídica em folhas de cana-de-açúcar, independentemente do regime hídrico, do que na variedade RB867515.

Resultados divergentes foram encontrados por Cechin e Corniani (2008), que avaliando os efeitos do estresse hídrico e UVB em plantas de girassóis concluíram que, o estresse hídrico agiu de uma forma mais destrutiva do que o estresse por alta radiação UVB, causando assim, danos à membrana como verificado pela elevada peroxidação lipídica no tratamento de estresse hídrico com baixa UVB. Observaram ainda que, quando a elevada radiação UVB foi aplicada em conjunto com o estresse hídrico, houve interação entre os dois fatores, resultando assim na diminuição do efeito da seca como um fator único.

Diversas condições de estresses em plantas, dentre eles a exposição à UVB, podem promover aumento na produção de ERO acarretando estresse oxidativo (Alexieva *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2003). A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de ERO, é utilizado para se avaliar o nível de estresse oxidativo presente (Verma e Dubey, 2003). Malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, é utilizado como indicador da ocorrência de estresse em plantas. Apesar de existir muita controvérsia na literatura quanto sua especificidade, o MDA permanece como o indicador mais utilizado (Armstrong e Browne, 1994).

Quando submetidas à suspensão parcial da rega e baixa incidência de UVB, as plantas da variedade RB92579 no presente estudo resultaram em uma alta acumulação de H_2O_2 o que não corrobora com o baixo conteúdo de MDA no mesmo tratamento. A alta peroxidação lipídica evidenciada através do conteúdo superior de MDA no tratamento com 50% da capacidade de campo e incidência elevada de UVB, também não foi confirmada pelo teor de H_2O_2 , que foi relativamente baixo nesse mesmo tratamento, o que sugere, portanto, que o estresse por UVB induziu o estresse oxidativo nas plantas, e que outras EROs

como o radical superóxido ($O_2 \bullet^-$), radical hidroxila ($OH\bullet$) e oxigênio singlete (1O_2) podem ter sido produzidas em níveis superior ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocasionando uma maior peroxidação lipídica nesse tratamento.

Em plântulas de trigo, o estresse hídrico e a radiação UVB resultaram na alta acumulação de H_2O_2 , o que causou a peroxidação lipídica, juntamente com a redução do crescimento. Além disso, o tratamento com alta UVB foi o que causou danos mais graves do que o estresse hídrico em plantas de trigo, medidos pela redução mais evidente no crescimento e um maior acúmulo de H_2O_2 e aumento da peroxidação lipídica (Kakani *et al.*, 2003; Kinnunen *et al.*, 2001).

As EROs e especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também podem agir como sinalizador para ativação de respostas de defesa contra estresse, quando presente em quantidades relativamente baixas (Levine *et al.*, 1994; Low e Mérida, 1996), porém, quando em condições de estresse severo, pode ocorrer um aumento considerável na produção de EROs, as quais podem levar a uma cascata de eventos que inicia com a peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (Greggains *et al.*, 2000; Panda e Khan, 2009).

Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)

Os estresses abióticos proporcionam uma série de alterações bioquímicas, especialmente, no sistema de defesa antioxidante (Gratão *et al.*, 2005). No entanto, é importante ressaltar que as alterações observadas, assim como a adaptação das plantas a condições adversas, estão fortemente associadas à duração e intensidade do estresse (Behera *et al.*, 2003), a espécie (Ghannoum, 2009) e genótipo avaliado (Abraham *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam a importância do aumento concomitante nas atividades dessas duas enzimas na proteção contra danos oxidativos. O aumento da atividade de APX e da CAT nas plantas bem irrigadas sob alta UVB em relação à baixa UVB na variedade RB92579 indica a importância dessas enzimas na desintoxicação do H_2O_2 e na proteção contra danos oxidativos provocados pela UVB. Entretanto, a não alteração significativa no conteúdo de CAT e APX e a baixa peroxidação lipídica promovida pela alta UVB na variedade RB867515 quando em condição de irrigação plena, pode indicar que esta cultivar possui mecanismos de tolerância e, por isso, não necessita de uma ativação maior dessas enzimas. Alguns estudos sugerem que os genótipos com maior aumento na atividade dessas enzimas, em resposta ao déficit hídrico, sofreram maior sensibilidade à seca (Yong *et al.*, 2006; Sgherri *et al.*, 2000). Estes autores também verificaram que nas cultivares consideradas tolerantes, a manutenção da atividade das enzimas antioxidantes analisadas foi suficiente para manter o H_2O_2 e a peroxidação lipídica em níveis basais.

O aumento da atividade de SOD verificado nas plantas irrigadas das duas variedades sob alta incidência de UVB em comparação as mesmas plantas sob baixa UVB, corrobora com os resultados obtidos no conteúdo de H_2O_2 , que também em condições de irrigação plena, as plantas sob alta UVB apresentaram uma maior produção dessa ERO quando comparada às plantas no mesmo regime hídrico sob baixa UVB.

A atividade relativamente elevada da enzima SOD, juntamente com as outras duas enzimas, CAT e APX, sob alta UVB, demonstra que a destoxificação das EROs é realizada por um conjunto de enzimas. Na variedade RB867515 em condições de plantas bem hidratadas sob alta UVB, observou-se que o aumento

da atividade conjunta da SOD, geradora de H_2O_2 , com a CAT e APX, eliminadoras de H_2O_2 , é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox.

Os resultados obtidos para a atividade de SOD sugerem que a radiação UVB quando aplicada em conjunto com o estresse hídrico, não promoveu efeito significativo na atividade desta enzima. A atividade de SOD significativamente superior na variedade RB92579 em comparação à variedade RB867515, também corrobora com os dados obtidos no conteúdo de peróxido de hidrogênio nesse mesmo estudo, onde a variedade RB92579 sob estresse hídrico e baixa UVB, apresentou o maior conteúdo de H_2O_2 .

Alguns estudos relataram aumento de atividade da SOD em plantas expostas à alta UVB. Selvakumar (2008) verificou aumento na atividade de SOD em plantas de *Crotalaria juncea* e *Vigna unguiculata* e Han *et al.* (2009) em *Picea asperata*, sendo o aumento acentuado pela elevação na temperatura ambiente. Contudo, Costa *et al.* (2002) observaram diminuição da atividade da SOD em cotilédones de girassol expostos à UVB.

2D-PAGE e MS

A análise dos arquivos de imagem digitalizados obtidos após eletroforese bidimensional das amostras de cada tratamento demonstrou baixa variação experimental entre as réplicas de um mesmo tratamento, o que favoreceu a confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, o tratamento com rega parcial e alta intensidade de radiação ultravioleta B (50% C.P. + AUVB) apresentou uma média superior de spots/gel (59), em relação à média do tratamento sob baixa UVB (33). Do total de proteínas distintas detectadas (69) na comparação entre os tratamentos, observou-se também que foram obtidas quantidades distintas de

spots exclusivos de cada tratamento, 36 para o tratamento 50% C.P. + AUVB e 15 para o tratamento 50% C.P. + BUVB. O tratamento com seca e baixada UVB apresentou 4 *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes, enquanto que o tratamento sob rega parcial e alta UVB não apresentou nenhum spot significativamente variável.

Do total representando proteínas distintas, 18 *spots* ou 26% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS. Menos da metade do proteoma analisado mostrou-se diferencial entre os tratamentos em condições de suspensão parcial da rega, com baixa ou alta UVB, o que pouco favorece significativamente a detecção de proteínas e peptídeos mais abundantes na amostra biológica.

Apenas 4 dos 18 DEPs não resultaram em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi de aproximadamente 77%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos.

Análises de Bioinformática

A busca dos espectros de massa produzidos para as DEPs nos bancos de dados traducionais permitiu a identificação presumível (*in silico*) para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos. A distribuição das anotações obtidas (Figura 11) demonstrou uma quantidade igual de DEPs nos dois tratamentos, 50% C.P. + AUVB (5) e 50% C.P. + BUVB (5). Ao contrário do esperado para um diagrama de Venn com estes tipos de dados, ou seja, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados, houve sobreposição de

anotações entre DEPs de ambos os tratamentos: 2 anotações foram iguais para *spots* diferentes oriundos dos dois tratamentos (proteínas Q6L3A1 e P0C1M0).

Identificação presumível e anotação das DEPs

Com base na identificação das DEPs de cana-de-açúcar (Tabela 9), a descrição das proteínas a seguir é realizada com base na ocorrência em cada tratamento contrastante para radiação ultravioleta B, e conforme sua localização subcelular e processo biológico, de acordo com a base de dados UniProt.

Na comparação entre os tratamentos 50% C.P. + AUVB X 50% C.P. + BUVB, do total de DEPs anotados, 22% foram identificados na parede celular vegetal e/ ou potencialmente envolvidas em estruturas extracelulares, sendo que, 100% dessas proteínas localizadas na parede celular foram identificadas quando sob alta incidência de radiação UVB. A seguir, foram descritas essas proteínas localizadas na parede celular e/ou potencialmente relacionadas com respostas aos estresses impostos.

A Proteína associada à flavonóides (*spot* 47) foi identificada como mais abundante no tratamento submetido à alta incidência de UVB. Essa proteína está envolvida na via de biossíntese de flavonóides, que faz parte da biossíntese de metabolitos secundários e é relacionada em respostas adaptativas das plantas e de proteção aos estresses ambientais (Walia *et al.*, 2007). A expressão dessa proteína provoca a acumulação de flavonóides e fitoalexinas isoflavonóides e está envolvida na via de defesa à ácido salicílico. Os flavonóides representam uma classe de metabólitos secundários que é difundido no reino vegetal e pode servir como funções específicas na pigmentação das flores, proteção contra UVB e defesa das plantas contra patógenos (Dixon e Paiva, 1995). Há um estudo em

bagas de uva, mostrando que essa enzima foi localizada no retículo endoplasmático rugoso e citoplasma das células, enquanto que algumas foram encontradas na parede celular (Tian *et al.*, 2008).

Ainda sob elevada radiação ultravioleta B, a Proteína associada à Lignina (*spot* 45) foi encontrada de forma exclusiva nesse tratamento e, é constituinte da parede celular, desempenhando um papel importante na biossíntese de lignina e flavonóides (Grimmig *et al.*, 1997). A lignina é o componente estrutural principal da parede celular secundária de plantas e, depois da celulose, é o polímero orgânico mais abundante na crosta terrestre (Moerschbacher *et al.*, 1990). O conteúdo e a composição da lignina diferem entre os diferentes tipos de células dentro de um único tecido. Mesmo dentro de uma única parede celular, a estrutura e/ou composição da lignina podem mostrar uma considerável variação. Além disso, a heterogeneidade da lignina é influenciada por estresses ambientais (Joseleau e Ruel, 1997). Dessa forma, acredita-se que a regulação positiva dessa enzima nas plantas de cana-de-açúcar (variedade RB867515) pode desempenhar um papel importante na defesa contra os fotodanos provocados pela alta UVB por meio do fortalecimento da parede celular através do aumento da biossíntese de lignina e também com o aumento da síntese de flavonóides.

A proteína de choque térmico (*spot* 36) também foi induzida exclusivamente no tratamento sob elevada UVB. As proteínas de choque térmico (HSPs) servem como chaperonas moleculares e desempenham papéis críticos na proteção de células e dobramento de proteínas em quase todos os organismos. Essa proteína é ativada por choque térmico, mas há relatos que também é induzida por uma variedade de fatores de estresses, tais como a infecção

microbiana, estresse osmótico, radiação ultravioleta (UVB) e metais pesados. Ela funciona para proteger organismos contra danos (Pockley, 2003).

5.5 CONCLUSÕES

Os estresses simultâneos seca moderada e UVB alteraram significativamente o proteoma foliar enriquecido de parede celular de cana-de-açúcar.

A exposição das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579) à alta UVB associada ao estresse hídrico moderado desencadeou processo lipoperoxidativo nas membranas de células foliares.

Proteínas identificadas como constituintes da parede celular vegetal e/ ou potencialmente envolvidas em estruturas extracelulares, envolvidas diretamente na biossíntese de lignina e flavonóides foram mais abundantes quando sob alta incidência de radiação UVB, indicando um papel importante na defesa contra os fotodanos provocados pela UVB.

5.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES / DS e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Os autores agradecem ao Dr. Djalma Euzébio (EECAC/UFRPE) pelo fornecimento das variedades RB867515 e RB92579. Ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo pela disponibilização dos bancos de dados.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham E, Rigo G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 51:363-372.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24:1337-1344.
- Armstrong D and Browne R (1994) The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, 366p.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104:280-292.
- Basahi JM, Ismail IM and Hassan IA (2014) Effects of Enhanced UV-B Radiation and Drought Stress on Photosynthetic Performance of Lettuce (*Lactuca sativa* L. Romaine) Plants. *Annual Research & Review in Biology* 4(11):1739-1756.
- Behera SK, Nayak L, Biswal B (2003) Senescing leaves possess potential for stress adaptation: the developing leaves acclimated to high light exhibit increased tolerance to osmotic stress during senescence. *J Plant Physiol* 160(2):125-131.
- Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F and Brahim MB (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant* 33(4):1103-1111.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:48-54.
- Brosche, M and Strid, A (2003) Molecular events following perception of UV-B radiation by plants. *Physiol Plant* 117:1-10.
- Caldwell MM, Bjorn LO, Bornmann JF, Flint SD, Kulandaivelu G, Teramura AH, Tevini M (1998) Effects of increased solar UV-B on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology* 46:40-52.
- Caldwell MM, Ballare CL, Bornman JF, Flint SD, Björn LO, Teramura, A.H. et al. (2003) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem Photobiol Sci* 2: 29-38.
- Chechin I, Corniani N, Fumis TD and Cataneo AC (2008) Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. *Radiation Environmental and Biophysics* 47:405-413.
- Costa H, Gallego SM, Tomaro ML (2002) Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science* 162:939-945.
- Damatta FM, Chaves ARM, Pinheiro HÁ, Ducatti C and Loureiro ME (2003) Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science* 164:111-117.
- Dixon RA and Paiva N (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.

- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D and Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185-212.
- Giannopolitis CN and Ries SK (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants - *Plant Physiol* 59:309-314.
- Ghannoum O (2009) C-4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* 103: 635-644.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481-494.
- Greggains V, Finch-Savage WE, Quick WP and Atherton NM (2000) Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. *New Phytologist* 148:267-276.
- Grimmig B, Matern U (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive *cis*-acting element. *Plant Mol Biol* 33:323-341.
- Han C, Liu Q, and Yang Y (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation* 58:153-162.
- Health RL and Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198.
- Hofmann RW, Campbell BD, Bloor SJ, Swinny EE, Markham KR, Ryan KG, Fountain DW (2003) Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. - physiological links to plant productivity and water availability. *Plant, Cell & Environment* 26:603-612.
- Jordan BR, James PE, Strid A, Anthony RG (1994) The effect of ultraviolet-b radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue UV-B induced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. *Plant Cell Environ* 17:45-54.
- Joseleau J-P, Ruel K (1997) Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes: an investigation by Fourier transform infrared cross-polarization magic angle spinning ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy. *Plant Physiol* 114:1123-1133.
- Kakani VG, Reddy K, Zhao R, Salaja K (2003) Field responses to UV-B radiation: a review. *Agr. Forest Met* 120:191-218.
- Kinnunen H, Huttunen S, Laakso K (2001) UV-absorbing compounds and waxes of Scots pine needles during a third growing season of supplemental UV-B. *Env Pollut* 112:215-220.
- Komatsu S and Yanagawa Y (2013) Cell wall proteomics of crops. *Front Plant Sci* 4:17.
- Larcher W (2004) *Ecofisiologia Vegetal*. Trad.: Prado CHBA. São Carlos: RIMA, p 531.
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89:871-885.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R and Lamb CJ (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.

- Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25:335-361.
- Low PS and Merida JR (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant* 96:533-542.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol* 148:350-382.
- Mckenzie RL, Björn LO, Bais A, Ilyas M (2003) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2:5-15.
- Moerschbacher BM, Noll U, Gorrichon L, Reisener H-J (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol* 93:465-470.
- Nakano Y and Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant & Cell Physiology* 22:867-880.
- Negri AS, Prinsi B, Scienza A, Morgutti S, Cocucci M, Espen L (2008) Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *Journal of Plant Physiology* 165:1379-1389.
- Nogueira RJMC, Albuquerque MB, Silva EC (2005) Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. In: Nogueira RJMC, Araújo EL, Willadino LG, Cavalcante UMT (eds), *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*, pp 22-31, Imprensa Universitária da UFRPE, Recife, Brasil.
- Panda SK and Khan MH (2009) Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195:442-454.
- Pincelli, R.P. 2010. Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas. 78 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.
- Pfundel EE, Ppan RS and Dilley RA (1992) Inhibition of violaxanthin deep oxidation by ultraviolet-b radiation in isolated chloroplasts and intact leaves. *J. Plant Physiol* 98:1372-1380.
- Pockley AG (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 362(9382):469-476.
- Rong-Hua L, Pei-guo G, Baumz M, Grando S, Ceccarelli S (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5(10):551-557.
- Rozema J, Björn LO, Bornman JF, Gaberščik A, Häder DP, Trošt T, Germ M, Klisch M, Gröniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni-Hall R, de Bakker NVJ, Staaaj J and Meijkamp BB (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-B-absorbing compounds. *J Photochem Photobio* 66:2-12.
- Sangtarash MH *et al.* (2009) Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. Article in Press. *Environmental and Experimental Botany* 66(2):212-219.
- Selvakumar V (2008) Ultraviolet-B radiation (280-315 nm) invoked antioxidant defense systems in *Vigna unguiculata* L. Walp and *Crotalaria juncea* L. *Photosynth* 46:98-106.

- Simões Neto DE, Melo LJO, Chaves A, Lima ROR (2005) Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-açúcar - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. UFRPE: 28p.
- Souza CC, Oliveira FA, Silva IF, Amorim Neto MS (2000) Avaliação de métodos determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 4(3):338-342.
- Scholander PF, Hammel HT, Hemingsen EA, Bradstreet ED (1965) Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. Proceedings of the National Academy Science 51:119-125.
- Smit MA and Singels A (2006) The response of sugarcane canopy development to water stress. Field Crops Research 98:91-97.
- Sgherri CLM, Maffei M, Navari-Izzo P (2000) Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. J. Plant Physiol 157:273-279.
- Taiz L and Zeiger E (2009) Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 449-484.
- Tian L, Wan SB, Pan QH, Zheng YJ, Huang WD (2008) A novel plastid localization of chalcone synthase in developing grape berry. Plant Sci 175:431-436.
- Van Dillewijn C and Waltham M (1952) Botany of sugarcane. New York: Chronica Botanica 371p.
- Verma S and Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci 164:645-655.
- Walia H, Wilson C, Zeng LH, Ismail AM, Condamine P, Close, TJ (2007) Genomewide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage. Plant Mol Bio 63:609-623.
- Yong T, Zongsuo L, Shao H, Feng D (2006) Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Astragali* at seedling stage. Colloids and Surface B: Biointerfaces 49(1):60-65.
- Zlatev Z and Lidon FJC (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. Emir J Food Agric 24(1):57-72.

6. Capítulo III

Fisiologia e Proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) sob estresses por radiação ultravioleta B e déficit hídrico severo

Amanda Emanuella Rocha de Souza¹, Tercilio Calsa Junior¹

¹Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética,
Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Brasil

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes no âmbito social, econômico e ambiental para o Brasil. A demanda crescente do bioetanol pelo aumento da frota bicomcombustível vem fazendo surgir diversos estudos nessa cultura, de forma a elevar a produção desse combustível produzido a partir da conversão de outros componentes do material vegetal, como polissacarídeos da parede celular de folhas e colmo. Assim como as demais culturas, a cana-de-açúcar é dependente das condições climáticas para seu desenvolvimento, severamente afetado por alguns fatores de estresse ambientais, como o déficit hídrico e a elevação da radiação ultravioleta B. Nesse contexto, as análises fisiológicas, enzimáticas e de proteínas da fração enriquecida de parede celular envolvidas nos mecanismos de respostas à associação desses estresses abióticos na cana-de-açúcar é essencial para o desenvolvimento de futuras estratégias de melhoramento genético desta cultura. Para tanto, foi realizado estudo simulando seca severa e aumento da UVB, e analisado o proteoma, o comportamento fisiológico e antioxidante em folhas de cana-de-açúcar. O déficit hídrico aplicado juntamente com a UVB promoveu efeitos significativos na interação dos três fatores (irrigação, UVB e variedade). A partir das variáveis fisiológicas e enzimáticas analisadas, verificou-se que as plantas mostraram danos mais graves quando submetidas à seca, do que quando esta foi aplicada em conjunto com alta UVB, sugerindo efeito protetor de um fator de estresse sobre o outro na planta. A elevada UVB promoveu maior acúmulo de proteínas envolvidas em diferentes categorias funcionais, como fotossíntese, defesa, metabolismo de proteínas, metabolismo secundário, entre outras. A alta incidência de UVB também proporcionou regulação positiva de proteínas preditas de parede celular e associadas à biossíntese e modificação de lignina e flavonóides, podendo conferir à cana-de-açúcar maior flexibilidade e/ou rigidez na parede celular, bem como proteção contra danos causados pela radiação. Dessa forma, esses resultados começam a apontar mecanismos moleculares e fisiológicos na dinâmica do proteoma enriquecido em parede celular da cana-de-açúcar em resposta ao estresse por seca e UVB.

Palavras-chave: Proteômica subcelular; UVB, estresse hídrico, celulose, lignina, flavonóides; espectrometria de massa.

Abstract

Sugarcane is one of the most important crops in social, economic and environmental context in Brazil. The growing demand of bioethanol by increased flexfuel fleet is giving rise to many studies on this crop, in order to increase production of this fuel from the conversion of other plant material components such as polysaccharides of the sugarcane cell wall. As well as other crops, sugarcane is dependent on the weather for their development, which is severely affected by some environmental stress factors such as drought and increased ultraviolet radiation. In this context, the physiological, enzyme and cell wall-enriched protein fraction analyses associated to sugarcane mechanisms in response to abiotic stresses is essential for the development of future breeding strategies of this crop. To this aim, a study was conducted simulating drought and increased UVB radiation and with analysis of the proteome, the physiology and antioxidant metabolism in sugarcane leaves. Water stress applied along with UVB promoted significant effect on the interaction of three factors (irrigation, UVB and variety). It was found that in some physiological and enzymatic variables, the plants showed more severe damage when subjected to drought than when exposed to in conjunction with high UVB, suggesting a protective effect of a stress factor over the other. The high UVB promoted greater accumulation of some proteins involved in different groups of functional categories, such as photosynthesis, defense, metabolism of proteins, secondary metabolism, among others. The high incidence of UVB also provided upregulation of predicted cell wall proteins associated with the of lignin and flavonoids biosynthesis and modification, which may provide more flexibility and/or rigidity to sugarcane cell wall as well as protection against damage caused by radiation. Thus, these results begin to point molecular and physiological mechanisms, and cell wall-enriched proteome fraction dynamics of sugarcane in response to drought stress and UVB.

Keywords: subcellular proteomics; UVB; water stress; cellulose; lignin; flavonoids; mass spectrometry.

6.1 INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil contribui de forma importante para o fornecimento de energia no país. A energia renovável da agricultura está composta por biomassa de cana de açúcar (42%), energia hidráulica (28%), lenha (20%) e outras fontes (10%). Essas respondem por quase metade do total de fornecimento de energia (MME/EPE, 2013).

Em virtude das mudanças climáticas globais e da necessidade de consumo de energias renováveis com menor impacto sobre o clima mundial, a produção de energias renováveis tem sido estimulada, sobretudo a partir culturas de interesse agroindustrial, como a cana-de-açúcar. Além do etanol, utilizado como combustível, a cana-de-açúcar pode ser fonte de biomassa, além da sua grande importância no cultivo para a produção do açúcar (Waclawosky *et al.*, 2010). Uma das problemáticas atuais enfrentadas pela humanidade se refere ao aumento da demanda energética. A cana-de-açúcar vem se mostrando uma ótima alternativa para exploração da sua biomassa vegetal transformada em etanol no Brasil, no entanto, essa biomassa ainda não é utilizada.

A produção de energia renovável a partir da biomassa vegetal também atende a vários requisitos de sustentabilidade, destacando a redução nas emissões dos gases do efeito estufa, sendo uma alternativa potencial para substituir parcialmente os combustíveis fósseis. Além disso, o material da parede celular vegetal é também de grande importância para nutrição humana e de animais, e como fonte de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papel e celulose. Por estas razões, o estudo da parede celular vegetal é de grande interesse tanto do ponto de vista da ciência básica, como da ciência aplicada (Farinas, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com produção de 634,767 milhões ton de colmo (safra 2014/2015) e produção de açúcar de 35,560 milhões ton de açúcar. O Estado de Pernambuco é o segundo maior produtor de cana-de-açúcar da Região Nordeste, com uma área plantada atualmente de 260 mil ha na safra 2014/2015 (CONAB, 2015).

Fatores como o clima e a disponibilidade hídrica influenciam decisivamente no desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, na produção de sacarose pela cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é uma planta muito presente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que, entre os diversos estresses abióticos, a deficiência hídrica é considerada como o principal limitador ambiental à produção de cana-de-açúcar (Inman-Bamber e Smit, 2005).

O estresse hídrico acarreta prejuízos à planta de diversas formas, afetando várias funções fisiológicas, por exemplo, a condutância estomática, transpiração, fotossíntese líquida e a eficiência no uso da água (Gonçalves *et al.*, 2010).

Os estresses geralmente são estudados e caracterizados em estudos de um único estresse, porém em condições de campo muitas vezes ocorre a interação entre mais de um tipo de estresse. Tal situação maximiza os efeitos deletérios causados por cada estresse individualmente, o que leva a respostas fisiológicas mais severas, e a alterações específicas na expressão gênica (Silva *et al.*, 2012).

Além dos fatores ambientais atuando adversamente no desempenho das plantas, atualmente as plantas estão sujeitas aos efeitos das mudanças ambientais globais causadas pelas atividades antrópicas tais como o aumento da

incidência da radiação UVB em consequência da destruição da camada de ozônio causada pelo uso de clorofluorcarbonetos (CFCs) (Molina e Rowland, 1974).

A destruição da camada de ozônio está intimamente relacionada a um aumento da radiação UVB sobre a superfície da Terra (Kerr e McElroy, 1993). A radiação UVB corresponde a uma pequena fração do espectro solar (280-320nm), mas é potencialmente prejudicial, uma vez que, estes comprimentos de onda curtos são capazes de causar diversos efeitos fotobiológicos e provocar danos deletérios nas células. As plantas são vulneráveis ao aumento da radiação UVB porque muitos componentes celulares, tais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios podem absorver a radiação UVB diretamente (Jordan, 1996). Segundo Schultz *et al.* (1998), possíveis efeitos do aumento da intensidade da radiação UVB na terra seriam a ativação de genes na rota dos fitopropenóides culminando numa maior acumulação de flavonóides e antocianinas, menores concentrações de clorofila e carotenóides, inativação (dano) do fotossistema II e das enzimas fotossintéticas, diminuição da fotossíntese, foto-oxidação do ácido indolacético (AIA, auxina), alteração dos compostos aromáticos, alterações da concentração de xantofila, efeitos sobre o metabolismo de nitrogênio, bem como, o espessamento de folhas e composição das ceras, podendo com isso, conferir maior resistência às doenças.

A sensibilidade das plantas à radiação UVB pode ser alterada por fatores abióticos, tais como a disponibilidade de água. Mittler (2006) salientou a importância de se estudar a tolerância das plantas a uma combinação de diferentes condições de estresse, porque no campo, as plantas são rotineiramente submetidas a uma combinação de diferentes estresses abióticos e também porque nesta situação o dano pode ser letal para as plantas.

Os efeitos deletérios da radiação UVB sobre o crescimento, produtividade e fotossíntese em plantas superiores têm sido extensivamente estudados (Rybus-Zajac e Kubis, 2010; Skórska, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes a aclimação de plantas para uma combinação de estresses simultâneos de UVB e seca.

Esses estresses ambientais podem gerar o estresse oxidativo, que pode ser definido como uma perda de equilíbrio na relação antioxidantes/oxidantes. A elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) estimulado por diferentes tipos de estresses abióticos pode afetar a homeostase celular, pois essas moléculas podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucléicos (Cassells e Cury, 2001), agravando os danos nos vegetais que se refletem, seja na redução do crescimento, seja na produtividade. Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase de ascorbato (APX) e catalase (CAT) desempenham um papel importante e proteger contra estresse oxidativo (Apel e Hirt, 2004).

As plantas respondem aos estresses, em parte, através da modulação sua expressão genética, o que resulta no restabelecimento da homeostase celular, desintoxicação de toxinas e de recuperação de crescimento (Xiong e Zhu, 2002). O sistema antioxidativo é constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (Dewir *et al.*, 2006).

O entendimento desses processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares nas plantas sob estresses simultâneos é de suma importância para que seja possível o desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar tolerantes a esses estresses ambientais.

Assim, sob essas perspectivas de mudanças climáticas, com previsões de aumento na escassez hídrica e na incidência de radiação ultravioleta B, a produtividade da cana-de-açúcar, pode vir a ser afetada negativamente. Os possíveis efeitos prejudiciais promovidos pela interação desses estresses ambientais, juntamente com a crescente preocupação mundial com o esgotamento de energias renováveis, vem impulsionando os estudos na área de energias limpas e renováveis.

Nesse contexto, a biotecnologia tem se revelado como uma ferramenta de grande importância no melhoramento vegetal com destaque, nos últimos anos, para a genômica funcional. Como as proteínas são efetores diretos da resposta ao estresse e por estarem mais próximas da resposta fenotípica, é justificada a importância do estudo proteômico de plantas submetidas aos estresses por déficit hídrico e UVB. A proteômica é uma ferramenta para a separação de um complexo de proteínas e se torna parte importante da estratégia da genômica funcional, permitindo a identificação de proteínas e peptídeos candidatos ao desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais (proteômicos) em cana-de-açúcar, que poderão auxiliar o melhoramento genético no desenvolvimento de novas variedades tolerantes aos estresses ambientais.

O presente trabalho objetivou identificar o conjunto de proteínas da fração enriquecida de parede celular durante o estresse simultâneo de seca severa e radiação ultravioleta B. Assim, a identificação de peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico e UVB pode auxiliar o entendimento das vias metabólicas ativadas na parede celular da planta.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada na cidade do Recife, no período de agosto de 2014 até novembro de 2014.

As plantas utilizadas foram propagadas através de fragmentos de secção transversal do colmo, contendo uma gema lateral. Foram plantados dois rebolos por vasos contendo 18 Kg de solo adubado com níveis adequados de macro e micronutrientes, sob condições fotoperiódicas naturais durante o período experimental. A temperatura máxima e mínima foi de 44,2°C e 30,4°C, respectivamente, e umidade relativa do ar máxima e mínima foi de 57% e 39%, respectivamente.

Do plantio até 90 dias após o plantio (DAP) todos os vasos receberam água na mesma quantidade (até a drenagem da rega) a fim de proporcionar bom desenvolvimento a todas as plantas. Aos 90 DAP iniciaram-se a aplicação dos tratamentos hídricos associados aos tratamentos de UVB (Figura 1).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 4 repetições, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (tratamentos de estresse hídrico x tratamentos de radiação x variedades), totalizando trinta e duas unidades experimentais). Foram utilizadas duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515), consideradas tolerantes à seca, que foram gentilmente cedidas pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro).

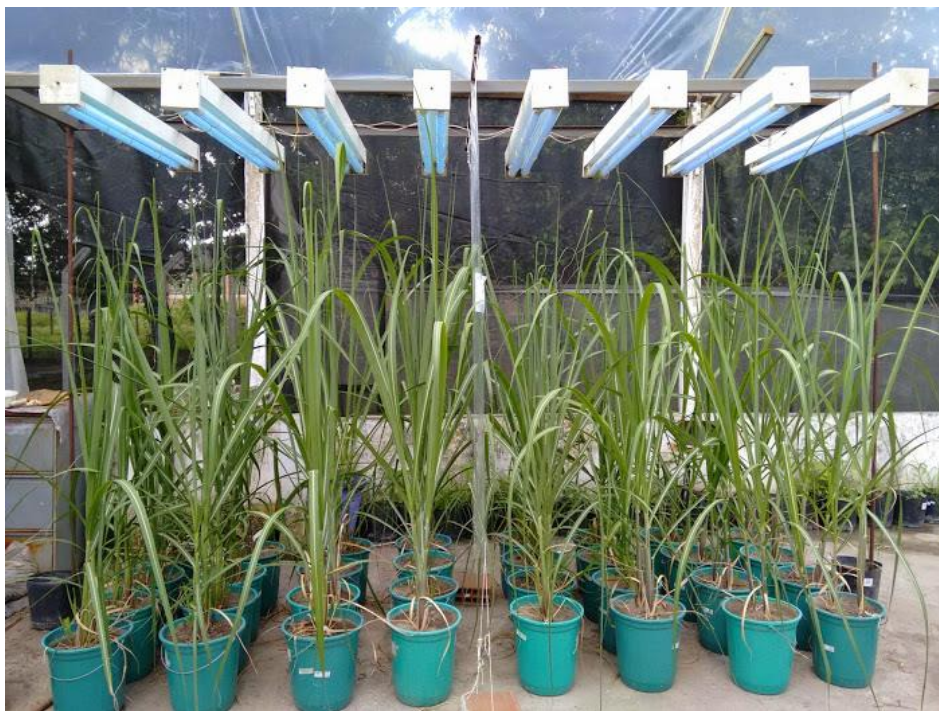


Figura 1. Plantas com 90 dias após o plantio recebendo aplicação dos tratamentos hídricos e de radiação ultravioleta B (UVB).

6.2.2 Tratamentos

As plantas foram submetidas a quatro tratamentos de diferentes níveis de irrigação e de radiação ultravioleta B: A) S.R. + BUVB: suspensão total de rega com baixa intensidade de radiação ultravioleta B; B) 100% C.P. + BUVB: 100% da capacidade de pote com baixa intensidade de radiação ultravioleta B; C) S.R. + AUVB: suspensão total de rega com alta intensidade de radiação ultravioleta B; D) 100% C.P. + AUVB: 100% da capacidade de pote com alta intensidade de radiação ultravioleta B (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes tratamentos de Irrigação e UVB plicados em plantas de cana-de-açúcar.

ID	Irrigação	UVB	Tratamentos
A	Suspensão total da rega	Baixa	S.R. + BUVB
B	Irrigado	Baixa	100% C.P. + BUVB
C	Suspensão total da rega	Alta	S.R. + AUVB
D	Irrigado	Alta	100% C.P. + AUVB

6.2.3 Estresse hídrico

A capacidade de pote foi adotada como o conteúdo de água retida pelo substrato após sofrer saturação e consequente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem, segundo Souza *et al.* (2000). A reposição da água no substrato foi realizada em função da evapotranspiração diária, verificada por pesagem.

6.2.4 Estresse de Radiação Ultravioleta B (UVB)

Como fonte de radiação ultravioleta B (UVB) foram utilizadas dezesseis lâmpadas fluorescentes de 40 W (TL 40W/12 RS SLV da Philips) fixadas em uma estrutura de alumínio, com sistema de roldanas para regular a distância entre as lâmpadas e o topo das plantas, dispostas acima dos vasos que são separados com uma cortina de poliéster para impedir a passagem lateral de UVB para outros tratamentos (Figura 2). As lâmpadas que irradiaram as plantas com baixa intensidade de UVB foram envoltas com filtro de poliéster (0,125 mm de espessura; Metalgamica Produtos Gráficos Ltda.) para bloquear comprimentos de onda (λ) menores que 320 nm, enquanto aquelas sobre os vasos contendo as plantas submetidas à maior incidência de UVB foram envoltas com acetato de celulose (0,10 mm de espessura; Grafix Plastics) para bloquear a radiação UVC

($\lambda < 280 \text{ nm}$). Para medir a radiação incidente sobre as plantas foi utilizado um Luxímetro digital para medição de luz ultravioleta UVB. A distância entre as lâmpadas e o topo das plantas foi mantida constante a 40 cm do topo das plantas através do sistema de roldanas.

A radiação média de UVB incidindo no topo das plantas foi de aproximadamente $9,3 \text{ W m}^{-2}$ e $1,7 \text{ W m}^{-2}$ para plantas tratadas com alta incidência e com baixa incidência, respectivamente. As plantas foram irradiadas com UVB por 7 h dia^{-1} centralizadas ao redor do meio dia. As coletas foram realizadas aos sete dias após o início da exposição à UVB e seca.

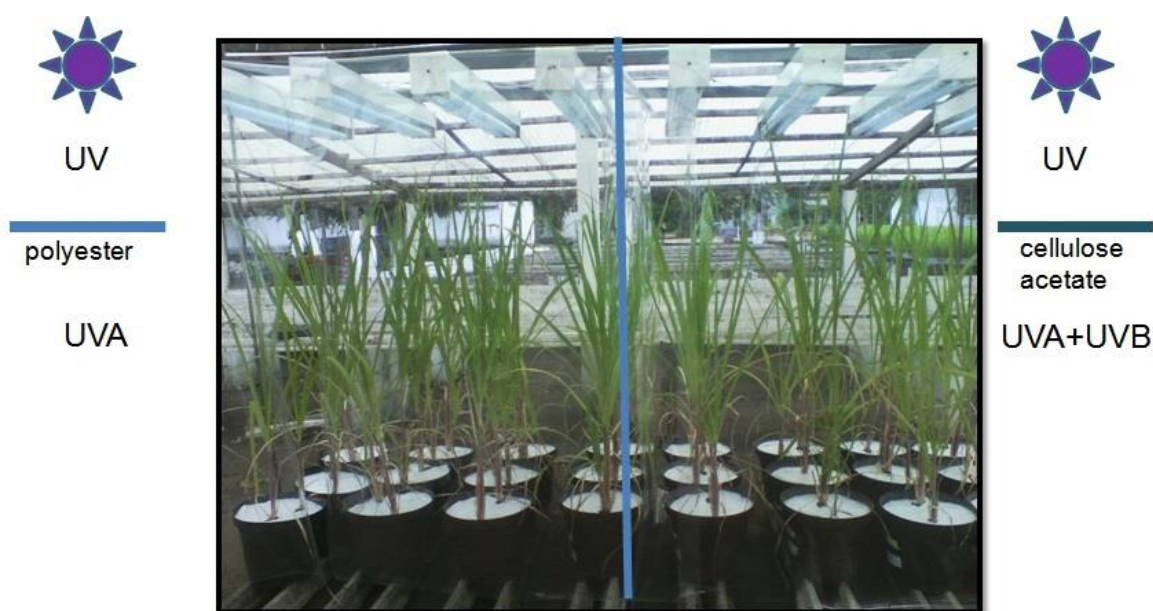


Figura 2. Esquema da transmissão e bloqueio das radiações UVA, UVB e UVC através dos filtros de poliéster e acetato de celulose.

6.2.5 Análises fisiológicas

6.2.5.1 Clorofila A, Clorofila B, Carotenóides e Teor relativo de água (TRA)

A quantificação das clorofilas (A e B) e carotenóides foi realizada a partir de folhas cortadas em pequenos pedaços em acetona a 80% (v/v), de cada tratamento, conforme o método proposto por Lichtenthaler (1987). O teor de clorofilas e carotenóides foi determinado com base em leituras de absorbância de 663 nm para a clorofila a, 645 nm para a clorofila b, e a 480 nm para os carotenóides, realizado no espectrofotômetro. Os teores de clorofilas e carotenóides (g kg^{-1}) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$Chla = [(12,25 \times Abs663) - (2,79 \times Abs645)] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chlb = [(21,5 \times Abs645) - (5,1 \times Abs663)] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chl\ total = Chla + Chlb$$

$$Car = \left[\frac{[(1000 \times Abs480) - (1,82 \times Chla) - (85,02 \times Chlb)]}{198} \right] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

O Teor relativo de água (TRA) foi determinado seguindo a metodologia de Cairo (1995). Em cada repetição foram retiradas seis amostras da região central da folha, acondicionadas em gelo e rapidamente transferidas para o laboratório. A determinação da massa fresca (MF) foi realizada em balança analítica em um período de até duas horas após a excisão. Essas amostras foram então mantidas em água deionizada durante 24 h e após remoção do excesso de água em papel filtro, foi obtida a massa túrgida (MT). Após isso, as amostras foram secas a 70 °C

por 48 h (MS) para determinação da massa seca do tecido. Os valores do TRA foram determinados pela equação: $(MF-MS)/(MT-MS) \times 100$.

6.2.5.2 Potencial hídrico foliar

Para a determinação do Potencial hídrico foliar foram realizadas através do uso de câmara de pressão (Scholander *et al.*, 1965), com protocolo padrão.

6.2.5.3 Fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gs) e eficiência do uso da água (EUA)

As medições de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram realizadas com o analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA).

6.2.6 Análises Bioquímicas e Enzimáticas

6.2.6.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido foi quantificado segundo protocolo de Alexieva *et al.* (2001). As amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirado 200 µL ao qual foram adicionado 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

6.2.6.2 Quantificação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Health e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2 g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 min. Foi retirado do sobrenadante 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo 20% de TCA e 0,5% de TBA. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C durante 30 min e, em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 min. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g.

6.2.6.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro.

6.2.6.4 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 µL de tampão fosfato de

potássio 80 mM, pH 7,5, 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 M, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 50 µL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro.

6.2.6.5 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 µM de NBT, 5 µM riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 µl de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

6.2.7 Análise estatística

Os dados fisiológicos e enzimáticos obtidos nesse experimento foram submetidos à análise de variância fatorial e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade através do software Statistica 8.0. Foram testados os efeitos individuais do estresse hídrico, da variedade e da radiação ultravioleta B, assim como da interação entre eles.

6.2.8 Análise proteômica

6.2.8.1 Obtenção do material vegetal para a análise proteômica

Depois de sete dias após a imposição dos estresses simultâneos de seca e UVB, foram coletadas folhas +1 [folha mais jovem que apresenta bainha visível, conforme nomenclatura de van Dillewijn e Waltham, (1952)]. Para as demais análises fisiológicas e enzimáticas, foram coletadas as folhas +2 das duas variedades de cana-de-açúcar. As amostras coletadas foram cortadas em frações menores que 1 cm, colocadas em tubos cônicos de 50 mL (Falcon), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em gelo seco, até estocagem a -80°C.

6.2.8.2 Extração de proteínas

As proteínas da fração enriquecida da parede celular foram extraídas de acordo com a metodologia sugerida por Sultana *et al.* (2014) com algumas modificações, que por sua vez, é uma variação do protocolo de Feiz *et al.* (2006). Cerca de 1 g de folha de amostra foliar foi triturada em nitrogênio líquido e extraído com 5 ml de tampão [acetato de potássio 5 mM (pH 4,6), sacarose 0,5 M, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM de PMSF e 0,4% (v/v) de β -mercaptoetanol]. O homogeneizado foi centrifugado a 7.000 rcf durante 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foi descartado e o pellet foi lavado e centrifugado (7.000 rcf durante 20 min) seis vezes com 5 mL de tampão de acetato de potássio 5 mM (pH 4,6) para remover a sacarose e inibidores da protease. O sobrenadante foi descartado e as proteínas da fração enriquecida de parede celular foram extraídas com duas extrações sequenciais com 2,5 mL de

tampão acetato de potássio contendo 0,2 M de CaCl_2 , seguido de duas extrações com 2,5 mL de tampão acetato de potássio contendo de 2 M de LiCl.

6.2.8.3 Quantificação e integridade das proteínas

A concentração das proteínas foi determinada com o uso do 2-D Quant kit da GE Healthcare. O princípio do kit é a ligação específica de íons cobre às proteínas, e o cobre não ligado às proteínas é medido com um agente colorimétrico. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração das proteínas.

As leituras da absorbância foram obtidas por leitura em espectrofotômetro a 480 nm. As leituras foram feitas em triplicatas, e a estimativa da concentração das proteínas foi feita por comparação com curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), proteína padrão do kit.

As proteínas da fração enriquecida de parede celular das amostras foram submetidas à eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida a 12,5% (v:v) (20 mA, por 2-3h). O gel resultante foi corado por Coomassie Brilliant Blue.

6.2.8.4 Eletroforese bidimensional

Focalização isoeletrica (IEF)

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Life Sciences) utilizando fitas IPG de 11 cm e pH 3-10 linear (GE Life Sciences) para 150 μg de proteínas de fração enriquecida de parede celular das amostras de folhas. As tiras foram hidratadas por 18 horas em IPG-Box (GE Life Sciences) à temperatura ambiente, contendo tampão de reidratação, DTT, IPG

buffer pH 3-10 e a amostra, completando 200µl. Logo após o período de reidratação, a IEF foi realizada durante quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante). Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (2 mA), 5 W de potência e temperatura de 10°C. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

Eletroforese (2D-PAGE)

Para a segunda dimensão (eletroforese), as fitas focalizadas anteriormente foram equilibradas em dois processos consecutivos. Inicialmente foi realizada a redução e, em seguida, a alquilação das fitas. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Posteriormente, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 minutos.

A segunda dimensão, ou eletroforese, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE 12.5%, utilizando uma fita de IEF por gel, constando das seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2,5 h; voltagem fixa de 300 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado. Os géis foram mantidos por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) e, posteriormente, imersos na solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de *coomassie* (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 24 h. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante (etanol 20%, ácido

acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

6.2.8.5 Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados utilizando no ImageScanner III (GE Life Sciences). Os seguintes parâmetros foram utilizados para a calibração do scanner: modo de transparência, resolução de 150 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie* blue. O scanner foi previamente calibrado com uma fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences) o qual fornece informações dos spots como sua localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MM) e porcentagem (%) de volume, além de informar as comparações e inferências estatísticas, como a razão da % de volume (Ratio), referente a razão entre dois spots correspondentes em um match, e o valor da ANOVA.

Todas as triplicatas de géis de cada tratamento foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots*, com verificação visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Foram realizadas quatro comparações binárias entre os diferentes tratamentos (Tabela 2). Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol) $\geq 1,5$ e ANOVA $\leq 0,05$. Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

Tabela 2. Comparações binárias realizadas com os quatro diferentes tratamentos.

Código do tratamento	Tratamentos	Comparações Binárias
A	S.R. + BUVB	C x A
B	100% C.P. + BUVB	D x B
C	S.R. + AUVB	C x D
D	100% C.P. + AUVB	A x B

6.2.8.6 Tripsinização dos spots

Os *spots* selecionados com variação significativa entre os tratamentos foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 50% de metanol e 2,5% de ácido acético durante 18 h, em temperatura ambiente, seguido de desidratação com solução de acetonitrila (100%). Em seguida, as proteínas foram reduzidas com solução de 10 mM de DTT (Ditiotreitol) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min à 60°C. Em seguida, o excesso de líquido foi retirado e foi adicionado 30 µL de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio para serem alquiladas, também por 30 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido excedente foi removido e os fragmentos dos spots foram lavados com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratados com acetonitrila (100%) por três vezes. Finalizadas estas etapas, foi adicionada cerca de 30 a 50 µL a solução contendo tripsina na concentração de 20 ng.µL⁻¹ e incubado a 37 °C em banho seco, overnight (16h), garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao spot foi adicionada a solução de extração (5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila) e após 40 minutos em

banho de gelo, em seguida a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

6.2.8.7 Espectrometria de massas

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF), localizado no CETENE (Centro de Tecnologia de Nordeste). Para tanto, os peptídeos concentrados e secos foram eluídos em Solução de Matriz (1% ácido α -ciano-4-hidrocínâmico). Os espectros MS foram obtidos de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com m/z menor que 700 Da. Os espectros obtidos foram analisados no programa Flex Analysis (BRUKER).

6.2.8.8 Análise de Bioinformática

Identificação das proteínas

Os espectros de massa (MS) dos peptídeos foram submetidos à identificação presumível pelo programa online MASCOT (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e ii) Viridiplante, utilizando como parâmetros, base de dados: SWISSPROT (<http://www.uniprot.org/>); organismo: *Saccharum* ou Viridiplantae; modificações pós-traducionais: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e

tolerância 200 ppm. Para a análise de dados MS/MS, realizado para as amostras não identificáveis via PMF, os espectros foram identificados através da análise dos respectivos arquivos *peaklist.xml* pelo método de busca de íons (*ion search*) contra os mesmos bancos de dados e parâmetros citados anteriormente, exceto: tolerância MS/MS 0,6 Da; e valor específico de massa/carga (*m/z*) de cada respectivo íon precursor. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior que o valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a $-10 \cdot \log(P)$, sendo P a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância estatística ($p < 0,05$).

Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta *Retrieve ID* e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, e mapeadas comparativamente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* com o programa MapMan-Mercator (Lohse et al., 2013; <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>) ajustado para base de dados de *Arabidopsis thaliana* (TAIR proteins release 10) e *Blast_cutoff* 80%. A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto de DEPs de cada tratamento foi utilizada em todas as comparações.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Umidade do Solo

Na Tabela 3, nota-se que, a 0 DAT não houve efeitos significativos ($p < 0,05$) para nenhuma fonte de variação. Após sete dias de imposição dos estresses (7 DAT), verifica-se que, o efeito foi altamente significativo ($P < 0,001$) promovido pelo fator Irrigação na variável Umidade do solo.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o parâmetro Umidade do Solo analisado nos solos dos vasos contendo as duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a diferentes regimes hídricos e níveis de UVB, aos 0 e 7 DAT.

Fonte de Variação	Valores de F	
	¹ US	
	0 DAT	7 DAT
Variedade (V)	0,8503 ^{NS}	0,1675 ^{NS}
Irrigação (I)	0,3525 ^{NS}	61,0311 ^{***}
UVB (U)	1,3812 ^{NS}	1,0242 ^{NS}
Variedade x Irrigação	4,1991 ^{NS}	0,3457 ^{NS}
Variedade x UVB	0,3577 ^{NS}	1,2306 ^{NS}
Irrigação x UVB	0,8563 ^{NS}	2,2378 ^{NS}
V X I X U	0,2810 ^{NS}	0,3912 ^{NS}

¹US- Umidade do Solo (% Vol.); 0 DAT- 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; *- Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

Na Figura 3, estão contidos os dados de umidade do solo, analisados no início (0 DAT) e ao final da aplicação estresse hídrico e UVB (7 DAT). De acordo com a Figura 14A, observa-se que os percentuais de umidade de solo, a 0 DAT, foram semelhantes entre as variedades e não variou significativamente entre os

tratamentos. A umidade do solo manteve praticamente constante nos vasos das plantas antes do início da aplicação dos estresses, com valores entre 16 a 21%. Entretanto, observou-se que, aos 7 DAT, o solo nos vasos das plantas submetidas à suspensão de rega, o manejo hídrico afetou significativamente a umidade do solo. Já o solo nos vasos das plantas submetidas à irrigação plena, no entanto, não houve significância entre as variedades e nem na interação entre os fatores. Os valores de umidade do solo, aos 7 DAT, variaram entre 2 e 18% entre os tratamentos (Figura 3B).

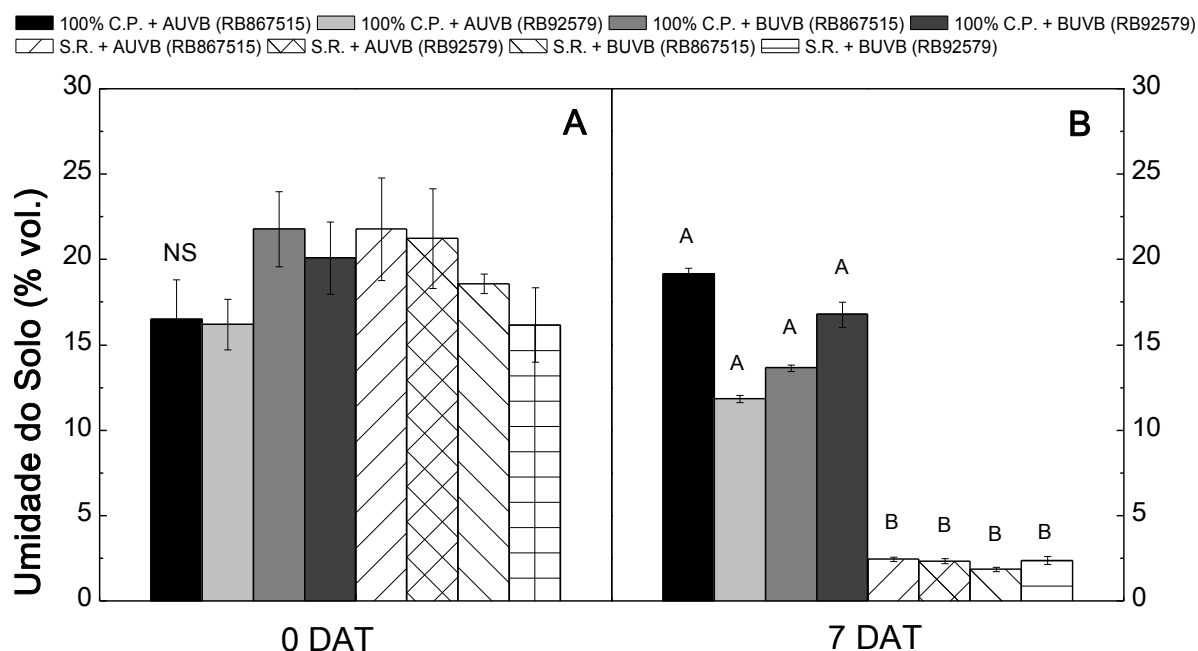


Figura 3. Teor de Umidade do Solo (% vol.) nos solos contendo as plantas de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT - 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; (Letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

6.3.2 Análises Fisiológicas

6.3.2.1 Clorofila A, Clorofila B, Carotenóides e Teor relativo de água

Conforme nota-se na ANOVA, para os parâmetros conteúdo de Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides, houve efeito significativo promovido por praticamente todos os fatores isolados, bem como, pelas interações entre os fatores. Na Tabela 4 verifica-se que houve efeito altamente significativo ($p < 0,001$) no conteúdo de Clorofila A promovido pela Irrigação e significativo ($p < 0,05$) nas interações Variedade x Irrigação e Variedade x Irrigação x UVB ($p < 0,05$).

Na variável Clorofila B, no entanto, foi observado que o estresse hídrico e UVB sofrido pelas duas cultivares de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), provocou diferenças estatisticamente significativas em quase todos os fatores isolados: irrigação e UVB, bem como, em todas as interações entre os fatores - Variedade x Irrigação, Variedade x UVB, Irrigação x UVB - e, altamente significativo ($p < 0,001$) na interação dos três fatores Variedade x Irrigação x UVB.

O conteúdo de Carotenóides apresentou efeitos significativos em todos os fatores isolados - Variedade, Irrigação e UVB - e, altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as interações entre os fatores - Variedade x Irrigação, Variedade x UVB, Irrigação x UVB e Variedade x Irrigação x UVB (Tabela 4).

De acordo com os resultados da análise de variância, os efeitos significativos no teor relativo da água (TRA) foram promovidos pelos fatores isolados Irrigação e Variedade, bem como, pela interação Variedade x Irrigação x UVB (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para os parâmetros Clorofila A, Clorofila B e Carotenóides analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas à seca e UVB, simultaneamente, aos 7 dias após o início dos tratamentos.

Fonte de Variação	Valores de F			
	¹ Clor A	² Clor B	³ Carot	⁴ TRA
Variedade (V)	0,405 ^{NS}	0,018 ^{NS}	9,779**	12,3**
Irrigação (I)	77,590***	549,190***	1107,146***	136,9***
UVB (U)	3,317 ^{NS}	202,647***	15,692***	0,2 ^{NS}
Variedade x Irrigação	6,024*	8,446**	161,881***	0,2 ^{NS}
Variedade x UVB	0,959 ^{NS}	8,112**	234,937***	2,8 ^{NS}
Irrigação x UVB	2,481 ^{NS}	42,810***	572,793***	0,4 ^{NS}
V X I X U	4,730*	27,259***	175,390***	4,8*

¹Clor A - Clorofila A (g.Kg⁻¹ MF); ²Clor B - Clorofila B (g.Kg⁻¹ MF); ³Carotenóides (g.Kg⁻¹ MF); ⁴TRA - Teor relativo de água (%); NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo (p<0,001) pelo teste F; ** - Significativo (p<0,01) pelo teste F; * - Significativo (p<0,05) pelo teste F.

As concentrações de clorofila A e de clorofila B nas folhas das plantas submetidas à associação da seca e radiação UVB apresentaram menores valores médios, quando comparadas com as folhas das plantas bem hidratadas com alta ou baixa UVB, em ambas as variedades de cana-de-açúcar (Figura 4A e 4B).

Entretanto, observa-se que nas plantas estressadas sob seca, embora não significativamente, os tratamentos que receberam dose elevada de UVB propiciaram menores concentrações de clorofila A e de clorofila B nas duas variedades estudadas.

Em condições de plantas bem irrigadas sob baixa UVB, a variedade RB867515 foi significativamente superior às plantas do mesmo regime hídrico sob alta UVB em relação aos conteúdos das clorilas A e B.

A RB867515 apresentou um maior conteúdo de Carotenóides comparado à variedade RB92579, na maioria dos tratamentos, com exceção das plantas nas condições bem hidratadas sob baixa UVB. Essa mesma variedade também promoveu um maior acúmulo de carotenóides quando submetida à alta UVB nas plantas com irrigação plena. Em geral, as plantas submetidas ao estresse simultâneo de déficit hídrico associada à alta ou baixa UVB apresentaram menores médias no conteúdo de Carotenóides, comparadas as plantas não submetidas à seca (Figura 4C).

O teor relativo de água (TRA) nas plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação variou de 65,2% a 92,4% aos sete dias após o início dos tratamentos (Figura 4D). O estresse hídrico proporcionou uma redução nas médias do TRA em todos os tratamentos quando comparada às plantas dos tratamentos bem irrigadas, independente do nível de UVB, ficando em aproximadamente 68% nas plantas submetidas à seca e, em torno de 85% nas plantas irrigadas.

Nesse estudo, a variedade RB92579 apresentou um maior teor relativo médio de água (13%) comparado à variedade RB867515 quando as plantas estavam submetidas às condições de 100% da capacidade de campo no substrato, sob UVB elevada. Entretanto, quando as plantas estavam submetidas à seca, não foram observadas diferenças significativas no TRA em relação às variedades, independente do nível dos raios UVB.

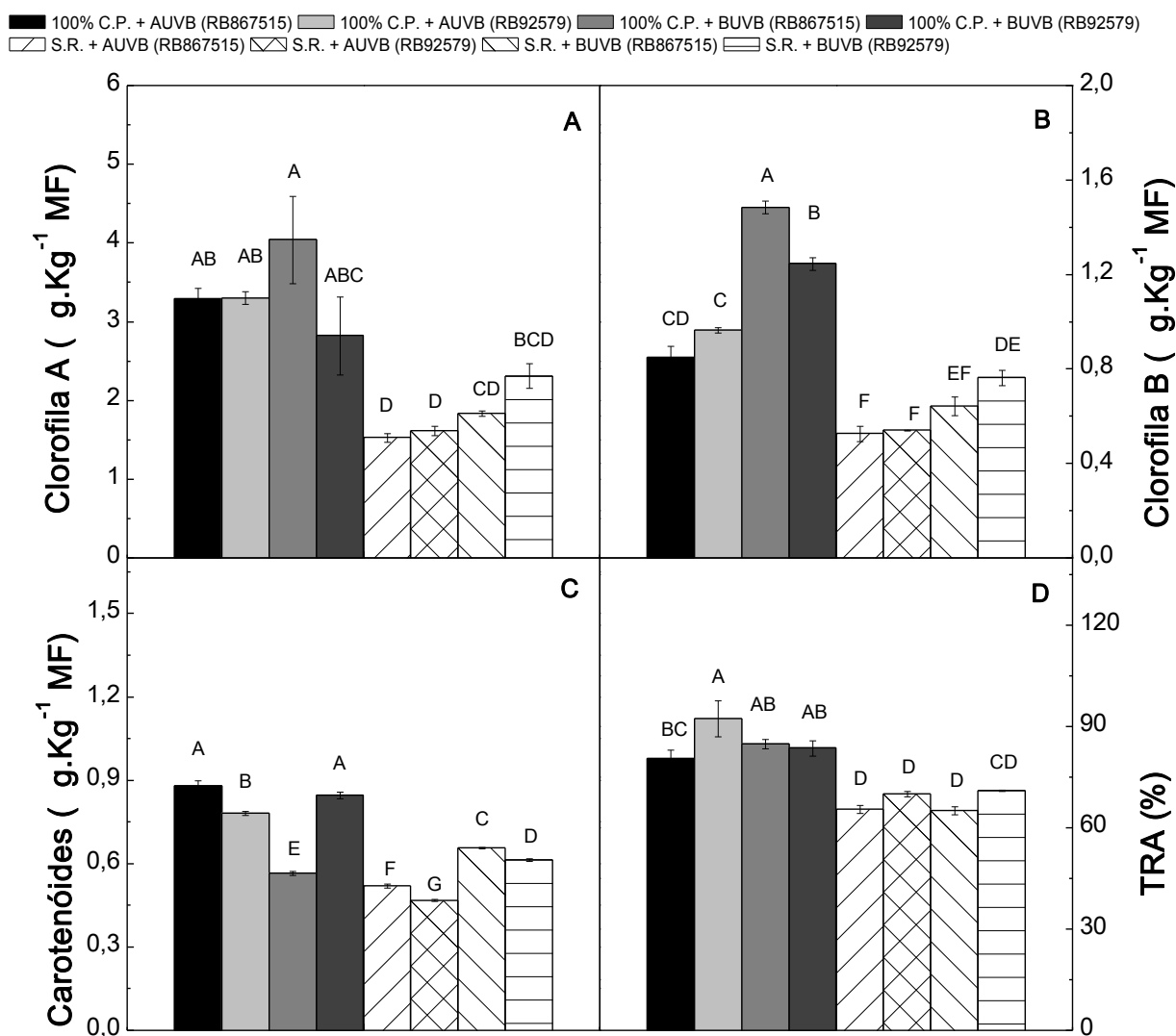


Figura 4. Teores de clorofila A (A), clorofila B (B), carotenóides (c) e Teor relativo de água (TRA%) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

6.3.2.2 Potencial hídrico foliar

De acordo com a análise de variância, nota-se que não houve efeito significativo no parâmetro potencial hídrico foliar, ao 0 DAT, promovido por nenhum dos fatores analisados e interações (Tabela 5). Entretanto, aos 7 DAT houveram efeitos significativos promovidos pelo fator Irrigação ($p < 0,001$) e pelas interações entre os fatores Variedade x UVB ($p < 0,05$) e pela interação dos três fatores Variedade x Irrigação x UVB ($p < 0,01$).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o parâmetro Potencial hídrico foliar analisado nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 0 e 7 dias após o início dos tratamentos.

Fonte de Variação	Valores de F	
	Potencial hídrico foliar	
	0 DAT	7 DAT
Variedade (V)	3,4612 ^{NS}	1,0803 ^{NS}
Irrigação (I)	0,0604 ^{NS}	109,9163***
UVB (U)	0,7457 ^{NS}	2,3971 ^{NS}
Variedade x Irrigação	0,0359 ^{NS}	0,8883 ^{NS}
Variedade x UVB	0,0998 ^{NS}	7,2284*
Irrigação x UVB	0,0604 ^{NS}	0,0281 ^{NS}
V X I X U	0,3731 ^{NS}	10,8373**

0 DAT- 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; *- Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

As plantas não diferiram estatisticamente quanto ao potencial hídrico foliar no início do experimento (0 DAT), conforme mostrado na Figura 5A.

Aos 7 DAT, as plantas das duas variedades nas condições de bem irrigadas com alta e baixa radiação UVB não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). O potencial hídrico foliar médio das plantas irrigadas, nas duas variedades de cana-de-açúcar, independente da radiação, foi de - 0,52 MPa. Já o potencial hídrico foliar médio das plantas não irrigadas, nas duas variedades de cana-de-açúcar, independente da radiação, foi de -1,64 MPa (Figura 5B).

As plantas submetidas ao regime de seca apresentaram reduções significativas no potencial hídrico, comparadas as plantas irrigadas. As duas variedades submetidas ao regime de suspensão total de rega associadas à alta radiação UVB não apresentaram diferenças significativas, porém, observa-se uma

tendência na redução do potencial hídrico na variedade RB92579 em relação à variedade RB867515. Quando as mesmas variedades foram submetidas à seca concomitante à baixa radiação UVB houve diferença significativa. A variedade RB92579 sob suspensão total de rega e baixa UVB apresentou menor potencial hídrico foliar comparado à variedade RB867515 no mesmo tratamento.

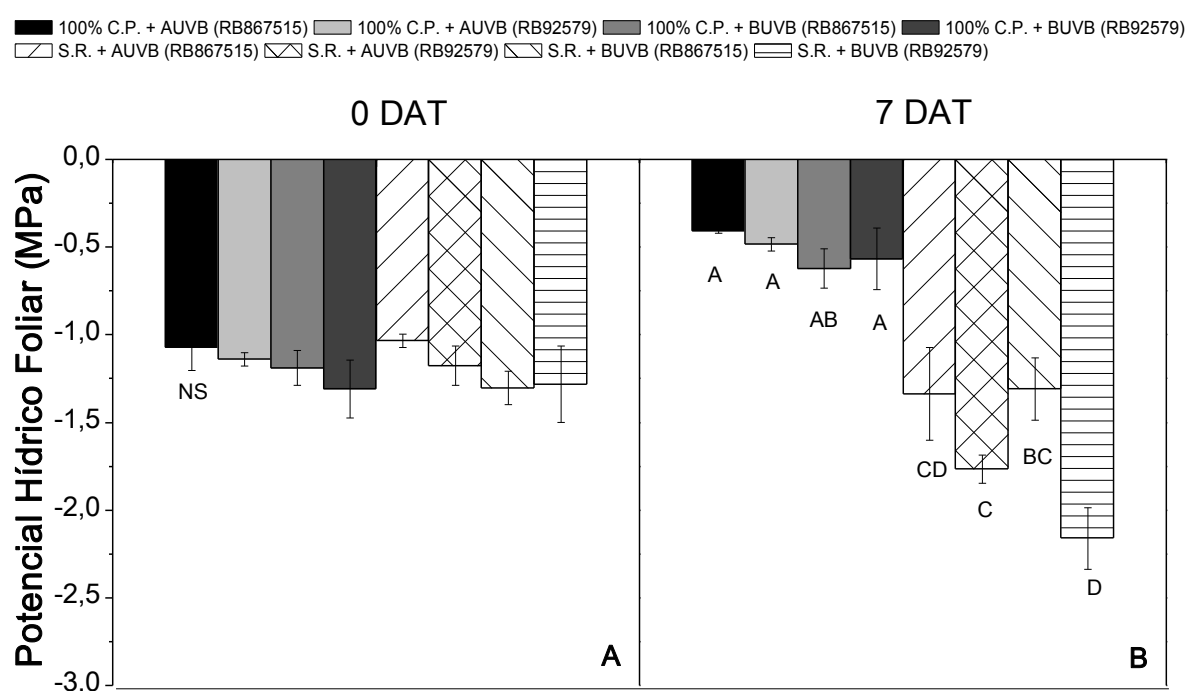


Figura 5. Potencial hídrico Foliar (MPa) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT - 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; (Letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

6.3.2.3 Trocas gasosas: condutância estomática (gs), taxa de fotossíntese (A), taxa transpiratória (E) e eficiência do uso da água (EUA)

Para os parâmetros de trocas gasosas, verifica-se que, no início do experimento (0 DAT), não houve efeitos significativos promovido por nenhum dos fatores isolados, bem como, por nenhuma das interações entre os fatores. Entretanto, na Tabela 6, verifica-se que aos sete dias após a imposição dos estresses simultâneos de seca e UVB, houve efeito significativo nas trocas gasosas promovido por todos os fatores isolados Variedade, Irrigação e UVB, assim como, em todas as interações entre os fatores Variedade x UVB, Variedade x Irrigação e Irrigação x UVB. A interação entre os três fatores (Variedade x Irrigação e UVB) também foi altamente significativa ($P < 0,001$) em todas as variáveis de trocas gasosas.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para os parâmetros Condutância estomática, Fotossíntese líquida, Taxa de transpiração e Eficiência do Uso da Água analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 0 e 7 dias após o início dos tratamentos.

Fonte de Variação	Valores de F							
	¹ gs		² A		³ E		⁴ EUA	
	0 DAT	7 DAT	0 DAT	7 DAT	0 DAT	7 DAT	0 DAT	7 DAT
Variedade (V)	0,8615 ^{NS}	21,83***	1,611 ^{NS}	10,346**	1,1496 ^{NS}	6196,25***	2,8850 ^{NS}	0,894 ^{NS}
Irrigação (I)	2,8278 ^{NS}	2081,42***	2,125 ^{NS}	1612,718***	3,5372 ^{NS}	417,56***	3,6335 ^{NS}	151,101***
UVB (U)	0,0154 ^{NS}	24,55***	0,059 ^{NS}	0,039 ^{NS}	0,0151 ^{NS}	34,57***	0,1191 ^{NS}	33,638***
Variedade x Irrigação	0,0203 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,285 ^{NS}	14,158***	0,1130 ^{NS}	0,08***	0,0932 ^{NS}	0,952 ^{NS}
Variedade x UVB	0,1616 ^{NS}	8,91**	0,292 ^{NS}	70,814***	0,3351 ^{NS}	609,88 ^{NS}	1,1275 ^{NS}	109,565***
Irrigação x UVB	1,6605 ^{NS}	40,62***	0,248 ^{NS}	6,647*	1,7814 ^{NS}	74,10***	1,7038 ^{NS}	30,868***
V X I X U	0,0868 ^{NS}	36,86***	1,822 ^{NS}	69,280	0,0100 ^{NS}	6196,25***	0,0334 ^{NS}	55,797***

¹gs - Condutância estomática (mol m⁻² s⁻¹); ²A - Fotossíntese líquida (μmol m⁻² s⁻¹); ³E - Taxa de transpiração (mmol m⁻² s⁻¹); ⁴EUA - Eficiência do Uso da Água; 0 DAT- 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo (p<0,001) pelo teste F; ** - Significativo (p<0,01) pelo teste F; * - Significativo (p<0,05) pelo teste F.

No presente estudo, verificou-se que não houve diferença significativa na condutância estomática (gs), fotossíntese (A), transpiração foliar (E) e na eficiência do uso da água (EUA) nas duas variedades avaliadas no início do experimento (0 DAT), quando as plantas estavam sob as mesmas condições hídricas (Figura 6A, 6C, 6E e 6G).

Entre as avaliações realizadas no início do experimento, quando as plantas estavam sob mesmo regime hídrico sem aplicação de estresse (0 DAT) e após sete dias, verificou-se que nas plantas hidratadas, independente da radiação UVB, as taxas de gs, A e E continuaram aumentando. Reduções acentuadas na gs, A e EUA ocorreram nas plantas submetidas ao tratamento de estresse hídrico combinado com alta e baixa UVB nos 7 DAT quando comparado às plantas no início do experimento (0 DAT).

De maneira geral, aos 7 DAT, o estresse hídrico e a radiação UVB promoveram redução nas variáveis de trocas gasosas [condutância estomática (gs), transpiração (E) e fotossíntese (A)], assim como na eficiência do uso da água (EUA) entre os tratamentos aplicados (Figura 6A, 6B, 6C e 6D).

Uma importante diminuição foi observada na condutância estomática (gs) das plantas submetidas à seca com alta e baixa UVB, nas duas variedades avaliadas aos sete dias após o início dos tratamentos (7 DAT), promovida pela interação dos três fatores (variedade x irrigação x UVB), comparadas as plantas irrigadas nesse mesmo período (Figura 6B). Em condições de plantas bem hidratadas, as duas variedades apresentaram redução na gs, quando submetidas à alta radiação UVB. No entanto, sob condições de estresse em simultâneo (seca e elevada UVB), a variedade RB867515 apresentou uma maior gs do que quando sob seca e baixa UVB.

Os efeitos da radiação UVB e da seca, de 0 a 7 DAT na fotossíntese (A) são mostrados na Figura 6E e 6F. As taxas de fotossíntese se mantiveram invariável entre as plantas aos 0 DAT. Houve efeitos significativos ($P < 0,05$) na interação dos três fatores avaliados (irrigação, UVB e variedade) nas plantas após sete dias de aplicação do estresse (7 DAT). Assim como em gs, a variedade RB867515 quando submetida à seca com alta UVB apresentou uma taxa fotossintética significativamente maior do que quando sob seca com baixa UVB, uma indicação de atenuação do efeito do estresse hídrico.

Uma mudança quase similar às obtidas em gs e A, também foi observada na transpiração foliar (E), conforme verificado nas Figuras 6E e 6F. A taxa transpiratória se mostrou uniforme para todas as plantas dos tratamentos no início do experimento (0 DAT). No entanto, após sete dias da imposição dos estresses (7 DAT), a transpiração foliar foi significativamente menor em plantas estressadas por déficit hídrico do que nas plantas irrigadas, independentemente do nível de radiação UVB e da variedade (Figura 6E e 6F). Na ausência de estresse hídrico, as plantas das duas variedades sofreram com a elevação da UVB, reduzindo significativamente sua taxa de transpiração foliar. Porém, na variedade RB867515 quando submetida ao estresse severo por seca e alta UVB, apresentou uma taxa fotossintética significativamente superior de quando sob baixa UVB. Dessa forma, assim como nas outras variáveis (gs e A), a aplicação de alta UVB em conjunto com a falta de água parece ter tido um efeito protetor na variedade RB867515.

Em plantas de cana-de-açúcar, depois de sete dias de imposição de estresse, o desempenho da eficiência do uso da água (EUA) mostraram alterações significativas (Figura 6H). Nos tratamentos submetidos ao déficit hídrico, a variedade RB867515 apresentou uma taxa superior de EUA quando em

condições de elevada UVB, e também significativamente superior à variedade RB92579, quando nas mesmas condições de tratamento.

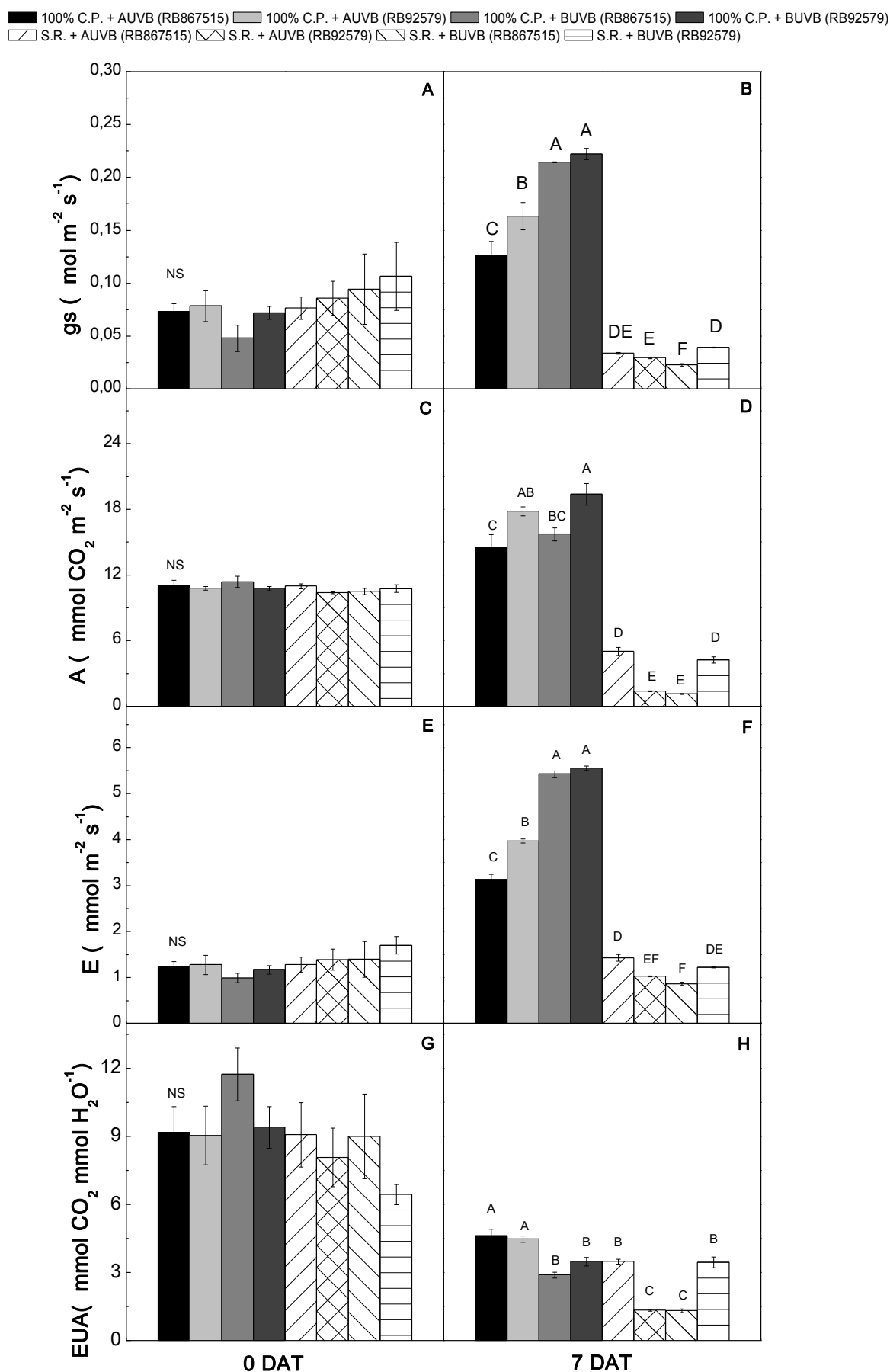


Figura 6. A) condutância estomática aos 0 DAT, B) condutância estomática aos 7 DAT, C) transpiração aos 0 DAT, D) transpiração aos 7 DAT, E) eficiência do uso da água aos 0 DAT, F) eficiência do uso da água aos 7 DAT, em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. 0 DAT - 0 dias após o início dos tratamentos; 7 DAT- 7 dias após o início dos tratamentos; NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

6.3.3.1 Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX), Superóxido Dismutase (SOD), Teor de Malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Foi observada, para as enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD, diferenças significativas promovida por todos os fatores isolados e por todas as interações entre os fatores. Para o conteúdo de MDA e Peróxido de Hidrogênio, com exceção da interação Variedade x UVB, todos os fatores isolados e todas as outras interações entre os fatores foram significativas (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para os parâmetros de CAT, APX, SOD, MDA e H₂O₂ e analisados nas folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas seca e UVB, simultaneamente, aos 7 dias após o início dos tratamentos.

Fonte de Variação	Valores de F				
	¹ CAT	² APX	³ SOD	⁴ MDA	⁵ H ₂ O ₂
Variedade (V)	54,06***	24,385***	258,731***	164,33***	6,171*
Irrigação (I)	9,04**	138,951***	162,097***	519,67***	35,778***
UVB (U)	356,51***	15,211**	185,429***	23,99***	6,394*
Variedade x Irrigação	265,30***	110,203***	255,956***	18,95***	3,814*
Variedade x UVB	46,32***	17,333***	12,851**	23,40***	1,237 ^{NS}
Irrigação x UVB	37,54***	77,854***	26,784***	40,31***	4,688*
V X I X U	68,34***	9,729**	11,782**	9,89**	6,022*

¹CAT - Atividade de Catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); ²APX - Ascorbato Peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); ³SOD - Superóxido Dismutase (U SOD mg prot.⁻¹); ⁴MDA- Teor de Malonaldeído ($\mu\text{mol/g MF}$); e ⁵H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio ($\mu\text{mol/g MF}$); Não significativo pelo teste F; *** - Significativo ($p < 0,001$) pelo teste F; ** - Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F; * - Significativo ($p < 0,05$) pelo teste F.

Em todos os tratamentos, quando as plantas foram submetidas à alta UVB houve redução na atividade de CAT. Quando em condições de suspensão total de rega, a variedade RB867515 apresentou uma maior atividade de CAT, independente do nível de UVB (Figura 7A).

Em condições de plantas bem hidratadas, as plantas que foram submetidas à alta UVB apresentaram redução na atividade de APX nas duas variedades. Entretanto, quando em condições de suspensão total de rega, a alta UVB parece não ter provocado alterações na atividade de APX em nenhuma das duas variedades, porém, a variedade RB867515 apresentou uma menor atividade de APX, comparada à variedade RB92579, independente do nível de UVB (Figura 7B).

Nas plantas bem hidratadas, submetidas à alta UVB, houve redução significativa na atividade de SOD nas duas variedades, porém sem diferenças significativas entre as variedades. Quando em condições de supressão total de rega, a variedade RB867515 apresentou menor atividade de SOD compara a variedade RB92579, entretando manteve sua atividade de SOD em condições de alta UVB. Já a variedade RB92579 apresentou níveis mais altos da atividade dessa enzima e, reduziu significativamente quando submetida a níveis altos de UVB (Figura 7C).

■ 100% C.P. + AUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + AUVB (RB92579) ■ 100% C.P. + BUVB (RB867515) ■ 100% C.P. + BUVB (RB92579)
 ▨ S.R. + AUVB (RB867515) ▨ S.R. + AUVB (RB92579) ▨ S.R. + BUVB (RB867515) ▨ S.R. + BUVB (RB92579)

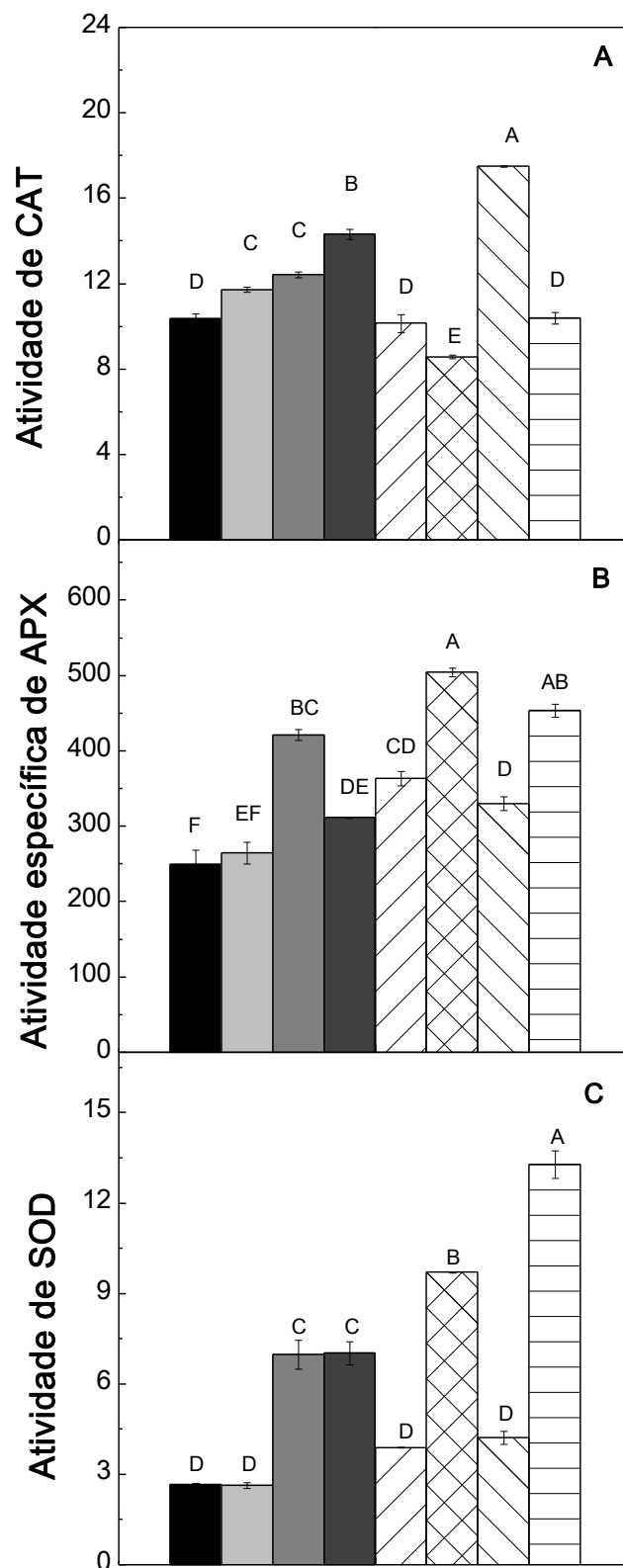


Figura 7. A - Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); B - Atividade de APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína); e C - Atividade de SOD (U SOD mg prot^{-1}) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Nas condições de plantas bem hidratadas e com baixa UVB, ambas as variedades não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) no conteúdo de lipoperóxidos quando submetida à elevada UVB. A exposição de plantas de cana-de-açúcar à alta UVB e seca desencadearam o processo lipoperoxidativo nas membranas foliares significativamente superiores às plantas irrigadas, nas duas variedades (Figura 8A).

Em ambas as variedades estudadas nesse trabalho, o estresse hídrico resultou em uma alta acumulação de H_2O_2 , com médias significativamente superiores aos demais tratamentos que não estavam submetidos à seca (Figura 8B). Quando submetidas à suspensão total da rega, com alta e baixa radiação UVB, as plantas da variedade RB867515 no presente estudo, mantiveram os níveis de acumulação de H_2O_2 , independente da intensidade de UVB, o que corrobora com os conteúdos superiores de MDA nos mesmos tratamentos.

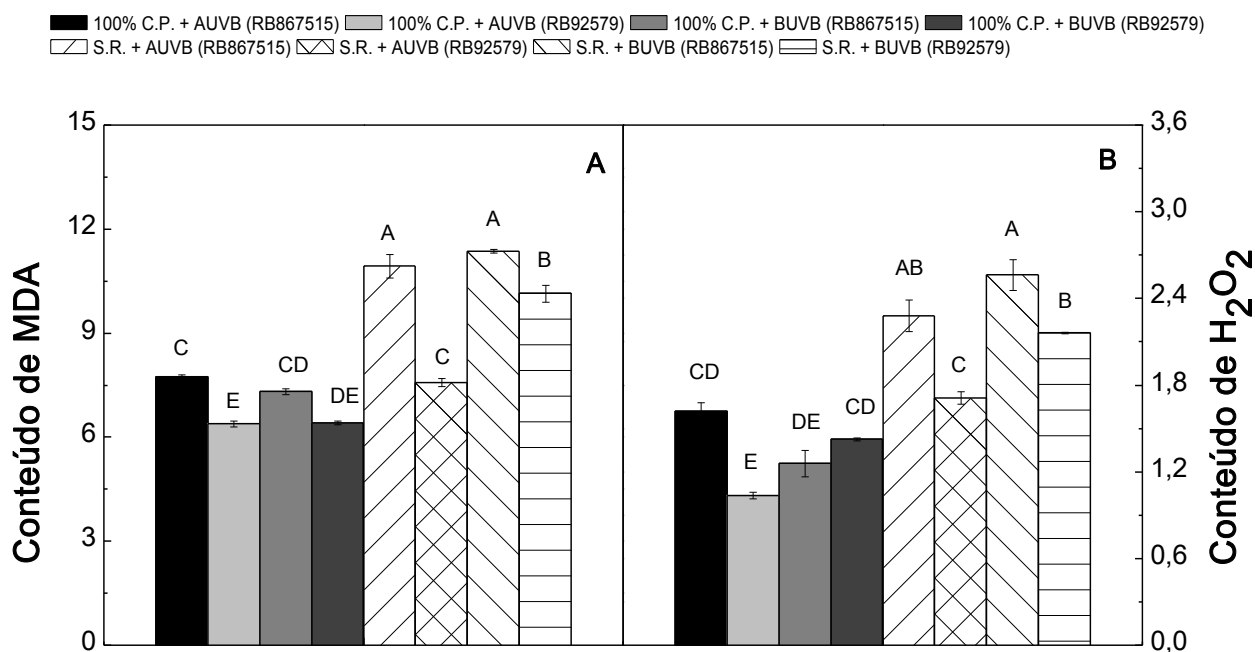


Figura 8. A - Peroxidação lipídica expressa pelo teor de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) e pelo teor de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca e UVB, simultaneamente. NS: Não significativo. (Letras iguais entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Seleção da variedade de cana-de-açúcar para análise proteômica

Diante dos resultados obtidos nesse experimento, quando as plantas estavam submetidas a um estresse considerado severo (suspensão total da irrigação) e dois níveis de radiação ultravioleta B, verificou-se que, as condições experimentais utilizadas foram suficientes e adequadas para promover a indução do estresse hídrico juntamente com UVB, levando as plantas a apresentarem efeitos significativos na interação dos três fatores para a maioria dos parâmetros analisados.

As duas variedades (RB867515 e RB92579) são consideradas tolerantes à seca e, nesse trabalho, quando submetidas ao déficit hídrico, simultaneamente à baixa ou à alta UVB, apresentaram respostas similares para algumas variáveis e, em outras apresentaram comportamentos distintos.

Destaca-se o desempenho da variedade RB867515 quando submetida ao máximo estresse: seca e elevada UVB quanto ao teor de carotenóides, potencial hídrico foliar, taxa fotossintética e na eficiência do uso da água. O sistema antioxidante, com maior acúmulo de Catalase nessa condição de estresse, seca e alta UVB, se apresentou superior nessa cultivar e, a manutenção em níveis basais do conteúdo de MDA e H_2O_2 , no máximo estresse por seca e alta UVB, sugerem um mecanismo de maior tolerância a esses estresse nessa variedade.

Dessa forma, a variedade RB867515 foi selecionada para as análises de Proteômica por ter apresentado, dentro deste estudo, respostas mais associada à tolerância ao estresse por alta UVB associado à seca.

6.3.4 Análise Proteômica

6.3.4.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas

A extração pelo Protocolo de Sultana *et al.* (2014) com modificações, apresentou-se eficiente, dada a quantidade satisfatória e rendimento de proteínas obtidas em 1 g de folha em todos os tratamentos analisados para posterior análise 2D. Foram realizadas extrações de proteínas da fração enriquecida de parede celular juntando o material vegetal de cada réplica biológica, correspondendo a uma amostra única de cada tratamento. Os valores médios da concentração de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha de cana-de-açúcar dos quatro tratamentos variaram de 1,86 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 3,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação através do método 2D-Quant-Kit (GE HealthCare) de proteínas de fração enriquecida de parede celular de folha da variedade de cana-de-açúcar RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB.

Tratamentos	Concentração de Proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimento de proteínas ($\mu\text{g}/\text{g}$)
100% C.P. + AUVB	1,86	372
100% C.P. + BUVB	3,85	770
S.R. + AUVB	3,17	634
S.R. + BUVB	2,43	486

Quando as plantas estavam bem hidratadas sob alta radiação UVB foi observada uma redução da quantidade de proteínas quando comparadas as plantas bem irrigadas com baixa radiação UVB. O contrário foi verificado quando as plantas estavam sob seca, onde foi visto que, as plantas não hidratadas sob

radiação UVB elevada apresentaram uma maior concentração de proteínas em relação às plantas sob seca com baixa radiação UVB. A Figura 9 mostra os padrões de proteínas obtidos para os quatro tratamentos após separação por 1D-SDS-PAGE e corados com Azul Brilhante de Comassie R-250 (CBB). Os quatro padrões de proteínas correspondentes as três repetições técnicas de cada tratamento mostram que as proteínas não estavam degradadas.

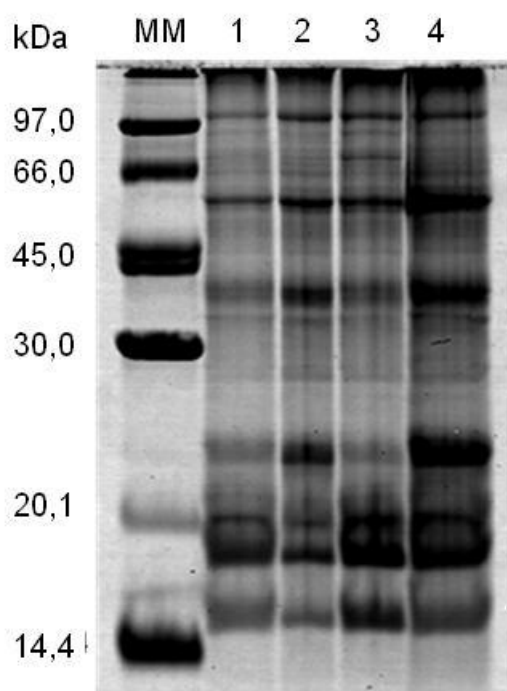


Figura 9. Análise 1D-SDS-PAGE de proteínas extraídas a partir de fração enriquecida de parede celular de folhas da variedade RB867515 de cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. Quarenta microgramas de proteínas de cada tratamento (poços 1, 2, 3 e 4) foram carregadas no gel. As proteínas foram coradas com CBB R250. Os marcadores de massa molecular estão indicados em kDa (MM). 1- S.R. + BUVB; 2- 100% C.P. + BUVB; 3- S.R. + AUVB; 4- 100% C.P. + AUVB.

6.3.4.2 Digitalização e análise do gel 2D PAGE

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) de cada réplica biológica de cada tratamento analisado para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, submetidas aos estresses de UVB e hídrico. Exemplos destes géis de cada tratamento são mostrados na Figura 10. Cada gel foi digitalizado em *scanner* de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05.

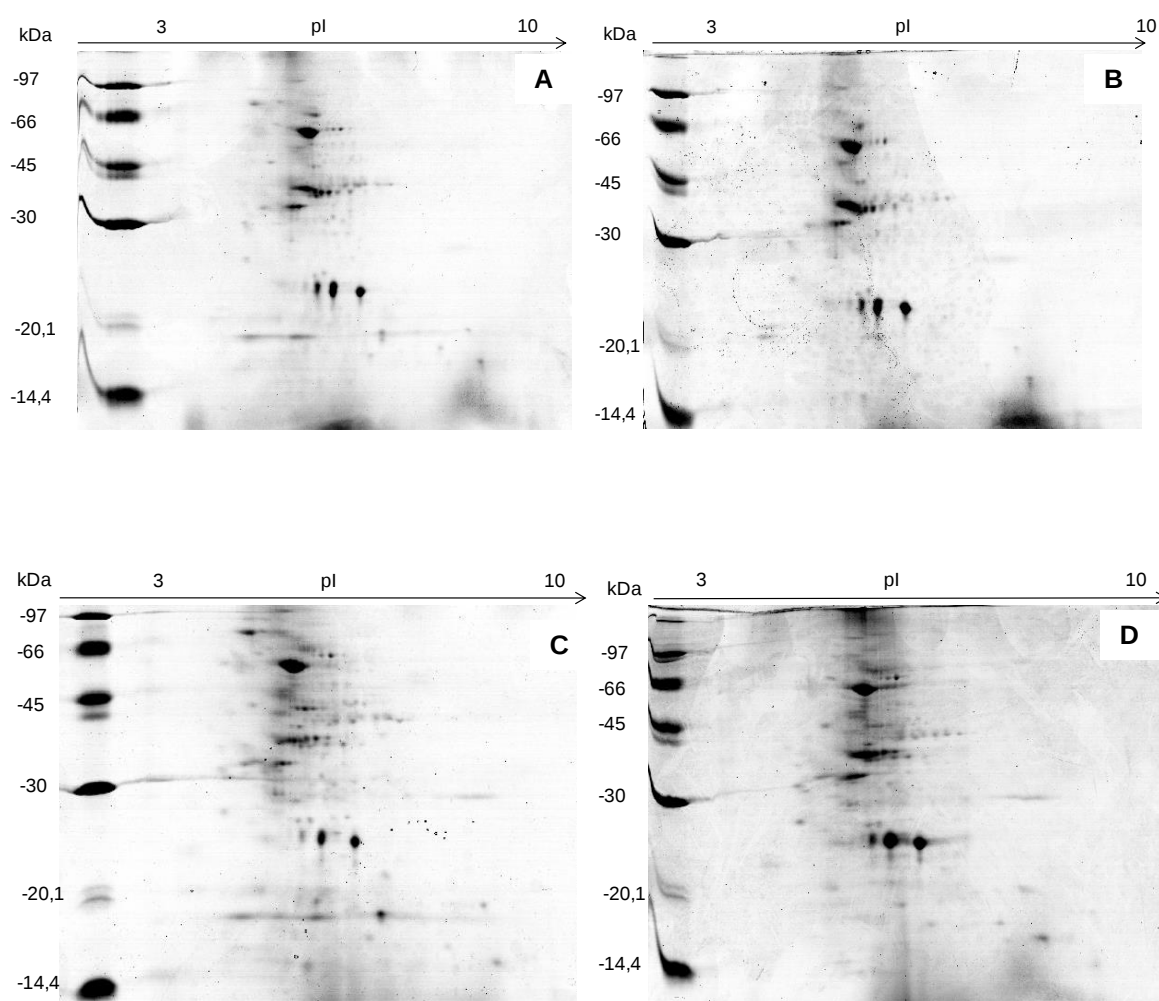


Figura 10. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas da fração enriquecida de parede celular de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada em casa-de-vegetação após 7 dias de exposição a diferentes tratamentos hídrico e de radiação UVB. As proteínas (150 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) S.R. + BUVB; B) 100% C.P. + BUVB; C) S.R. + AUVB; D) 100% C.P. + AUVB.

6.3.4.3 Análise de imagens

A descrição dos resultados da análise de imagens foi separada conforme as quatro intercomparações descritas anteriormente na Tabela 8.

✓ Efeito de UVB sob seca (S.R. + AUVB x S.R. + BUVB)

Os arquivos de imagem digitalizados foram analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. Foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,974 no tratamento S.R + AUVB e 0,962 no tratamento no tratamento S.R. + BUVB.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 211 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 40 *spots*/gel (variando de 39 a 41) no tratamento S.R + AUVB e 30 *spots*/gel (variando de 23 a 34) no tratamento S.R + BUVB (Tabela 9).

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 10), foram detectados 45 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 14 foram detectados apenas no tratamento S.R + AUVB e 5 foram detectados apenas no tratamento S.R + BUVB (Tabela 18). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) entre tratamentos.

Os demais 26 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 15 tiveram maior acúmulo no tratamento S.R + AUVB e 11 apresentaram maior acúmulo em plantas do tratamento S.R + BUVB. Dos 15 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento com suspensão da rega e alta

UVB, apenas 3 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) e, razão de variação (*ratio*) $\geq 1,5$. No tratamento S.R. + BUVB, 5 dos 11 *spots* comuns foram significativamente variáveis, e com *ratio* $> 1,5$. Deste modo, foram excisados dos géis 23 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.

Tabela 9. Total de spots seleccionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + AUVB e S.R. + BUVB.

Descrição	Tratamentos	
	S.R. + AUVB	S.R. + BUVB
<i>Spots</i> analisados	29	16
Média/réplica	40	30
Comuns	26	26
Maior acúmulo	15	11
Exclusivos ¹	ANOVA $\leq 0,05$	03
	e <i>ratio</i> $\geq 1,5$	03
		05
		05
DEPs ²	ANOVA $\leq 0,05$	13
		02
		07

¹Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

²Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e *Ratio* $\geq 1,5$ + exclusivos com ANOVA significativa).

✓ **Efeito de UVB sob irrigação plena (100% C.P. + AUVB x 100% C.P. + BUVB)**

Nesta comparação foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,88 no tratamento 100% C.P. + AUVB e 0,87 no tratamento 100% C.P. + BUVB.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 154 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 27 *spots*/gel (variando de 27 a 28) no tratamento 100% C.P. + AUVB e 24 *spots*/gel (variando de 23 a 24) no tratamento 100% C.P. + BUVB.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 10), foram detectados 29 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 5 foram detectados apenas no tratamento 100% C.P. + AUVB e 3 foram detectados apenas no tratamento 100% C.P. + BUVB (Tabela 10). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) entre tratamentos.

Os demais 21 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 8 tiveram maior acúmulo no tratamento 100% C.P. + AUVB e 13 apresentaram maior acúmulo em plantas do tratamento 100% C.P. + BUVB. Dos 8 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento irrigado e alta UVB, apenas 2 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) e, razão de variação (*ratio*) $\geq 1,5$. No tratamento 100% C.P. + BUVB, nenhum dos 13 *spots* comuns foram significativamente variáveis, e com *ratio* $> 1,5$. Deste modo, foram excisados dos géis 10 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.

Tabela 10. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento 100% C.P. + AUVB e 100% C.P. + BUVB.

Descrição	Tratamentos	
	100% C.P. + AUVB	100% C.P. + BUVB
Spots analisados	13	16
Média/réplica	27	24
Comuns	21	21
Maior acúmulo	08	13
	ANOVA $\leq 0,05$	02
	e <i>ratio</i> $\geq 1,5$	02
Exclusivos ¹	05	03
	ANOVA $\leq 0,05$	05
DEPs ²	07	03

¹Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

²Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e *Ratio* $\geq 1,5$ + exclusivos com ANOVA significativa).

✓ **Efeito do estresse hídrico sob elevada UVB (S.R. + AUVB x 100% C.P. + AUVB)**

Foi verificado que as réplicas de cada tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,97 no tratamento S.R. + AUVB e 0,89 no tratamento no tratamento 100% C.P. + AUVB.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 207 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 41 *spots*/gel (variando de 40 a 41) no tratamento S.R. + AUVB e 28 *spots*/gel (variando de 27 a 29) no tratamento 100% C.P. + AUVB (Tabela 11).

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 10), foram detectados 47 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 20 foram detectados apenas no tratamento S.R. + AUVB e 9 foram detectados apenas no tratamento 100% C.P. + AUVB (Tabela 10). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) entre tratamentos.

Os demais 18 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 9 tiveram maior acúmulo no tratamento S.R. + AUVB e 9 apresentaram maior acúmulo em plantas do tratamento 100% C.P. + AUVB. Dos 9 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento submetido a seca e alta UVB, apenas 1 apresentou variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) e, razão de variação (*ratio*) $\geq 1,5$. No tratamento 100% C.P. + AUVB, apenas 3 *spots* comuns foram significativamente variáveis, e com *ratio* $> 1,5$. Deste modo, foram excisados dos géis 26 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.

Tabela 11. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + AUVB e 100% C.P. + AUVB.

Descrição	Tratamentos		
	S.R. + AUVB	100% C.P. + AUVB	
Spots analisados	29	18	
Média/réplica	41	28	
Comuns	18	18	
Maior acúmulo	09	09	
	ANOVA $\leq 0,05$	01	03
	e <i>ratio</i> $\geq 1,5$	01	03
Exclusivos ¹	20	09	
	ANOVA $\leq 0,05$	17	05
DEPs ²	18	08	

¹Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

²Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e Ratio $\geq 1,5$ + exclusivos com ANOVA significativa).

✓ Efeito do estresse hídrico sob baixa UVB (S.R. + BUVB x 100% C.P. + BUVB)

As réplicas de cada tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,96 no tratamento S.R. + BUVB e 0,82 no tratamento 100% C.P. + BUVB.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 173 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 30 *spots*/gel (variando de 23 a 33) no tratamento S.R. + BUVB e 28 *spots*/gel (variando de 26 a 29) no tratamento 100% C.P. + BUVB.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 10), foram detectados 37 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 12 foram detectados apenas no tratamento S.R. + BUVB e 4 foram detectados apenas no tratamento 100% C.P. + BUVB (Tabela 12). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-

PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) entre tratamentos.

Os demais 21 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 6 tiveram maior acúmulo no tratamento S.R. + BUVB e 15 apresentaram maior acúmulo em plantas do tratamento 100% C.P. + BUVB. Dos 6 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento submetido a seca e baixa UVB, apenas 1 apresentou variação significativa na %vol (ANOVA $\leq 0,05$) e, razão de variação (*ratio*) $\geq 1,5$. No tratamento 100% C.P. + BUVB, apenas 1 *spot* comum foi significativamente variável, e com *ratio* $> 1,5$. Deste modo, foram excisados dos géis 7 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.

Tabela 12. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para cada tratamento S.R. + BUVB e 100% C.P. + BUVB.

Descrição	Tratamentos	
	S.R. + BUVB	100% C.P. + BUVB
<i>Spots</i> analisados	18	19
Média/réplica	30	28
Comuns	21	21
Maior acúmulo	06	15
ANOVA $\leq 0,05$	01	01
e <i>ratio</i> $\geq 1,5$	01	01
Exclusivos ¹	12	04
ANOVA $\leq 0,05$	04	01
DEPs ²	05	02

¹Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

²Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e *Ratio* $\geq 1,5$ + exclusivos com ANOVA significativa).

6.3.4.4 Espectrometria de massas (PMF, MS/MS e sequenciamento *de Novo*)

Os DEPs selecionados a partir da análise comparativa em 2D-PAGE foram analisados em espectrometria de massas para sua identificação presumível em banco de dados de acesso público. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, 35 amostras do total de 66 digeridas

com tripsina não resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot. A análise complementar por MS/MS e sequenciamento *de Novo* dessas 35 DEPs não identificadas foi realizada e proporcionou ao final, um total de 42 DEPs identificadas (aproximadamente 64%), entre as quatro comparações realizadas (Tabela 13).

Tabela 13. Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação.

	Total	%
DEPs coletados	66	100
Analisados PMF	66	100
Identificados	31	47,01
Não-identificados	35	53,03
Analisados MS/MS	35	53,03
Identificados	6	17,14
Não-identificados	29	82,86
Análisados por sequenciamento <i>de Novo</i>	29	82,86
Identificados	6	20,69
Não-identificados	23	79,31
Total de DEPs identificadas	42	64

6.3.4.5 Análises de Bioinformática

Os 66 *spots* detectados e selecionados como significativamente variáveis entre tratamentos (DEPs) foram submetidos à análise por espectrometria de massas para obtenção de espectros com perfil *m/z* específicos, visando identificação presumível e anotação em bancos de dados, para inferências funcionais. Estas proteínas diferenciais mostraram distribuição entre os tratamentos e algumas proteínas foram comuns aos diferentes tratamentos, conforme observado no diagrama de Venn (Figura 11).

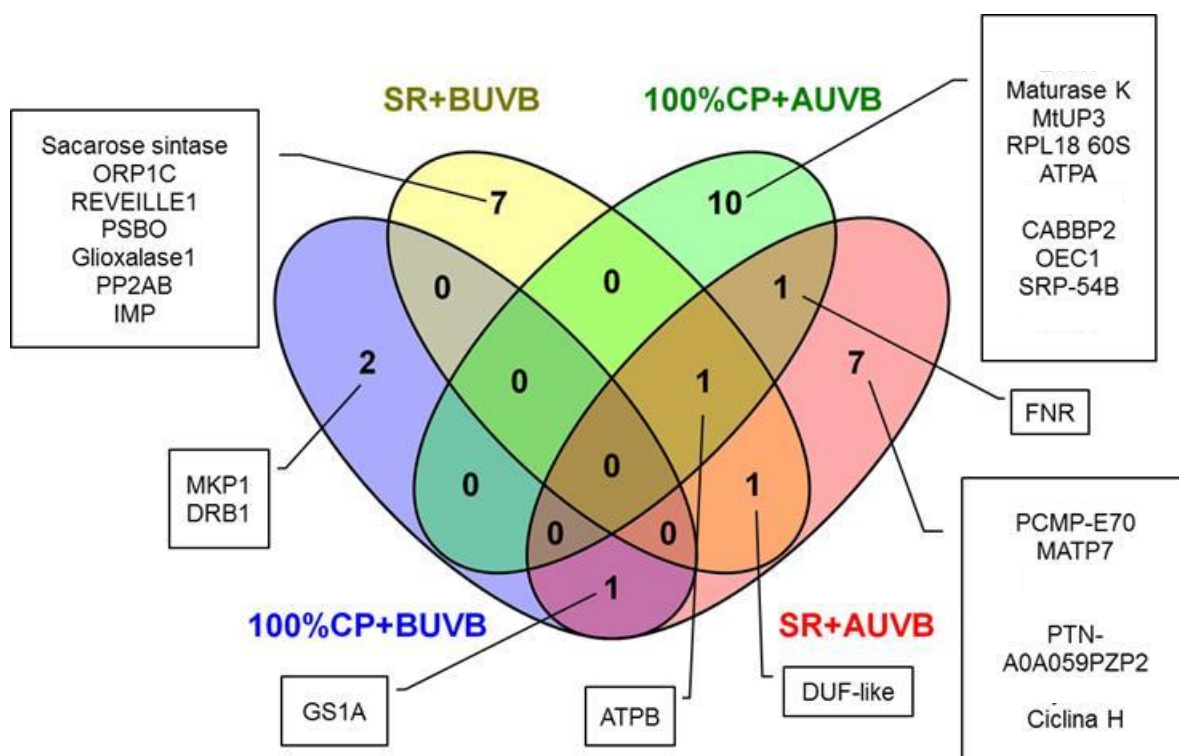


Figura 11. Diagrama de Venn representando as proteínas anotadas de DEP's em folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos quatro tratamentos: S.R. + AUVB; S.R. + BUVB; 100% C.P. + AUVB e 100% C.P. + BUVB. As anotações comuns no diagrama referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas GS1A, ATPB, FRN e DUF-like).

Identificação presumível e anotação dos DEPs

Os resultados da identificação das proteínas através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF, MS/MS e seqüenciamento *de Novo* no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ($p \leq 0,05$), são mostrados na tabelas a seguir. As proteínas foram presumivelmente discriminadas e classificadas nas tabelas conforme maior padrão de expressão (Tabela 14), por localização subcelular (Tabela 15) e por fim, pelos contrastes entre os quatros tratamentos as quais as plantas foram submetidas (Tabela 16).

Tabela 14. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar por padrão de expressão, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

Spot ID	Ratio C/Excl.	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína	Organismo	Loc. Uniprot/Targ etP	Pi		MM	
											calc	obs	calc.	obs.
21DB	Excl.	B	0,03667450			Q9C5S1	68/58	Tirosina-fosfatase quinase 1 ativada por mitógeno	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C	6,31	5,29	85.964	67.272
23DB	Excl.	B	0,00078077			Q5MD11	59/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>	C	5,51	5,23	39.183	42.684
22DB	Excl.	B	0,00001677			Q5MD11	52/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>	C	5,51	5,32	39.183	42.562
4AB	0,729	B	0,01830270			Q5N8Z0	63/58	Proteína de ligação ao RNA fita dupla 1	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	N, M	6,54	6,05	47.056	23.506
25AB	Excl.	A	0,01152520	X		A0A059Q0P1	18.5 bits(36)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	PC, P	6,05	6,05	36.176	40.413
26CA	Excl.	A	0,03560740	X		A0A059Q0B0	21.4 bits(43)	Sacarose sintase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	C, PC	7,85	5,58	95.619	66.157
19AB	2,256	A	0,01899480	X		Q8L751	71/58	Proteína 1C associada à proteína de ligação ao oxiesterol	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C, G	6,10	4,99	92.764	34.309
20CA	0,720	A	0,04464920	X		Q6ENV6	199/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,81	53.964	57.267
23CA	0,481	A	0,00987550	X		F4KGY6	58/58	Proteína REVEILLE 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C, N, MP	8,16	5,54	42.981	33.133
3CA	0,329	A	0,00180986	X		K4FC67	56/51	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	P	6,07	5,63	34.742	33.237
30AB	Excl.	A	0,01364460	X		W0F9T0	64/51	Lactoilglutaciona liase / Glioxalase I	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	C, M, PX, P	5,45	5,37	32.911	37.249
30CA	Excl.	A	0,00876390	X		Q6ENV6	68/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,79	53.964	59.270
6CA	0,499	A	0,00939596	X		Q93YV6	70/58	Subunidade reguladora B'iot da serina/treonina fosfatase 2A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MP, PC	8,90	5,83	56.422	24.399
7CA	0,428	A	0,00008299	X		A0A059Q3D9	54/51	Proteína de membrana interna	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	MP, P	6,87	6,07	48.298	24.072

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Tabela 14. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar por padrão de expressão, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor p calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

Spot ID	Ratio C/Excl.	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína	Organismo	Loc. Uniprot/Targ etP	Pi		MM	
											calc	obs	calc.	obs.
15DB	1,748	D	0,04153550		X	J9QCY8	64/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar GT28	P	7,53	5,60	40.209	37.202
18CD	Excl.	D	0,00247077		X	-	67/58	Proteína associada ao etileno	<i>Prunus persica</i>	RE, MP, PC	6,97	5,66	82.714	33.420
19CD	Excl.	D	0,00514200		X	J9QCY8	52/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar GT28	P	7,53	5,77	40.209	37.673
20CD	Excl.	D	0,00043924		X	Q52ZX4	59/58	Maturase K	<i>Banksia cuneata</i>	P	9,57	6,49	60.477	23.231
21CD	Excl.	D	0,00451112		X	Q66PX5	54/51	Proteína 3 de desacoplamento da mitocôndria	<i>Saccharum officinarum</i>	M	9,84	4,96	30.021	27.160
24DB	Excl.	D	0,00400388		X	Q2ESH5	61/51	Proteína ribossômica L18 60S	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	RE	11,33	4,65	11.651	63.930
26CD	Excl.	D	0,00012559		X	Q6ENW6	224/51	ATP sintase alpha	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,87	6,13	55.691	66.065
26DB	Excl.	D	0,00163997		X	-	72/58	Proteína associada à lignina	<i>Eucalyptus globulus</i>	MP, PC	5,10	4,13	27.534	26.914
27DB	Excl.	D	0,00014589		X	P84990	61/58	Proteína 2 de ligação à clorofila a-b	<i>Populus euphratica</i>	P	8,24	4,87	3.801	28.431
28DB	Excl.	D	0,00490971		X	P85194	60/58	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1	<i>Helianthus annuus</i>	P	5,40	4,99	34.224	38.566
3CD	0,467	D	0,02499410		X	Q6ENV6	156/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,95	53.987	58.631
7CD	0,654	D	0,01643840		X	P49966	59/58	Proteína 2 de reconhecimento de sinal	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C, PC	9,16	6,17	55.263	24.913
8DB	2,009	D	0,01765780		X	-	60/58	Proteína responsiva à hormônio	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	C, N, PC	5,32	5,20	69.020	26.140

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Tabela 14. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar por padrão de expressão, conforme maior similaridade ($p \leq 0,05$) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$. Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

Spot ID	Ratio C/Excl.	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína	Organismo	Loc. Uniprot/TargetP	Pi		MM	
											calc	obs	calc.	obs.
22CA	2,393	C	0,00386996	X	X	Q6ENV6	159/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	6,65	53.964	57.819
28CD	Excl.	C	0,00001447	X	X	O80488	65/51	Proteína com repetição pentatricopeptideo	<i>Arabidopsis thaliana</i>	M, P	7,21	8,31	53.962	15.847
34CA	Excl.	C	0,00344691	X	X	P29528	60/58	Oleosina 16.4 kDa	<i>Gossypium hirsutum</i>	MP, PC	9,30	6,13	16.398	26.702
37CA	Excl.	C	0,01416390	X	X	Q6ENV6	57/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,28	53.964	31.547
38CA	Excl.	C	0,00000004	X	X	J9QCY8	62/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid cultivar GT28</i>	P	7,53	6,34	40.209	36.458
39CA	Excl.	C	0,00014235	X	X	-	58/58	Proteína associada à fotossíntese	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	P	9,02	6,00	45.469	39.668
39CD	Excl.	C	0,00035269	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,97	53.987	40.288
42CD	Excl.	C	0,00000030	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>	C	5,51	6,04	39.183	43.584
43CD	Excl.	C	0,00003611	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>	C	5,51	5,95	39.183	43.733
44CA	Excl.	C	0,00009419	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	6,18	53.964	42.987
46CD	Excl.	C	0,00000213	X	X	-	69/51	Proteína de choque térmico	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	M, P, C, RE, PC	5,13	5,38	71.034	79.682
4CD	1,601	C	0,02713820	X	X	Q6ENV6	145/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	5,79	53.987	59.071
27CD	Excl.	C	0,00000014	X	X	A0A059Q0P1	20.6 bits(41)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	PC	6,05	6,24	36.176	32.002
29CD	Excl.	C	0,00003261	X	X	A0A059PZP2	18.9 bits(37)	Proteína hipotética SHCRBa_008_B11_R_180	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	M, N, PC	6,21	6,94	237.740	18.769
30CD	Excl.	C	0,00032429	X	X	A0A059Q079	21.8 bits(44)	Proteína associada à Parede Celular	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	PC, G	8,78	8,15	79.356	19.386
4CA	Excl.	C	0,00031980	X	X	C7IVU4	18.9 bits(37)	Proteína similar à ciclina H-1	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	N, C	5,73	6,80	29.893	19.250
22CA	2,393	C	0,00386996	X	X	Q6ENV6	159/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>	P	5,31	6,65	53.964	57.819
28CD	Excl.	C	0,00001447	X	X	O80488	65/51	Proteína com repetição pentatricopeptideo	<i>Arabidopsis thaliana</i>	M, P	7,21	8,31	53.962	15.847

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Tabela 15. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme localização subcelular encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$.

Localização Subcelular	Spot ID	C/Excl	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína
Cloroplasto	27DB	Excl.	D	0,00014589		X	P84990	61/58	Proteína 2 de ligação à clorofila a-b
	28DB	Excl.	D	0,00490971		X	P85194	60/58	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1
	22CA	2,393	C	0,00386996	X	X	Q6ENV6	159/51	ATP sintase beta
	37CA	Excl.	C	0,01416390	X	X	Q6ENV6	57/51	ATP sintase beta
	20CA	0,720	A	0,04464920			Q6ENV6	199/51	ATP sintase beta
	3CA	0,329	A	0,00180986	X		K4FC67	56/51	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1
	30CA	Excl.	A	0,00876390	X		Q6ENV6	68/51	ATP sintase beta
	15DB	1,748	D	0,04153550		X	J9QCY8	64/51	Ferredoxina-NADP redutase
	19CD	Excl.	D	0,00514200		X	J9QCY8	52/51	Ferredoxina-NADP redutase
	20CD	Excl.	D	0,00043924		X	Q52ZX4	59/58	Maturase K
	26CD	Excl.	D	0,00012559		X	Q6ENW6	224/51	ATP sintase alpha
	3CD	0,467	D	0,02499410		X	Q6ENV6	156/51	ATP sintase beta
	38CA	Excl.	C	0,00000004	X	X	J9QCY8	62/51	Ferredoxina-NADP redutase
	39CA	Excl.	C	0,00014235	X	X	Q5Z5A8	58/58	Proteína associada à Fotossíntese
	39CD	Excl.	C	0,00035269	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta
	44CA	Excl.	C	0,00009419	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta
	4CD	1,601	C	0,02713820	X	X	Q6ENV6	145/51	ATP sintase beta
	28CD	Excl.	C	0,00001447	X	X	O80488	65/51	Proteína com repetição pentatricopeptídeo

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático. *Proteínas com potencial de Patente

Tabela 15. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme localização subcelular encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$.

Localização Subcelular	Spot ID	C/Excl	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína
Citoplasma	23DB	Excl.	B	0,00078077			Q5MD11	59/51	Glutamine sintetase
	22DB	Excl.	B	0,00001677			Q5MD11	52/51	Glutamine sintetase
	42CD	Excl.	C	0,00000030	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase
	43CD	Excl.	C	0,00003611	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase
	21DB	Excl.	B	0,03667450			Q9C5S1	68/58	Tirosina-fosfatase quinase 1 ativada por mitógeno
Mitocôndria	21CD	Excl.	D	0,00451112		X	Q66PX5	54/51	Proteína 3 de desacoplamento da mitocôndria
	28CD	Excl.	C	0,00001447		X	O80488	65/51	Proteína com repetição pentatricopeptídeo
Núcleo	4CA	Excl.	C	0,00031980	X	X	C7IVU4	18.9 bits(37)	Proteína similar à ciclina H-1
	4AB	0,729	B	0,01830270			Q5N8Z0	63/58	Proteína de ligação ao RNA fita dupla 1
Retíc. Endopl.	24DB	Excl.	D	0,00400388		X	Q2ESH5	61/51	Proteína ribossômica L18 60S
Parede Celular	27CD	Excl.	C	0,00000014	X	X	A0A059Q0P1	20.6 bits(41)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40
	30CD	Excl.	C	0,00032429	X	X	-	21.8 bits(44)	Proteína associada à parede celular
	19AB	2,256	A	0,01899480	X		Q8L751	71/58	Proteína 1C associada à proteína de ligação ao oxiesterol
	+MP 26DB	Excl.	D	0,00163997		X	-	72/58	Proteína associada à lignina
	6CA	0,499	A	0,00939596	X		Q93YV6	70/58	Subunidade reguladora B'íota da serina/treonina fosfatase 2A
	34CA	Excl.	C	0,00344691	X	X	P29528	60/58	Oleosina 16.4 kDa
	18CD	Excl.	D	0,00247077		X	-	67/58	Proteína associada ao etileno
	+ MP e outras 8DB	2,009	D	0,01765780		X	-	60/58	Proteína responsiva a hormônio
	7CD	0,654	D	0,01643840		X	P49966	59/58	Proteína 2 de reconhecimento de sinal
	46CD	Excl.	C	0,00000213	X	X	-	69/51	Proteína de choque térmico
	26CA	Excl.	A	0,03560740	X		A0A059Q0B0	21.4 bits(43)	Sacarose sintase
	25AB	Excl.	A	0,01152520	X	X	A0A059Q0P1	18.5 bits(36)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40
	29CD	Excl.	C	0,00003261	X		A0A059PZP2	18.9 bits(37)	Proteína hipotética SHCRBa_008_B11_R_180
	MP / PX 23CA	0,481	A	0,00987550	X		F4KGY6	58/58	Proteína REVEILLE 1
	7CA	0,428	A	0,00008299	X		A0A059Q3D9	54/51	Proteína de membrana interna
	30AB	Excl.	A	0,01364460	X		W0F9T0	64/51	Lactoilglutaciona liase / Glioxalase I

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático. *Proteínas com potencial de Patente

Tabela 16. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme os quatros contrastes entre os tratamentos. Proteínas encontradas através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$.

Contraste	Spot ID	C/Excl.	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína	Organismo
AB	4AB	0,729	B	0,01830270			Q5N8Z0	63/58	Proteína de ligação ao RNA fita dupla 1	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
AB	25AB	Excl.	A	0,01152520	X		A0A059Q0P1	18.5 bits(36)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
AB	19AB	2,256	A	0,01899480	X		Q8L751	71/58	Proteína 1C associada à proteína de ligação ao oxiesterol	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AB	30AB	Excl.	A	0,01364460	X		W0F9T0	64/51	Lactoilglutaciona liase / Glioxalase I	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
CA	26CA	Excl.	A	0,03560740	X		A0A059Q0B0	21.4 bits(43)	Sacarose sintase	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
CA	20CA	0,720	A	0,04464920	X		Q6ENV6	199/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CA	23CA	0,481	A	0,00987550	X		F4KGY6	58/58	Proteína REVEILLE 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CA	3CA	0,329	A	0,00180986	X		K4FC67	56/51	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
CA	30CA	Excl.	A	0,00876390	X		Q6ENV6	68/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CA	6CA	0,499	A	0,00939596	X		Q93YV6	70/58	Subunidade reguladora B'íota da serina/treonina fosfatase 2A	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CA	7CA	0,428	A	0,00008299	X		A0A059Q3D9	54/51	Proteína de membrana interna	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
CA	22CA	2,393	C	0,00386996	X	X	Q6ENV6	159/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CA	34CA	Excl.	C	0,00344691	X	X	P29528	60/58	Oleosina 16.4 kDa	<i>Gossypium hirsutum</i>
CA	37CA	Excl.	C	0,01416390	X	X	Q6ENV6	57/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CA	38CA	Excl.	C	0,00000004	X	X	J9QCY8	62/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid cultivar GT28</i>
CA	39CA	Excl.	C	0,00014235	X	X	-	58/58	Proteína associada à fotossíntese	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
CA	44CA	Excl.	C	0,00009419	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CA	4CA	Excl.	C	0,00031980	X	X	C7IVU4	18.9 bits(37)	Proteína similar à ciclina H-1	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Tabela 16. Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme os quatros contrastes entre os tratamentos. Proteínas encontradas através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento com maior estresse e no tratamento com menor estresse. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se $p \leq 0,05$.

Contraste	Spot ID	C/Excl.	m	ANOVA	Seca?	UVB?	Acesso	Score	Proteína	Organismo
CD	18CD	Excl.	D	0,00247077		X	-	67/58	Proteína associada ao etileno	<i>Prunus persica</i>
CD	19CD	Excl.	D	0,00514200		X	J9QCY8	52/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid cultivar GT28</i>
CD	20CD	Excl.	D	0,00043924		X	Q52ZX4	59/58	Maturase K	<i>Banksia cuneata</i>
CD	21CD	Excl.	D	0,00451112		X	Q66PX5	54/51	Proteína 3 de desacoplamento da mitocôndria	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	26CD	Excl.	D	0,00012559		X	Q6ENW6	224/51	ATP sintase alpha	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	3CD	0,467	D	0,02499410		X	Q6ENV6	156/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	7CD	0,654	D	0,01643840		X	P49966	59/58	Proteína 2 de reconhecimento de sinal	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CD	28CD	Excl.	C	0,00001447	X	X	O80488	65/51	Proteína com repetição pentatricopeptídeo	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CD	39CD	Excl.	C	0,00035269	X	X	Q6ENV6	62/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	42CD	Excl.	C	0,00000030	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	43CD	Excl.	C	0,00003611	X	X	Q5MD11	54/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	46CD	Excl.	C	0,00000213	X	X	-	69/51	Proteína de Choque Térmico	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
CD	4CD	1,601	C	0,02713820	X	X	Q6ENV6	145/51	ATP sintase beta	<i>Saccharum officinarum</i>
CD	27CD	Excl.	C	0,00000014	X	X	A0A059Q0P1	20.6 bits(41)	Proteína hipotética SHCRBa_041_N14_R_40	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
CD	29CD	Excl.	C	0,00003261	X	X	A0A059PZP2	18.9 bits(37)	Proteína hipotética SHCRBa_008_B11_R_180	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
CD	30CD	Excl.	C	0,00032429	X	X	-	21.8 bits(44)	Proteína associada à Parede Celular	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>
DB	21DB	Excl.	B	0,03667450			Q9C5S1	68/58	Tirosina-fosfatase quinase 1 ativada por mitógeno	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DB	23DB	Excl.	B	0,00078077			Q5MD11	59/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>
DB	22DB	Excl.	B	0,00001677			Q5MD11	52/51	Glutamine sintetase	<i>Saccharum officinarum</i>
DB	15DB	1,748	D	0,04153550		X	J9QCY8	64/51	Ferredoxina-NADP redutase	<i>Saccharum hybrid cultivar GT28</i>
DB	24DB	Excl.	D	0,00400388		X	Q2ESH5	61/51	Proteína ribossômica L18 60S	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
DB	26DB	Excl.	D	0,00163997		X	-	72/58	Proteína associada à lignina	<i>Eucalyptus globulus</i>
DB	27DB	Excl.	D	0,00014589		X	P84990	61/58	Proteína 2 de ligação à clorofila a-b	<i>Populus euphratica</i>
DB	28DB	Excl.	D	0,00490971		X	P85194	60/58	Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1	<i>Helianthus annuus</i>
DB	8DB	2,009	D	0,01765780		X	-	60/58	Proteína responsiva à Hormônio	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>

A: S.R. + BUVB; B: 100% C.P. + BUVB; C: S.R. + AUVB; D: 100% C.P. + AUVB; m: mais abundante; Excl.: exclusivo; C: Citoplasma; G: Golgi; M: Mitocôndria; N: Núcleo; PC: Parede Celular; P: Cloroplasto; PX: Peroxissomo; MP: Membrana Plasmática; RE: Retículo Endoplasmático.

Localização subcelular

O resultado da localização intracelular por TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) e/ou literatura para a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é mostrado na Tabela 17. Os resultados demonstraram que uma grande quantidade de proteínas (36,3%) foi identificada encontrada na parede celular e/ou em compartimentos extracelulares envolvidos em mecanismos da parede. A grande maioria das proteínas foi identificada encontrada dentro da célula, principalmente no cloroplasto (40,9%) e citoplasma (11,4%) e, alguns em mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático.

Tabela 17. Localização subcelular do total de proteínas identificadas.

Localização subcelular ¹	Quantidade	Porcentagem
Cloroplasto	18	40,91
Parede celular e assoc. ²	16	36,36
Citoplasma	05	11,36
Mitocôndria	02	4,55
Núcleo	02	4,55
Retículo Endoplasmático	01	2,27
Total	44	100,00

¹Conforme acessos no UniProt, análise no TargetP e/ou literatura.

²Organelas e estruturas associadas à parede celular: complexo de Golgi, membrana plasmática e peroxissomo.

Clusterização por padrão de expressão (HeatMap, Fator)

Os dados obtidos de %volume de cada *spot* nas réplicas técnicas (2D) de cada tratamento foram analisados conjuntamente em clusterização por padrão de expressão conforme a plataforma *online* Babelomics 5.0 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), o que resultou na confirmação do tratamento com seca e alta UVB simultâneos como o que mais alterou o proteoma

enriquecido de parede celular de cana-de-açúcar (Figura 12), tanto considerando o total de *spots* amostrados quanto apenas as DEPs:

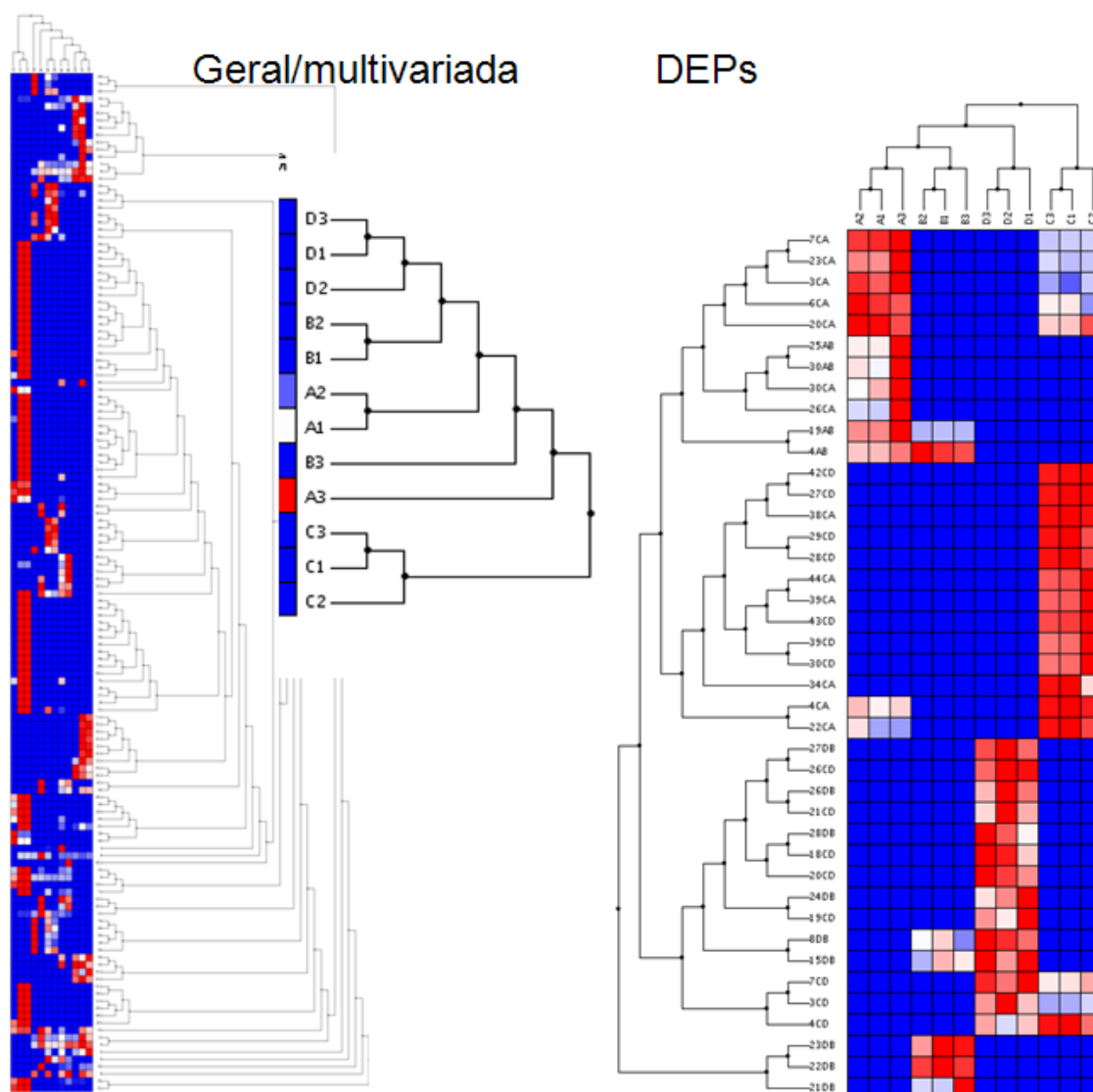


Figura 12. Clusterização por padrão de expressão dos *spots* e das proteínas anotadas.

Também a análise geral de fatores, equivalente mais simples no Image Master Platinum à análise de componente principal (PCA), indicou fortemente que o proteoma do tratamento com ambos os estresses simultâneos diferiu muito dos proteomas dos demais tratamentos, conforme os diagramas a seguir, na Figura 13.

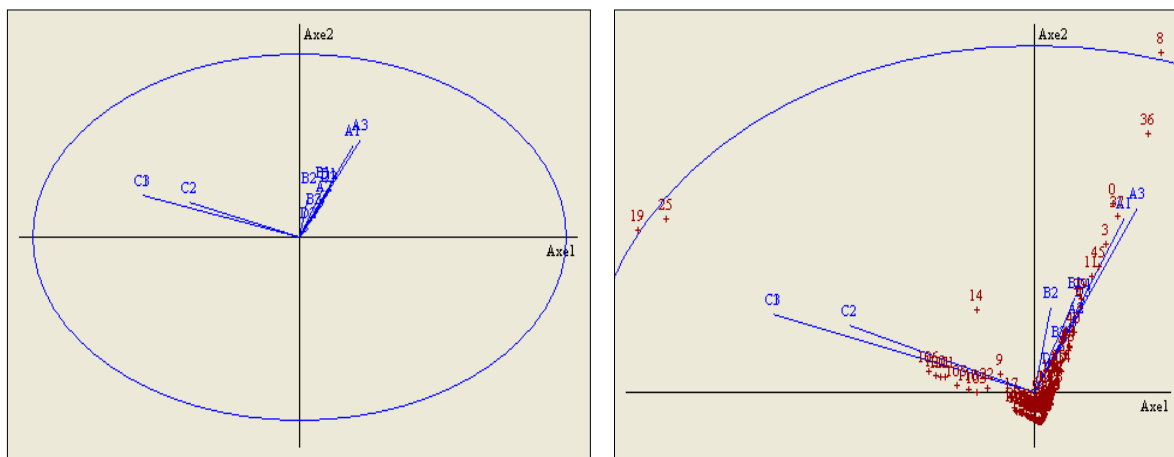


Figura 13. Diagramas da análise de componente principal (PCA).

Ontologia gênica (GO)

A distribuição e frequências obtidas de termos de GO para processo biológico referentes aos tratamentos são apresentadas nas figuras 14A, 15A e 16A, nas quais são destacados os setores correspondentes a cada categoria na classificação utilizada em *A. thaliana*, modelo para organismos vegetais. Esta distribuição foi também utilizada para comparação quantitativa (Figuras 14B, 15B, e 16B) e identificação dos processos biológicos mais variáveis nas comparações entre os tratamentos, considerando os conjuntos de DEPs.

A

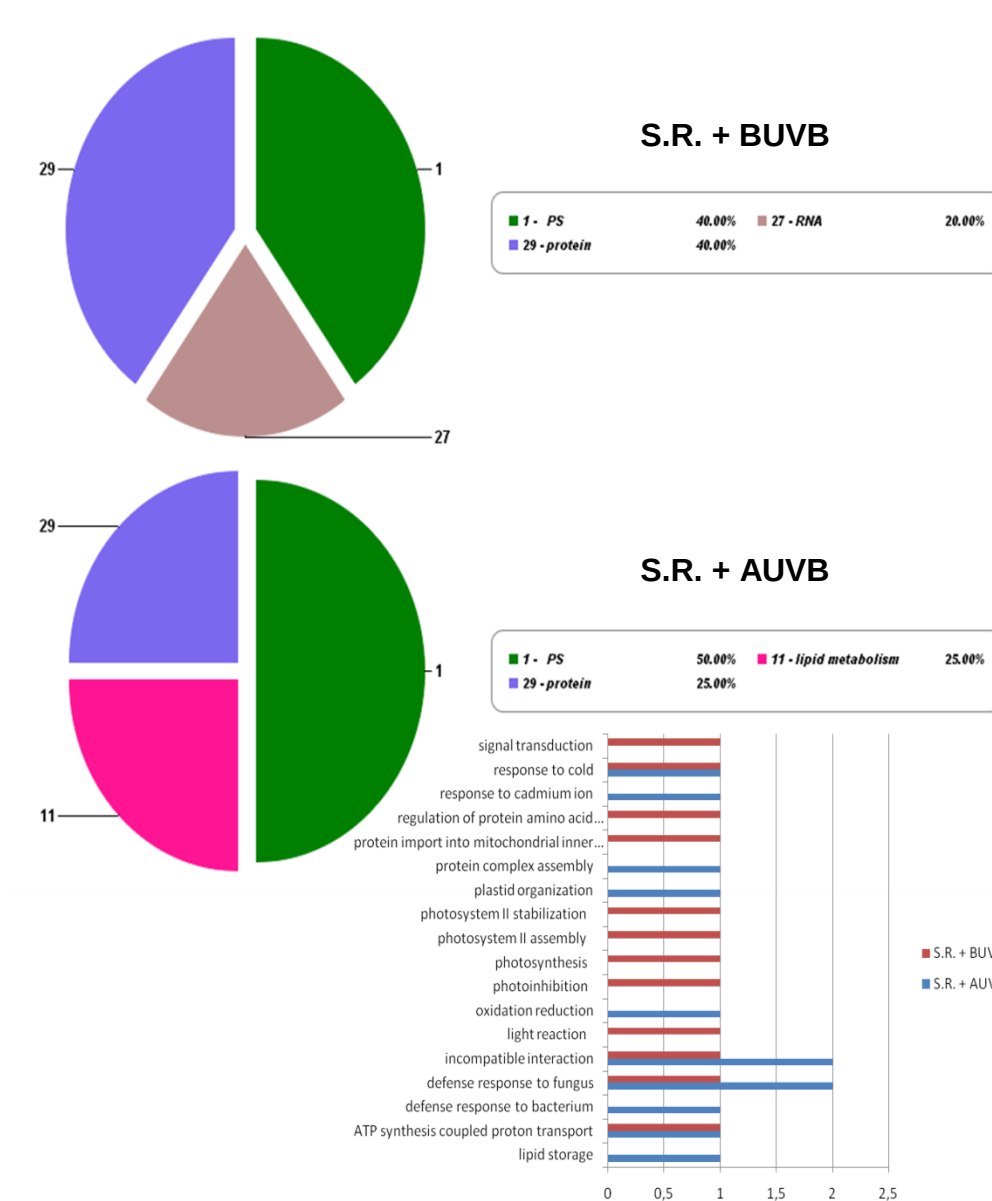


Figura 14. A - Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob seca com baixa UVB (S.R. + BUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de *DEPs*, de cada tratamento; B - Distribuição dos *DEPs* de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob seca com baixa UVB (S.R. + BUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB).

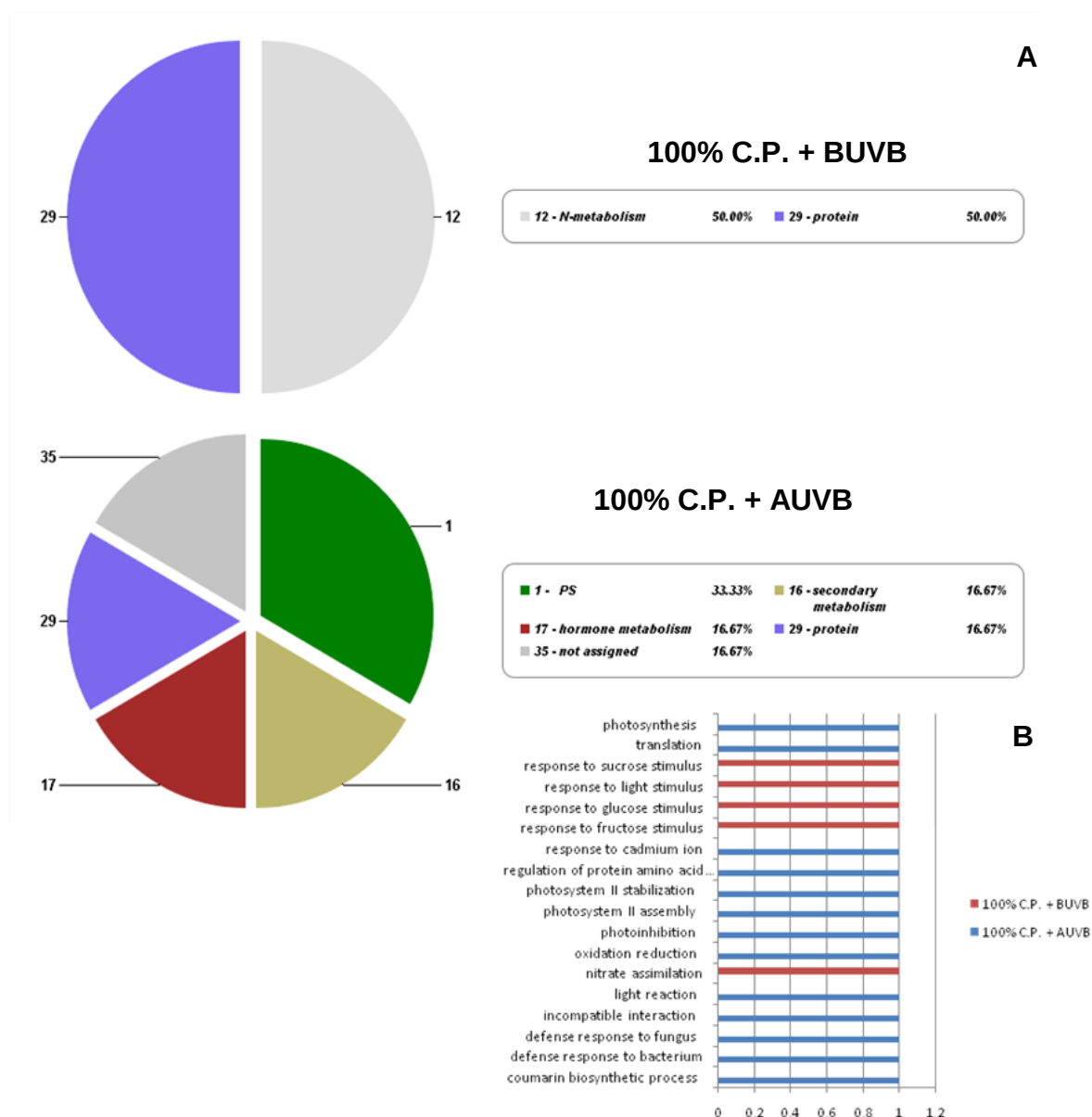


Figura 15. A - Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com baixa UVB (100%CP + BUVB) e irrigação plena com alta UVB (100% CP + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de *DEPs*, de cada tratamento; B - Distribuição dos *DEPs* de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com baixa (100%CP + BUVB) e irrigação plena com alta UVB (100% CP + AUVB).

A

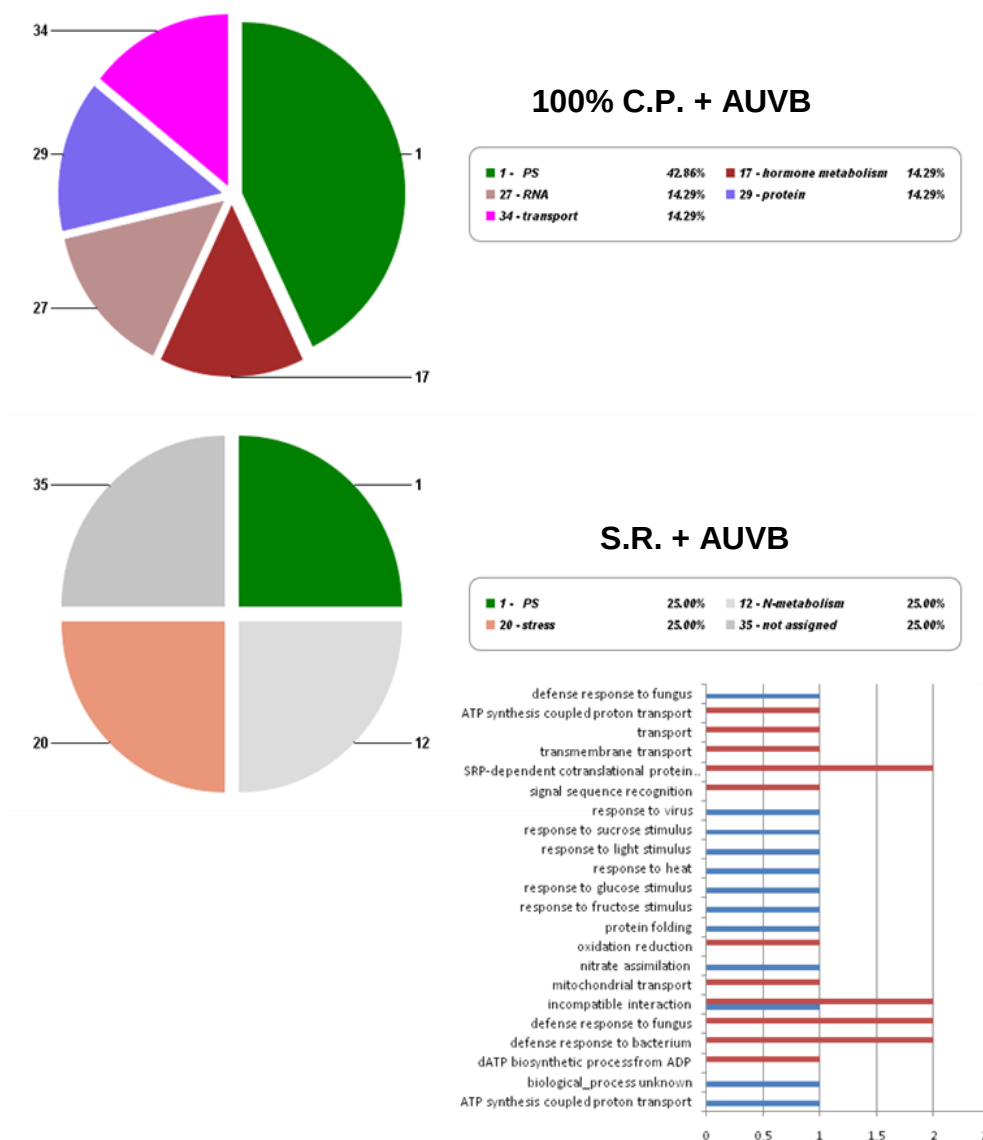


Figura 16. A - Categorização da ontologia gênica das DEPs de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com alta UVB (100%CP + AUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento; B - Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressas sob condições de irrigação plena com alta (100%CP + AUVB) e seca com alta UVB (S.R. + AUVB).

6.4 DISCUSSÃO

Umidade do Solo

Os solos contendo as plantas sob estresse hídrico, aos sete dias após a imposição dos estresses, apresentaram uma redução significativa na porcentagem de água no solo. Dessa forma, pode-se inferir que as condições experimentais utilizadas foram suficientes e adequadas para a indução do estresse hídrico, como pode ser verificado nos solos contendo as plantas sem supressão da rega e nas plantas sob seca.

Clorofila A, Clorofila B, Carotenóides e Teor relativo de água

A menor concentração das clorofilas obtidas nos tratamentos com seca e alta UVB em cana-de-açúcar corroboram com os resultados obtidos em diversas espécies, onde as concentrações de clorofila *a* e de clorofila *b* nas folhas tratadas com elevada radiação UVB apresentaram menores valores médios, quando comparadas com as folhas não tratadas ou com baixa radiação UVB, em função da ruptura dos tilacóides e a desintegração de suas membranas (Kakani *et al.*, 2003; Michaela *et al.*, 2000). Já os resultados obtidos para *Arabidopsis thaliana* contrariam esta tendência, juntamente com outros estudos que obtiveram resultados semelhantes (Caldwell *et al.*, 1982; Tevini *et al.*, 1989), nesses as folhas tratadas com alta UVB apresentaram maior concentração de clorofila *a* e de clorofila *b* do que as folhas não tratadas ou sob baixa radiação UVB (Boeger e Poulson, 2006).

Os estudos que abordam a relação entre as concentrações de clorofila com radiação UVB ainda são controversos. Alguns autores sugerem que plantas

tratadas com radiação UVB e que apresentam maiores concentrações de clorofila parecem ser mais tolerantes à radiação (Bornman e Vogelmann, 1991; Greenberg *et al.*, 1997). Outros autores sugerem que plantas de crescimento rápido, como *A. thaliana*, são mais sensíveis à radiação e tendem a ter menores concentrações de clorofila (Barnes *et al.*, 1990), enquanto que outros consideram que as maiores concentrações de clorofila, juntamente com as maiores concentrações de compostos fenólicos, podem ser indicadores da resposta da planta à radiação, mas não um indicador de sensibilidade (Smith *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos nesse estudo quanto ao aumento no conteúdo de carotenóides nas plantas irrigadas sob alta UVB concordam com os obtidos por outros autores (Mészáros *et al.*, 2001; Balouchi *et al.*, 2009), em que nas espécies estudadas por eles houve aumento no conteúdo de carotenóides após a exposição elevada à UVB juntamente com a seca.

Sob condições ambientais desfavoráveis, plantas podem acumular pigmentos, tais como, compostos fenólicos (incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas) e carotenóides, podendo assim, atenuar os efeitos da radiação UVB em processos de fotoproteção (Solovchenko e Merzlyak, 2008). Em alguns estudos, a suplementação da radiação UVB isoladamente aumentou o conteúdo de carotenóides (Middleton e Teramura, 1993; Salama *et al.*, 2011), em outros - diminuiu (Januškaitienė, 2013), ou não apresentou efeito (Mészáros *et al.*, 2005).

A redução do teor relativo de água (TRA) nas plantas submetidas ao estresse hídrico parece ter sido mais em função do estresse severo por seca, indicando que a UVB não influenciou significativamente nessa variável. Basahi *et al.* (2014), avaliando os efeitos do estresse hídrico e UVB aplicados separados e

simultaneamente em plantas de alface, verificaram que a radiação UVB sozinha não teve nenhum efeito significativo, enquanto que ambos os estresse impostos simultaneamente (seca e UVB) provocaram redução no teor de água nas plantas.

Avaliando diferentes genótipos de cana-de-açúcar Silva *et al.* (2007), evidenciaram que as menores reduções de TRA caracterizam as variedades tolerantes ao estresse. O TRA é um dos indicadores das relações hídricas da planta, que corresponde à quantidade de água no tecido num dado instante, comparando com a capacidade máxima de água que ele poderá reter (Cairo, 1995). Hsiao (1973) considera que redução menor que 10% no TRA indica que a planta passa por estresse hídrico leve, entre 10 e 20% estresse moderado e, acima de 20%, estresse severo. O presente trabalho aponta uma relação direta entre a redução do TRA e paralela com a redução de parâmetros de trocas gasosas.

Potencial hídrico foliar

No início do experimento (0 DAT), as plantas não apresentaram alterações quanto ao potencial hídrico foliar, o que era esperado, uma vez que, as duas variedades de cana-de-açúcar estavam sob mesmas condições hídricas antes de iniciar a aplicação dos tratamentos.

Todas as plantas das duas variedades apresentam reduções no potencial hídrico foliar quando submetidas à seca, independente do nível de UVB, entretanto, observa-se que a variedade RB92579 reduziu mais o seu potencial, comparada a variedade RB867515, nos dois níveis de radiação UVB. Pode-se inferir então que, de acordo com o parâmetro potencial hídrico foliar, a variedade RB867515 foi a mais tolerante aos estresses aplicados simultaneamente,

comparada à variedade RB92579. As plantas são consideradas mais tolerantes quando apresentam potencial hídrico mais próximo de zero, pois mesmo sob estresse essas plantas conseguem manter maior seu status hídrico para realizar trabalho e tolerar a seca.

O potencial hídrico foliar corresponde ao estado de energia da água nas plantas, o qual é mensurado por uma metodologia descrita por Scholander *et al.* (1965) e pode ser estimado como a tensão de água no xilema, ou a pressão necessária para que a água possa ser retirada do mesmo. Este potencial em plantas sob efeito da deficiência hídrica tende a decrescer, seja pela desidratação dos tecidos ou pela hidrólise dos compostos de reserva (Cairo, 1995), e afeta processos como a condutância estomática, a fotossíntese e a transpiração, pois estes processos dependem de um constante fluxo de entrada e saída de CO₂ e O₂ na célula. Grande parte desse fluxo é feita pela abertura dos estômatos, controlada pela turgescência tanto das células guardas quanto das células epidérmicas do mesmo.

Para avaliar o grau de deficiência hídrica de uma planta é comum se utilizar variáveis que possam ser medidas em folhas, como o conteúdo relativo de água e o potencial hídrico foliar, sendo este último o mais utilizado em estudos fisiológicos (Angelocci, 2002).

Trocas gasosas: condutância estomática (gs), taxa de fotossíntese (A), taxa transpiratória (E) e eficiência do uso da água (EUA)

Antes de iniciar a aplicação dos estresses simultâneos, as plantas apresentaram taxas similares de gs, A, E e na EUA, comportamento este

considerado normal, tendo em vista que, as plantas estavam sob mesmas condições de regime hídrico.

As duas variedades sofreram com o estresse hídrico e UVB impostos, porém a variedade RB867515 mostrou resultados significativamente superiores quando esta foi submetida à seca e elevada UVB, nas taxas de g_s , A, E e na EUA. Assim, em relação a esses parâmetros avaliados, a variedade RB867515, apresentou evidências de atenuação dos efeitos sobre essas taxas provocados pelo estresse hídrico e UVB.

Nogués *et al.* (1998), ao avaliarem plantas de ervilhas sob estresses simultâneos observaram que houve interação entre os tratamentos de radiação UVB e seca e, que UVB atrasou e reduziu a severidade do estresse da seca através de uma redução nas taxas de perda de água da planta e através de reduções na g_s na área e foliar.

Esses resultados mostram que, com a restrição da água disponível no solo, ocorreu redução em g_s nas duas variedades, indicando assim que, uma das primeiras respostas das plantas pode ser o fechamento estomático, de forma a minimizar a perda de água (Larcher, 2004; Taiz e Zeiger, 2009).

Chechin *et al.* (2008), ao avaliarem os efeitos do estresse hídrico e da radiação ultravioleta B em plantas de girassol na fotossíntese, observaram que após doze dias da imposição do estresse simultâneo, a taxa fotossintética em plantas estressadas foi 70% e 12% menor sob baixa e alta radiação UVB, respectivamente, um indicativo também de que possivelmente houve uma atenuação do efeito do estresse hídrico.

Nas duas variedades de cana-de-açúcar avaliadas nesse estudo (RB867515 e RB92579), a sensibilidade de g_s demonstrada frente às reduções

da disponibilidade hídrica no solo, comprovada nos tratamentos das plantas não irrigadas associadas à alta ou baixa UVB, indicam a regulação estomática permitindo à planta menor transpiração (E), controlando a perda de água e diminuindo os possíveis danos as plantas. A sensibilidade de g_s e E frente à redução da disponibilidade hídrica também foi encontrada por Chechin *et al.* (2008).

Uma melhor eficiência do uso da água observado na variedade RB867515 quando sob seca e alta UVB e superior à variedade RB92579 também sugere, mais uma vez que, o efeito combinado de estresse hídrico e alta UVB reduz a gravidade desses estresses na RB867515.

Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX), Superóxido Dismutase (SOD), Teor de Malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O estresse hídrico severo imposto as plantas das duas variedades parece ter provocado reduções na atividade antioxidante realizada pela CAT na maioria dos tratamentos. Entretanto, todas as plantas submetidas à alta UVB nas duas variedades apresentaram redução na atividade de CAT. Já em condições de seca e baixa UVB, a variedade RB867515 apresentou uma maior atividade dessa enzima. A alta atividade dessa enzima na RB867515 sob seca e baixa UVB foi acompanhada de níveis elevados de peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio nesse mesmo tratamento, demonstrando assim que, o aumento da atividade de CAT não foi suficiente para controlar os níveis dessa ERO e evitar danos as membranas.

A atividade de catalase tem se mostrado bastante diferente em plantas sob estresses abióticos. Alguns estudos observaram um aumento desta enzima

em plantas sob seca (Jiang e Zhang, 2002; Baisak *et al.*, 1994). Já o estresse simultâneo de seca e metal pesado, em cana-de-açúcar, ocorreu na atividade de CAT (Fornazier *et al.*, 2002).

As plantas das duas variedades quando bem hidratadas apresentaram reduções nas atividades de APX quando submetidas à alta UVB, porém, quando submetidas à restrição hídrica a atividade de APX não sofreu alterações quando sob elevada UVB. A variedade RB92579 apresentou maior atividade dessa enzima comparada à variedade RB867515, nas condições de seca com baixa ou alta UVB, que associada ao teor mais baixo de H_2O_2 e baixa peroxidação lipídica, pode evidenciar que o aumento da atividade dessa enzima pode ter contribuído para manter o potencial redox e evitar danos às células. Alguns autores sugerem que maiores flutuações nos níveis de MDA e H_2O_2 em algumas plantas, juntamente com o aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes promoveram maior estresse oxidativo, um indicativo de maior sensibilidade à seca (Sgherri *et al.*, 2000; Simova-Stoilava *et al.*, 2008).

Portanto, apesar de a variedade RB867515 ter apresentado níveis mais baixos de APX e SOD, comparado a RB92579, verifica-se que a primeira manteve inalterado seu conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica quando submetida à elevação de UVB sob seca.

Corroborando com os nossos resultados, Cechin *et al.* (2008) avaliando o efeito simultâneo de UVB e seca em plantas de girassol, mostrou que o estresse hídrico provocou graves danos às membranas, avaliada como mudanças no conteúdo de MDA. No entanto, em ambas as condições de estresse, a radiação UVB pareceu provocar alguns efeitos adaptativos para reduzir os danos experimentados nas plantas como resultado do estresse hídrico.

Os dados obtidos também demonstraram que o estresse hídrico provocou danos mais graves às membranas do que a alta radiação UVB, danos esses, avaliados como mudanças no conteúdo de MDA. As plantas quando bem hidratadas parecem sofrer menos danos, evidenciados através do menor acúmulo médio de H_2O_2 e menor peroxidação lipídica, independente do nível da radiação UVB.

O acúmulo de H_2O_2 contribuiu ativamente para a peroxidação dos lipídeos de membrana como indicado pelo aumento no nível de MDA observado tanto nos estresses isolados como no combinado. A análise de MDA é amplamente utilizada como indicadora da ocorrência de estresse oxidativo (Gratão *et al.*, 2005).

Extração de proteínas

A visualização das proteínas extraídas em gel SDS-PAGE permitiu observar bandas bem definidas e ausência de rastros, apontando para a integridade e baixa concentração de interferentes nas amostras obtidas para proteínas da fração enriquecida de parede celular. O agrupamento das amostras visou reduzir a variação biológica, aumentando a capacidade de detecção de diferenças entre os tratamentos e permitindo uma análise de maior número de amostras em menor tempo e consumo de material (Diz *et al.*, 2009).

2D-PAGE e MS

A análise dos arquivos de imagem digitalizados obtidos após eletroforese bidimensional das amostras de cada tratamento demonstrou baixa variação

experimental entre as réplicas de um mesmo tratamento, o que favoreceu a confiabilidade dos resultados.

Em geral, as quatro comparações analisadas apresentaram amostragem similar no seu proteoma, como observado no número médio de spots por gel [(S.R. + AUVB) x (S.R. + BUVB): 40 e 30 *spots*/gel, respectivamente; (100% C.P. + AUVB) x (100% C.P. + BUVB): 27 e 29 *spots*/gel, respectivamente; (S.R. + AUVB) x (100% C.P. + AUVB): 27 e 24 *spots*/gel, respectivamente; e (S.R. + BUVB) x (100% C.P. + BUVB): 30 e 28 *spots*/gel, respectivamente].

Do total de proteínas distintas detectadas (45) na comparação entre os tratamentos sob seca e nível alto e baixo de UVB (S.R. + AUVB x S.R. + BUVB), observou-se que foram obtidas quantidades diferentes de *spots* exclusivos em cada tratamento (14 e 5), e similares no número de *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes em cada tratamento (3 e 5). Na segunda comparação, quando as plantas estavam bem irrigadas sob alta ou baixa UVB (100% C.P. + AUVB x 100% C.P. + BUVB), de um total de proteínas distintas detectadas (29), observou-se que foram obtidas quantidades similares de *spots* exclusivos em cada tratamento (5 e 3), e diversos no número de *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes em cada tratamento (2 e 0). Quando se comparou os tratamentos sob alta incidência de UVB, na ausência ou presença de irrigação (S.R. + AUVB x 100% C.P. + AUVB), das 47 proteínas distintas, constatou-se números bastante divergentes quanto ao número de *spots* exclusivos em cada tratamento, 20 e 9, respectivamente. Quanto aos *spots* comuns, poucos foram significativamente variáveis, com apenas 1 *spot* no tratamento sob seca e alta UVB e 3 *spots* no tratamento irrigado sob alta UVB.

De todas as proteínas ditas como distintas nas quatro comparações realizadas, 66 *spots* 41,8% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS. Aproximadamente metade do proteoma analisado mostrou-se diferencial entre todas as comparações entre os diferentes tratamentos, com ou sem irrigação e alta ou baixa UVB, em metodologia 2D-PAGE que favorece significativamente a detecção de proteínas e peptídeos mais abundantes na amostra biológica (produtos de genes mais expressos). Este quadro indica que a condição de estresse hídrico e de UVB, comprovado pelos parâmetros fisiológicos e enzimáticos, alterou significativamente o proteoma foliar de cana-de-açúcar, sobretudo a fração enriquecida de parede celular composta por produtos de genes com maior intensidade de expressão. Este resultado é pioneiro pelo maior foco nas alterações no proteoma da parede celular em cana-de-açúcar sob estresse simultâneo de seca e UVB.

Um total de 23 DEPs não resultaram em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi 65%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos.

Análises de Bioinformática

A busca dos espectros de massa produzidos para os DEPs nos bancos de dados traducionais permitiu a identificação presumível (*in silico*) para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos aplicados.

Nas comparações entre plantas sob seca com alta ou baixa UVB (S.R. + AUVB) x (S.R. + BUVB) e, no contraste de plantas sob seca ou irrigadas com alta

UVB (S.R. + AUVB) x (100%C.P. + AUVB), observou-se uma sobreposição de anotações entre os DEPs nas diferentes comparações realizadas, o que não era esperado para um diagrama de Venn com estes tipos de dados, ou seja, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados. Seis *spots* diferentes foram anotados como a mesma proteína (Q6ENV6) nos tratamentos S.R. + AUVB (4), S.R. + BUVB (1) e 100%C.P. + AUVB (1), com *pI* e massa molecular diferentes entre e dentro dos diversos tratamentos. Da mesma forma, a proteína anotada (Q5MD11) foi identificada em 4 *spots* diferentes nos tratamentos 100%C.P. + BUVB (2) e S.R. + AUVB (2). Essas proteínas representadas por mais de um spot no mesmo tratamento podem representar diferentes produtos de dois genes intimamente relacionados ou modificações pós-traducionais de uma proteína única (Casati *et al.*, 2005).

Identificação presumível e anotação das DEPs

As análises realizadas para identificação e definição do organismo da espécie ortóloga mais provável das DEPs permitiu discriminar as proteínas diferenciais de cana-de-açúcar potencialmente envolvidas na interação entre os estresses simultâneos de seca e UVB, assim como as proteínas envolvidas em mecanismos relacionados à parede celular em resposta a esses fatores de estresse bióticos.

Do total de DEPs que foram anotadas, cerca de 65% foram anotadas especificamente como proteínas do complexo *Saccharum*, reforçando a identificação apesar de o banco de dados de cana-de-açúcar utilizado ter apenas 7.062 sequências de proteínas e o banco de dados Viridiplantae ter 515.203 sequências de proteínas. As demais DEPs de cana-de-açúcar mostraram-se

similares a proteínas de outras espécies vegetais (35%), como proteínas da família das poaceas e também anotadas como proteínas da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* e outras.

DEPs conforme localização subcelular e estresses por seca e UVB

Do total de DEPs anotados, dezesseis proteínas (37%) foram identificadas na parede celular vegetal e/ ou potencialmente envolvidas em estruturas extracelulares, sendo que, 9 dessas proteínas (56%) localizadas na parede celular foram identificadas quando sob alta incidência de radiação UVB. Das 16, cerca de 75% das proteínas (12) foram identificadas em plantas sob estresse hídrico. Entretanto, do total de DEPs localizados na parede celular sob seca (12), 7 (58%) foram encontradas nas plantas nas condições de seca e baixa UVB, simultaneamente e, 5 proteínas (42%) foram identificadas quando as plantas foram submetidas à seca e alta UVB, concomitante.

Esses resultados corroboram com alguns dos dados obtidos por Wu *et al.* (2011) que ao analisarem o proteoma de duas cultivares de arroz sob elevada radiação UVB, obtiveram uma classificação similar quanto à localização subcelular das proteínas (47,8% das proteínas foram identificadas localizadas dentro da célula, principalmente no cloroplasto, mitocôndrias e no citoplasma, e outras localizadas na parede celular e em estruturas de membrana, incluindo retículo endoplasmático, membrana de Golgi, e tonoplasto).

DEPs conforme padrão de expressão de proteínas

Quarenta e três proteínas foram reguladas positivamente ou negativamente em consequência dos tratamentos de estresses impostos às

plantas de cana-de-açúcar na variedade RB867515. Entre elas, 29 (67%) aumentaram ou diminuíram mais do que 1,5 vezes na sua abundância quando sob alta radiação UVB. A distribuição das anotações obtidas por padrão de expressão de proteínas (Tabela 21) demonstrou que mais da metade (55,2%) dessas proteínas foram expressas no tratamento S.R. + AUVB. Dessa forma, neste estudo, mais *spots* de proteínas responderam em cana-de-açúcar ao tratamento com os dois estresses aplicados simultaneamente, seca e alta UVB, indicando que mais reações positivas podem ter ocorrido no processo de detecção, prevenção e/ou reparo aos danos causados pelos estresses. Estudo em diferentes cultivares de arroz mostrou que 39 proteínas tiveram regulação positiva ou negativa em decorrência da alta UVB e 30 dessas proteínas aumentaram ou diminuíram mais do que 1,5 x na sua abundância (Wu *et al.*, 2011).

Quando sob baixa radiação UVB, o proteoma da cana-de-açúcar revelou a expressão diferencial de 14 proteínas (33%) e, dessas houve uma expressão diferencial de apenas 4 (9%) proteínas quando as plantas estavam bem hidratadas e com baixa incidência de UVB sobre as folhas e, 10 (71%) apresentaram expressão diferencial quando submetidas ao tratamento sob seca e baixa radiação ultravioleta B, simultaneamente.

Esses resultados obtidos sugerem que os fatores de estresse aplicados alteraram significativamente o proteoma da cana-de-açúcar e, sobremaneira a alta UVB e a seca promoveram alterações superiores na quantidade de proteínas induzidas e, potencialmente envolvidas em mecanismos de respostas a esses estresses abióticos.

DEPs conforme os contrastes

Em geral, nos quatro contrastes realizados entre os diferentes tratamentos, verifica-se que a maior parte das proteínas (70%) foram identificadas como exclusivas de um determinado tratamento e, apenas uma pequena quantidade (30%) das proteínas foram comuns aos dois tratamentos. Para facilitar a análise e compreensão dos resultados, a discussão a seguir sobre as proteínas identificadas que tiverem expressão diferencial são separadas de acordo com cada comparação realizada entre os tratamentos.

✓ *Efeito do Estresse Hídrico sob elevada UVB: C (S.R. + AUVB) x D (100%C.P. + AUVB)*

Do total de proteínas encontradas em todos os contrastes, 16 (37%) foram identificadas na comparação entre os tratamentos (S.R. + AUVB) x (100%C.P. + AUVB). Destas, 13 (81%) foram exclusivamente expressas em um dos dois tratamentos e uma pequena parte (19%) foi comum aos dois tratamentos. Grande parte dessas proteínas (61,5%) classificadas como exclusivas, foram identificadas apenas no tratamento das plantas submetidas ao máximo estresse de UVB e seca e, 5 (38,5%) foram exclusivas na condição de plantas irrigadas sob alta UVB. Esses resultados reforçam mais uma vez a indicação de que o estresse por alta UVB pode ocasionar mudanças perceptíveis no padrão de expressão de proteínas das folhas de cana-de-açúcar.

Das proteínas exclusivas no tratamento C, seca sob elevada UVB, aproximadamente 37,5% foram proteínas localizadas na parede celular e especialmente envolvidas em defesa celular, resposta a estresse abiótico, transdução de sinais entre outros.

Em defesa celular, a glutamina sintetase (*spot* 42CD e 43CD), desempenha um papel central na assimilação de nitrogênio nas plantas, um processo intimamente ligado à disponibilidade de água no solo. Essa enzima foi mais abundante sob elevada UVB e seca, o qual também pode impelir o metabolismo de nitrogênio propício para a síntese de flavonóides, compostos estes, protetores de UVB (Wu *et al.*, 2011), assim como pode inferir mecanismos de tolerância à seca. Srivastava *et al.* (2002), sugerem que o aumento da abundância de glutamina sintetase indica uma operação de uma via alternativa para a assimilação de nitrogênio e carbono sob estresse UVB. Bray *et al.* (2000), comenta que algumas plantas podem ativar vias não enzimáticas de proteção aos danos oxidativos, como o acúmulo da enzima glutamina sintetase, essencial para a síntese de prolina, que pode atuar como protetora de danos oxidativos gerados por outros estresses abióticos. Existem duas isoformas da glutamina sintetase nas plantas superiores. Uma corresponde à GS1 e surge no citosol das células que compõem os órgãos da planta; a outra é a GS2, que surge no estroma dos cloroplastos das células fotossintéticas e dos plastídios das células dos tecidos não fotossintéticos. Apenas a isoforma GS2 foi encontrada nesse tratamento sob alta UVB sem irrigação.

A proteína ATP sintase beta (*spots* 27CD e 39CD) e a proteína ATP sintase alpha (*spot* 26CD) foram identificadas nos dois tratamentos, sob seca com alta UVB e nas plantas irrigadas, também com elevada UVB, inferindo a possibilidade de elas estarem envolvidas nos mecanismos de respostas a UVB. Em folhas de soja expostas à excessiva luz UVB, Lee *et al.* (2014), também observaram um aumento dessa proteína ATP sintase beta quando sob alta incidência de radiação. As ATP sintases estão envolvidas com a síntese de

moléculas de ATP a partir de ADP em diferentes processos metabólicos, principalmente na fotossíntese durante a assimilação de carbono no ciclo de Calvin. Participam de processos de fosforilação oxidativa e fotofosforilação. O estresse oxidativo causa graves danos nas subunidades alfa e beta da enzima ATP sintase, com diminuição na abundância destas em mitocôndrias de plantas, o que prejudicar as reações químicas que utilizam energia de moléculas de ATP provenientes principalmente desta enzima (Zhang *et al.*, 2009; Sweetlove *et al.*, 2002). Entretanto, da mesma forma que esse trabalho encontrou aumento da abundância dessa proteína em condições de estresse por seca e alta UVB, Jiang *et al.* (2008), também observaram aumento na expressão destas subunidades beta e alfa em trigo (*Triticum aestivum* L.) mas em condições de estresse por necrose em suas folhas.

A proteína Maturase K, encontrada de forma mais abundante no tratamento D (irrigado com alta UVB), é componente dos cloroplastos e está envolvida no processo biológico do splicing de RNA e no processamento do mRNA e do tRNA. Segundo Jiang *et al.* (2008), a maturase K está envolvida na modificação de DNAs e RNAs, e funciona como chaperona em plantas, também envolvida na defesa.

Ainda dentro das proteínas mais abundantes no tratamento das plantas submetidas à alta UVB com irrigação plena, a Proteína 3 de desacoplamento da mitocôndria está envolvida diretamente com transporte de membranas e termogene em plantas (Borecký *et al.*, 2001). Essa proteína já foi relatada em resposta ao estresse por frio em tubérculo de batata (Calegario *et al.*, 2003).

A Proteína com repetição pentatricopeptídeo (*spot 38CD*) foi identificada mais abundante no tratamento sob seca e alta incidência de UVB. As proteínas de

repetição do pentatricopeptídeo (PPR) constituem uma família gênica que possui motivos de 35 aminoácidos degenerados organizados in tandem, sendo encontrados predominantemente em mitocôndrias e cloroplastos, estando relacionadas ao metabolismo do RNA. Segundo Yu *et al.* (2009), a maioria das PPRs são proteínas preditas para a mitocôndria ou cloroplasto e, muitos estudos têm demonstrado que os genes PPR influenciar numerosos processos biológicos, incluindo o splicing e a tradução de RNA, edição de RNA e estabilidade de RNA. Além disso, as proteínas PPRs estão envolvidos na embriogênese.

A Proteína associada à Parede Celular (*spot 30 CD*) foi exclusiva da condição de estresse por seca e AUVB simultaneamente. Essa proteína possui diversos papéis na diferenciação celular e no desenvolvimento, servindo como polímero hemicelulósico que confere flexibilidade à parede celular (Madson *et al.*, 2003). Xiloglucanos são os principais glicanos que entrelaçam microfibrilas de celulose (*cross-linking*) na maioria das plantas com flores. Nas monocotiledôneas tais como a cana-de-açúcar, além da celulose, essa espécie contém glucanos de ligação mista, glucuronoarabinoxilanos e quantidades menores de xiloglucanos como as principais hemiceluloses. Sua principal função nas paredes celulares é orientar as microfibrilas de celulose e consequentemente os xiloglucanos têm papel fundamental na forma e desenvolvimento celulares (Yang *et al.*, 2006). Portanto, sendo regulada positivamente, sugere um papel dessa proteína na manutenção do desenvolvimento da célula e/ou na alteração da estrutura e flexibilidade da parede celular, em resposta ao estresse hídrico e alta UVB.

Proteína de defesa a estresse abiótico (Proteína de choque térmico - *spot 46CD*) foi encontrada de forma exclusiva no tratamento por seca e alto nível de radiação UVB. Estas proteínas de choque térmico atuam como chaperonas

moleculares e, assim, evitam a agregação das proteínas desnaturadas, bem como facilitam o re-enrolamento de proteínas (Lee *et al.*, 2009). Em folhas e colmos de plantas de cana-de-açúcar já foram identificadas várias proteínas associadas a mecanismos de resposta ao estresse hídrico (Ribeiro, 2010), entre elas, várias proteínas do choque térmico. HSPs são tipicamente induzidas quando as células são expostas a vários tipos de estresses ambientais, como a seca, calor, frio, e privação de oxigênio (Kregel, 2002). HSP também foi aumentada por seca em beterraba sacarina (Hajheidari *et al.*, 2005), trigo (Demirevska *et al.*, 2008), melancia selvagem (Yoshimura *et al.*, 2000), e cana-de-açúcar (Jangpromma *et al.*, 2010). A regulação positiva de quatro proteínas relacionadas com HSP também foi encontrada em estudo com folhas de arroz submetida à alta UVB (Du *et al.*, 2011), onde os autores indicaram a possibilidade dessas proteínas da família HSP estarem ligadas à tolerância a UVB. Outros estudos também indicam que as proteínas relacionadas com a HSP desempenham um papel na resposta à radiação UVB em algumas espécies, incluindo o arroz, milho e soja (Murakami *et al.*, 2004; Casati *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008). Esses resultados obtidos nesse experimento sugerem que o aumento da expressão de uma HSP sob seca e alta UVB pode estar relacionada com uma produção maior de energia por meio de hidrólise de ATP e a degradação ou a reativação de proteínas danificadas, podendo evitar o enrolamento incorreto da proteína, resultando em uma maior ou manutenção do crescimento das plantas sob esses estresses abióticos.

A irrigação plena juntamente com a alta radiação UVB propiciou uma maior abundância de proteínas localizadas no cloroplasto (57%) e na parede

celular (29%) e potencialmente relacionadas ao metabolismo hormonal, metabolismo de energia, entre outros.

A proteína associada ao Etileno (*spot 18CD*) foi localizada apenas no tratamento irrigado sob alta UVB. Sinalização de etileno desempenha um papel importante em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta (Cao *et al.*, 2007). O gás de etileno é hormônio vegetal que regula uma série de processos fisiológicos durante o crescimento e desenvolvimento da planta. A produção de etileno no tecido vegetal em condições normais é relativamente baixa, mas é muito estimulada anteriormente a vários processos de desenvolvimento, como a germinação das sementes, amadurecimento dos frutos, queda das folhas e senescência (Abeles *et al.*, 1992). Este hormônio também é sintetizado em resposta a um diversificado leque de fatores externos, como a seca, frio, estresse salino (Morgan e Drew (1997); Predieri *et al.*, 1995) e em exposição à UVB (Mehlhorn *et al.*, 1991). Estresses ambientais e sinais hormonais estimulam a produção de etileno por expressão genética e síntese aumentada dessas enzimas, levando, posteriormente a produção desse hormônio. Além disso, dependendo da espécie de planta, o etileno pode também induzir ou estimular as enzimas da via de biossíntese dos flavonóides necessárias para a produção de fitoalexinas isoflavonóides e lignificação da parede celular (Ecker, 1995). Estudos recentes revelaram que, um certo número de vias de sinalização de UVB, desempenham um papel central nas EROS como um segundo mensageiro, com aumentos nestes radicais, precedentes de aumentos de outros compostos. O aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, em seguida, parece conduzir à síntese de alguns hormônios, como o etileno para mediação dessas EROS. Os nossos resultados sugerem que plantas sob elevada

UVB podem induzir o aumento da síntese da proteína Receptora de Etileno, mediado pelo aumento da produção de ROS, produzidos em virtude dos altos níveis de UVB.

O *spot* 19CD, identificado como uma proteína denominada Ferredoxina-NADP redutase, foi exclusiva do tratamento D, irrigado sob elevada radiação UVB. Ferredoxina-NADP⁺ oxidoredutase é uma enzima ubíqua, que foi identificada em vários organismos, incluindo bactérias heterotróficas e fototróficas, em mitocôndrias e plastos de plantas superiores e algas. Principal função fisiológica da ferredoxina no cloroplasto é o de catalisar o passo final de transporte de elétrons fotossintéticos, ou seja, a transferência de elétrons a partir da ferredoxina, reduzida pelo Fotossistema I, para NADP⁺ (Shin e Arnon, 1965). Esta reação proporciona o NADPH necessário para a assimilação de CO₂ em plantas. Ferredoxinas também participam de outros processos metabólicos de transferência de elétrons como a fixação de nitrogênio, biossíntese de isoprenóides, metabolismo de esteróides, resposta a estresse oxidativo entre outros processos (Carrillo e Ceccarelli, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2004; Medina e Gomez- Moreno, 2004); Rohrich *et al.*, 2005; Seeber *et al.*, 2005). Estudos com *A. thaliana* concluíram que a expressão de ferredoxina em cloroplastos pode conferir tolerância ao estresse térmico. Os autores desse trabalho sugerem que esta tolerância pode ser associada com o aumento de ácido ascórbico em plantas. Em ambientes adversos, as plantas produzem espécies reativas de oxigênio, que podem desencadear a morte celular quando sua acumulação ultrapassa a capacidade antioxidante dos sistemas de eliminação de ERO. Esses sistemas funcionam nos cloroplastos, principalmente através do ciclo de água-água mediada por ascorbato, em que ascorbato é fotoreduzido por ferredoxina no

sistema fotossintético (Lin *et al.*, 2015). Assim, a regulação positiva dessa ferredoxina nas plantas irrigadas sob alta UVB nesse experimento com cana-de-açúcar, sugere que ela pode estar envolvida também em mecanismos de tolerância à fotodanos causados pela UVB aumentada, possivelmente através do equilíbrio redox do pool de NADP(H) também suscetível de regular a atividade de transferência de elétrons da fotossíntese, a fim de equilibrar a produção e o consumo de equivalentes redutores, limitando assim, a produção de ERO.

✓ *Efeito da UVB sob seca: C (S.R. + AUVB) x A (S.R. + BUVB)*

A ATP sintase beta (Q6ENV6) foi identificada nos dois tratamentos, sob seca com alta UVB e sob seca com baixa UVB. Essa proteína é responsiva a estresse lumínico associado ou não à seca e à temperatura, determinante da fotoaclimação dos cloroplastos (Jiao *et al.*, 2004), e especificamente parece ser regulada pela radiação nos comprimentos de onda azul e UVA (Christopher e Mullet, 1994).

Foi encontrada também no tratamento A (seca e baixa UVB), uma proteína Reveille 1 (*spot 23CA*), envolvida em vias de sinalização ativado por auxinas, processo de biossíntese de auxinas e ritmo circadiano. Sua atividade aumenta durante a noite e diminui durante o dia, e esta sua variação é uma pista valiosa de que ele está envolvido nestes ajustes que são necessários nas transições dia-noite. É um fator de transcrição que integra o relógio biológico e as vias de auxina. Não age dentro do relógio central, mas regula os níveis de auxina livre de uma maneira específica durante o dia. Regulador negativo de tolerância ao congelamento e é regulada por luz, crescimento e expansão celular (McClung, 2014).

Também nesse mesmo tratamento A, foi identificada de forma exclusiva a Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1 (K4FC67), *spot* 3CA, uma proteína de ligação de clorofila a-b em folhas, responsiva à seca e à salinidade (Pacheco *et al.*, 2013), e reprimida em resposta a alta temperatura e à UV-B em milho (Casati *et al.*, 2011). É uma proteína que integra o complexo de fotólise da água no PS II, e também já foi descrita como mais expressa em variedade de cana-de-açúcar tolerante à seca em condição de campo sem irrigação (Ribeiro, 2010).

A proteína Subunidade reguladora B'íota da serina/treonina fosfatase 2A (*spot* 6CA), da mesma forma foi mais abundante no tratamento sob seca e baixa UVB e, esta regula a especificidade para o substrato e o direcionamento intracelular da fosfatase 2A, que pode ser inibida por mecanismos foto-regulados (Rakwal *et al.*, 2001) e controlam fosforilação reversível em diversos eventos de transdução de sinais de em plantas (Terol *et al.*, 2002), inclusive em resposta à seca e aos hormônios ABA e etileno (Chen *et al.*, 2014).

Outra mais abundante nesse tratamento, a Proteína de membrana interna (*spot* 7CA), está envolvida na inserção/ancoramento de proteínas em membranas, com a estruturação de membranas mitocondriais e com menor sensibilidade a danos causados por choque térmico, radiação ultravioleta e substâncias efetoras de PCD (Pineau *et al.*, 2013).

Entre as proteínas mais abundantes no tratamento sob seca e alta UVB (C), foi identificada a Oleosina 16.4 kDa (*spot* 34CA) que já foi descrita em outra gramínea C4, sorgo, como responsiva a desidratação, estresse osmótico e ABA, assim como outras proteínas de parede como beta-expansina (Buchanan *et al.*, 2005), e também já foi relatada em respostas à estresses abióticos, vias de

sinalização de hormônios, e vários aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta (Chapman *et al.*, 2012).

A proteína associada à Fotossíntese (*spot 39CA*), exclusiva do tratamento C (seca e alta UVB), está envolvida em processos biossintéticos de carotenóides, compostos estes que são considerados protetores por apresentarem excelente capacidade desativadora de oxigênio singleto (Di Mascio *et al.*, 1989). Estudos com plantas de soja sugeriram que ambos os carotenóides e os flavonóides podem estar envolvidos na fotoproteção de UVB nas plantas, mas apenas carotenóides estão diretamente ligados à fotoproteção da função fotossintética (Middleton e Teramura, 1993).

Ainda no mesmo tratamento C, a Proteína similar à ciclina H-1, identificada apenas nesse tratamento, está associada à replicação *in vivo* do DNA e a mitose (Schuppler *et al.*, 1998). Localizada no núcleo, regula positivamente a abertura dos estômatos induzido por luz e sua expressão foi significativamente regulada negativamente por desidratação, sugerindo que a regulação positiva dessa nas plantas pode inferir fenótipo de tolerância à seca (Zhou *et al.*, 2013).

A proteína Sacarose sintase está relacionada com a degradação de sacarose que seria o principal substrato para a respiração celular e, dessa forma, está diretamente relacionada com o crescimento e, certamente, com a produtividade em açúcar. Na cana-de-açúcar, essa proteína favorece a geração de UDPG de sacarose para a formação de material da parede celular e amido (Verma *et al.*, 2011). A Sacarose sintase (*spot 26CA*) foi encontrada exclusivamente no tratamento submetido à seca com baixa incidência de radiação ultravioleta B. A repressão dessa proteína no tratamento com exposição à elevada UVB, sugere que esse estressor pode ocasionar uma diminuição da

degradação de sacarose e, portanto, a via glicolítica pode está sendo reduzida em folha de cana-de-açúcar. A sacarose serve geralmente como um composto de transporte, transportando carbono e energia entre as células de espécies filamentosas, bem como das plantas superiores, e é um componente de síntese da parede celular. A atividade da sacarose sintase correlaciona-se com de importação de açúcar (Sung *et al.*, 1989), síntese da parede celular (Chourey *et al.*, 1991) e dissipador de força (Sun *et al.*, 1992). A via de degradação de sacarose por Sacarose sintase é favorecida particularmente sob condições limitantes de energia devido a menores custos de energia globais, refletida pela regulação da enzima sob privação de oxigênio. Sacarose sintase existe predominantemente no citoplasma, mas está por vezes associada com a membrana plasmática (Amor *et al.*, 1995). Foi também relatado que existe uma forma de sacarose sintase ligada à membrana em associação com a celulose contribuindo para a biossíntese da parede celular (Subbaiah *et al.*, 2001). Além disso, a sacarose sintase tem sido descrita como uma proteína chave reguladora, e um biomarcador potencial de resposta ao estresse abiótico das plantas e, seu acúmulo tem sido relacionado na literatura sob déficit hídrico e poderia estar relacionada com as vias bioquímicas para tolerância à seca (Jiang *et al.*, 2012). Essa proteína também já foi relatada por ocorrer muitas vezes, em resposta ao estresse salino ou estresse osmótico e é pensado que ela pode ajudar a manter a estrutura e função da membrana (Reed *et al.*, 1986; Hagemann e Marin, 1999). O acúmulo de sacarose sintase também ocorre como uma resposta a baixa temperatura (Strand *et al.*, 2003) ou seca (Yang *et al.*, 2001). Dessa forma, essa proteína pode ser essencial para mecanismo de tolerância ao estresse hídrico.

A ferredoxina-NADP redutase (*spot* 38CA) foi mais abundante no tratamento C (Seca e elevada UVB). Na comparação anterior essa proteína também tinha sido mais abundante em condições de alta UVB, mas, sob condições de plantas irrigadas, o que sugere mais uma vez que a regulação positiva dessa proteína pode está associada à resposta ao estresse por alta incidência de UVB.

✓ *Efeito da UVB sob irrigação plena: $D (100\%C.P. + AUVB) \times B (100\%C.P. + BUVB)$*

A proteína associada à Lignina (*spot* 26DB) foi mais abundante no tratamento onde as plantas estavam bem irrigadas sob elevada incidência de UVB e, esta proteína está diretamente envolvida no reforço da parede celular das plantas. É uma enzima envolvida na biossíntese de lignina e na síntese de flavonóides (Meyermans *et al.*, 2000). Essa proteína catalisa a conversão de produtos que são intermediários para a lignificação da parede celular (Grimmig *et al.*, 1997). A baixa regulação desta enzima pode indicar uma redução na lignificação da parede celular e, conseqüente diminuição no crescimento de plantas. Um aumento na regulação de uma forma dessa proteína foi relatado em arroz sob estresses abióticos de seca e estresse por sal (Salekdeh *et al.*, 2002). Investigando os efeitos de estresse salino em milho Sobhanian *et al.* (2010), encontraram uma baixa regulação de uma forma dessa proteína em plantas de soja. No nosso estudo, o aumento da expressão dessa proteína pode indicar que a biossíntese de lignina foi reforçada especificamente com a formação de ligações transversas da parede celular (*cross-linking*), podendo reduzir a elasticidade da parede em resposta ao aumento da radiação ultravioleta B e, dessa forma,

atenuar os efeitos dos danos causados pela UVB. Plantas expostas à radiação UVB são induzidas a mudanças bioquímicas, tais como a produção de compostos que absorvem UVB, e a síntese dessa proteína também associada à biossíntese de flavonóides, que é um desses compostos protetores (Mazza *et al.*, 2000). Esses compostos que absorvem a radiação UVB alteram as propriedades ópticas das folhas, atenuando a radiação através dos tecidos foliares, reduzindo assim significativamente o potencial da radiação em danificar macromoléculas de DNA e proteínas, que ocorre nas células do mesófilo (Day, 1993).

A proteína ferredoxina-NADP redutase encontrada no *spot* 15DB, a qual realiza a redução de NADP^+ à NADPH ao final do fotossistema I (PSI), teve sua expressão aumentada no tratamento D (irrigado sob alta UVB). Este quadro indica que na presença de fótons de radiação ultravioleta B, a cana-de-açúcar (variedade RB8657515) parece regular positivamente a expressão dessa proteína. Sabe-se que a Ferredoxina desempenha papel central na fisiologia da célula vegetal, distribuindo os equivalentes redutores fotossintéticos gerados durante o transporte de elétrons para as reações de consumo de elétrons do cloroplasto, e também pode funcionar na eliminação do excesso de poder redutor e evitar o descontrole sobre os estados reduzidos que ocorrem no estroma sob condições de estresse. Há, no entanto, relatos de que a interceptação de elétrons no PSI, provocado por alguns fatores de estresse abióticos, paralisa a redução da ferredoxina, assim interferindo na redução do NADP^+ a NADPH no estroma o qual seria utilizado no ciclo de Calvin para reduzir CO_2 (Taiz e Zeiger, 2009). Como consequência, também há a formação de EROs, as quais causam estresse oxidativo, o que provoca danos em membranas, proteínas e degradação da clorofila (Oliveira Jr *et al.*, 2011).

Já a maior abundância da glutamine sintetase (*spots* 22DB e 23DB) nas plantas irrigadas com baixa radiação em relação às plantas irrigadas com alta radiação não era esperada, uma vez que essa enzima já foi reportada em estudos onde indicam que o maior acúmulo desta proteína estava relacionado a mecanismos de proteção contra os danos causados por UVB (Srivastava *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2000).

Da mesma forma, também não era esperada uma maior regulação da Proteína Tirosina-fosfatase quinase 1 no tratamento B (irrigado e baixa UVB). Essa proteína é reportada na literatura envolvida na tolerância de alguns estresses ambientais, como a UVB (Kalbina e Strid, 2006). As plantas possuem mecanismos para se defenderem contra determinados tipos de estresses, através da transdução de sinal, via mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas quinases que podem ativar genes/proteínas de defesa. Alguns trabalhos mostram a participação de proteínas fosfatases em mecanismos de regulação de vias de sinalização ativadas por estresse em plantas (Luan, 2003).

Proteínas 2 de ligação a clorofila a-b foi detectada exclusivamente no tratamento D (irrigado com alta UVB). Grande parte das clorofilas das células vegetais está envolvida com a absorção da energia luminosa e transferência para os centros de reação fotoquímica. Estas clorofilas antena são não-covalentemente ligadas a proteínas específicas para formar complexos clorofila-proteína. As proteínas de ligação as clorofila a-b são codificadas por uma grande família de genes nucleares, que após serem sintetizadas pelos ribossomos são direcionadas para as membranas dos tilacóides (Green *et al.*, 1991). Um dos primeiros e mais conhecidos complexos protéicos de ligação a clorofila é o LHCII (Light-Harvesting complex of photosystem II), que representa quase metade

desses complexos de ligação e é particularmente importante pelo seu envolvimento na capacidade de adaptação das plantas a curtos e longos períodos de intensidade luminosa e temperatura (Anderson e Anderson, 1988). Bassi *et al.* (1997), observaram maior expressão em subunidades de LHCII, relacionando estas proteínas a mecanismos de tolerância a estresse. Em trabalhos com *Arabidopsis*, Johnson *et al.* (2007) observaram que elevados níveis de zeaxantina na fração oligomérica de LHCII protegeram as plantas contra danos causados por estresse oxidativo, como peroxidação de lipídeos e fotoinibição de clorofilas. LHCII pode atuar como dissipador do excesso de energia de excitação durante estresse térmico e dessa forma pode representar um mecanismo de tolerância das plantas (Tang *et al.*, 2007).

A Proteína intensificadora de reação de oxigênio 1 (*spot* 28DB), foi mais abundante em plantas irrigada sob alta UVB (tratamento D). Uma proteína que integra o complexo de fotólise da água no PS II, e diferentemente do nosso estudo, essa proteína foi descrita como mais expressa em variedade de cana-de-açúcar tolerante à seca em condição de campo sem irrigação (Ribeiro, 2010).

A proteína responsiva à Hormônio foi mais abundante nas plantas irrigadas sob elevada UVB (D) e é reportada como uma proteína que responde à estímulos de luz e também uma proteína que pode catalisar a síntese de conjugados de ácido indol-3-acético (IAA), fornecendo um mecanismo para a planta lidar com a presença de auxina em excesso. O IAA induz a expressão de proteínas de expansinas, proteínas que afrouxam a parede da célula. Esse afrouxamento da parede celular é a chave para o crescimento das plantas, mas também pode tornar as plantas mais vulneráveis à patógenos (Ding *et al.*, 2008). Em um estudo com mutantes de *A. thaliana*, Hectors *et al.* (2012), verificaram que

o fitohormônio auxina desempenha um papel na aclimação de UVB, regulando a concentração de flavonóides, padrão de glicosilação de flavonóides e controlando respostas morfogênicas induzidas por UVB.

✓ *Efeito do Estresse Hídrico sob baixa UVB: A (S.R. + BUVB) x B (100%C.P. + BUVB)*

Na comparação A x B, foram identificadas quatro proteínas: três mais abundantes no tratamento A (seca e baixa UVB) e apenas uma proteína foi identificada no tratamento B (irrigado com baixa UVB).

Uma proteína de ligação ao RNA fita dupla 1 (*spot 4AB*) foi encontrada como mais abundante no tratamento B, que está relacionada à produção de miRNA e siRNA desencadeadores de silenciamento gênico e viral, e que interage com fosfatases para regulação de silenciamento por metilação da cromatina em resposta a estresses abióticos por choque osmótico, frio e ABA (Jeong *et al.*, 2013). Essa proteína também está envolvida em resposta de defesa contra patógenos (Barber, 2009) e na resposta a auxina (Ueda *et al.*, 2008).

No tratamento ainda com baixa UVB sob seca (A), foram identificadas como DEPs uma proteína de função ainda desconhecida (*spot 25AB*), e uma proteína associada à proteína 1C de ligação ao oxisterol (*spot 19AB*). Esta atua no transporte de lipídeos esteróis, com participação em interações com vírus e é fosforilada em transdução de sinais (Skirpan *et al.*, 2006). Em plantas, os esteróis possuem função essencial na manutenção da composição e integridade da membrana plasmática, onde se acumulam, na biossíntese de esteróis e na formação das estruturas da parede celular. O total de genes distintos codificadores para proteínas de ligação ao oxisterol de plantas em genomas de

plantas conhecidos varia de seis (arroz) a doze (*Arabidopsis*), e cada forma é especificamente responsiva a fatores ambientais diferentes, inclusive intensidade luminosa e outros estresses abióticos e bióticos. A isoforma 1C é especificamente induzida por alta intensidade luminosa, ozônio e estresse osmótico (Umate, 2011).

A proteína Lactoilglutathione liase/Glioxalase I (*spot 30AB*) foi regulada exclusivamente no tratamento sem rega sob baixa UVB. Desde a sua descoberta há 100 anos, várias funções foram atribuídas as glioxalases, mas, nas plantas, o seu envolvimento na resposta ao estresse e tolerância é o papel mais amplamente aceito. As glioxalases nas plantas emergiram como família multigênica e esta expansão é considerada como sendo importante do ponto de vista da manutenção de uma maquinaria robusta de defesa nestas espécies sésseis. Glioxalases são conhecidas por serem diferencialmente regulados sob condições de estresse e sua expressão regulada positivamente em plantas confere tolerância a vários estresses abióticos (Kaur *et al.*, 2014). Enzimas dependentes de glutathione, como a glioxalase I, desempenham papel importante na luta contra o estresse através do sistema homeostático e desintoxicação de subprodutos tóxicos produzidos em grandes quantidades, sob condições de diferentes estresses abióticos (Molla *et al.*, 2014). Nossos resultados sugerem um papel importante de glioxalase I conferindo tolerância para as plantas sob condições de estresse hídrico.

Ontologia gênica (GO)

A categorização associada a processo biológico permitiu observar que a elevada radiação ultravioleta B em associação à seca parece promover em um

maior investimento na fotossíntese (54%), necessária para a produção de energia e utilizada em diversos processos celulares (Figura 25). A taxa fotossintética de muitas espécies de plantas pode ser reduzida por aumento da exposição à radiação UV-B, porém já há casos em que as plantas aumentam ou mantém inalterada a taxa de fotossíntese sob elevada UVB (Teramura e Ziska, 1996). No nosso estudo, esse resultado coincide com a maior taxa de fotossíntese obtida nas plantas sob seca e alta UVB em comparação às mesmas plantas sob baixa UVB (Figura 17D). As proteínas relacionadas ao metabolismo de RNA e de proteínas foram diminuídas com o aumento da UVB. Já as proteínas associadas ao metabolismo de lipídios foram mais frequentes nessas condições de estresse sob alta UVB, sugerindo que o estresse produzido por esse fator pode provocar uma série de alterações nas plantas, como o aumento da síntese de proteínas relacionadas aos lipídios. A síntese de lipídeos é uma função essencial a todos os organismos vivos, pois envolve a formação de depósitos ricos em energia, constituintes de membranas, pigmentos, cofatores, transportadores e hormônios, dentre outros (Singh, 2002).

Quando bem irrigadas, sob elevada UVB, as plantas apresentaram uma redução na frequência de proteínas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio e de proteínas, em comparação as plantas hidratadas sob baixa UVB. Mas nessas mesmas condições de alta UVB, observou-se um aumento na frequência de proteínas associadas ao metabolismo de hormônios, metabolismo secundário e à fotossíntese. Reforçando mais uma vez que, proteínas relacionadas à fotossíntese parecem ser mais frequentemente acumuladas nas plantas sob elevada UVB (Figura 26).

Quando ambas estavam submetidas à alta incidência de UVB, irrigadas ou sob seca, as plantas apresentaram redução na frequência de proteínas relacionadas à fotossíntese, metabolismo de RNA, transporte, metabolismo de proteínas e metabolismo de hormônios em situação de seca e elevada UVB. E nessa mesma situação de déficit hídrico e elevada UVB, verificou-se um aumento na frequência de proteínas associados ao metabolismo de nitrogênio e de estresse (Figura 27). As células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes através da expressão de uma série de proteínas (Locke *et al.*, 1990).

Com a análise quantitativa (não-estatística) apresentada nas Figuras 25, 26 e 27, foi possível verificar objetivamente, conforme nomenclatura padronizada de GO para plantas e em relação à condição de baixa UVB, que nas plantas submetidas à seca e alta intensidade de UVB houve redução das ontologias associadas ao metabolismo de reação à luz, transdução de sinais, estabilização do fotossistema II e aumento das ontologias associadas à respostas à fatores abióticos e bióticos, comparado ao tratamento das plantas sob seca e baixa UVB. Por outro lado, nas plantas irrigadas sob alta UVB foi verificado aumento na quantidade de ontologias associadas a respostas a fotossíntese, estabilização do fotossistema II, resposta à estresses bióticos, entre outros, confirmando o efeito da UVB em diversos processos biológicos favoráveis às plantas no sentido de proteção contra os fotodanos. Quando se comparou as plantas irrigadas sob alta UVB e plantas sob seca e alta UVB, verificou-se um aumento de ontologias associadas a respostas à estresses bióticos e abióticos, estímulo de luz, entre outros nas plantas sob déficit hídrico e elevada UVB.

6.5 CONCLUSÕES

O proteoma de cana-de-açúcar enriquecido para parede celular mostrou-se significativamente responsivo aos fatores de estresse abiótico, déficit hídrico severo e radiação UVB, de maneira independente e também conjunta;

As proteínas diferencialmente acumuladas identificadas podem estar associadas a mecanismos de regulação gênica, ligadas as variações fisiológicas e metabólicas detectadas, potencialmente responsáveis pela tolerância ao déficit hídrico severo e à radiação UVB;

Metabolismo antioxidante e processos de estruturação da parede celular são fundamentais na adaptação da cana-de-açúcar ao estresse simultâneo por seca e UVB;

A aplicabilidade dos marcadores moleculares funcionais identificados nesse trabalho no contexto do melhoramento genético e biotecnológico de cana-de-açúcar depende da validação experimental dos resultados obtidos.

6.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES / DS e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Os autores agradecem ao Dr. Djalma Euzébio (EECAC/UFRPE) pelo fornecimento das variedades RB867515 e RB92579. Ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo pela disponibilização dos bancos de dados.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in Plant Biology, Ed 2. Academic Press, San Diego.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24:1337-1344.
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9353-9357.
- Anderson JM, Anderson B (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem Sci* 13:351-355.
- Angelocci LR (2002) Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba: Ed. do Autor. 272 p.
- Apel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104:280-292.
- Barber GN (2009) The NFAR's (nuclear factors associated with dsRNA): evolutionarily conserved members of the dsRNA binding protein family. *RNA Biol* 6(1):35-9.
- Baisak R, Rana D, Acharya PBB, KAR M (1994) Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiology* 35:489-495.
- Balouchi HR, Sanavy SAMM, Emam Y, Dolatabadian A (2009) UV radiation, elevated CO₂ and water stress effect on growth and photosynthetic characteristics in durum wheat. *Plant Soil Environ* 55(10):443-453.
- Barnes JD, Vellissariou D, Davison AW and Holevas CD (1990) Comparative ozone sensitivity of old and modern Greek cultivars of spring wheat. *New Phytologist* 116:707-714.
- Basahi JM, Ismail IM and Hassan IA (2014) Effects of Enhanced UV-B Radiation and Drought Stress on Photosynthetic Performance of Lettuce (*Lactuca sativa* L. Romaine) Plants. *Annual Research & Review in Biology* 4(11):1739-1756.
- Bassi R, Sandona D, Croce R (1997) Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiologia Plantarum* 100:769-779.
- Boeger MRT and Poulson ME (2006) Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta bot bras* 20(2):329-338.
- Borecký J, Maia IG, Costa AD, Jezek P, Chaimovich H, de Andrade PB, Vercesi AE and Arruda P (2001) Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 14;505(2):240-4.
- Bornman JF and Vogelmann TC (1991) Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fibre optics. *J Exp Bot* 42:547-554.

- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses To Abiotic Stress. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (ed.) Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiology 158-1203.
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Klein PE and Mullet JE (2005) Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Mol Biol* 58(5):699-720.
- Cairo PAR (1995) Curso básico de relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB. 32 p.
- Caldwell, MM, Robberecht R, Nowak RS and Billings WD (1982) Differential photosynthetic inhibition by ultraviolet radiation in species from the arctic-alpine life zone. *Arctic and Alpine Res* 14:195-202.
- Calegario FF, Cosso RG, Fagian MM, Almeida FV, Jardim WF, Jezek P, Arruda P and Vercesi AE (2003) Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 35(3):211-20.
- Carrillo N and Ceccarelli EA (2003). Open questions in ferredoxin-NADP+ reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem* 270:1900-1915.
- Casati P, Zhang X, Burlingame AL, Walbot V (2005) Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Mol Cell Proteomics* 4:1673-1685.
- Casati P, Campi M, Morrow DJ, Fernandes J and Walbot V (2011) Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of maize responses to UV-B. *BMC Genomics* 12:321.
- Cassells AC, Cury RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145-157.
- Cao W-H, He X-J, Mu R-L, Zhou H-L, Chen S-Y and Zhang J-S (2007) Modulation of Ethylene Responses Affects Plant Salt-Stress Responses. *Plant Physiol* 143(2):707-719.
- Ceccarelli EA, Arakaki AK, Cortez N and Carrillo N (2004) Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim Biophys Acta* 1698:155-165.
- Chapman KD1, Dyer JM, Mullen RT (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* 53(2):215-26.
- Cechin I, Corniani N, Fumis TF and Cataneo AC (2008) Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. *Radiat Environ Biophys* 47:405-413.
- Chen J, Hu R, Zhu Y, Shen G and Zhang H (2014) *Arabidopsis* Phosphotyrosyl phosphatase activator is essential for protein phosphatase 2A holoenzyme assembly and plays important roles in hormone signaling, salt stress response, and plant development. *Plant Physiol* 166(3):1519-34.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso em: 21 outubro 2015.
- Christopher DA and Mullet JE (1994) Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated psbD-psbC transcription and light-

- induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiol* 104(4):1119-29.
- Chourey PS, Taliencio EW and Kane EJ (1991) Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor*. *M Plant Physiol* 96:485-490.
- Day TA (1993) Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* 95:542-550.
- Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Vaseva I, Grigorova B, Feller U (2008) Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Gen Appl Plant Physiol* 34:79-102.
- Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany* 58:93-99.
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives Biochemistry Biophysics* 274(2):532-538.
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X and Wang S (2008) Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 20(1):228-40.
- Diz AP, Truebano M, Skibinski DO (2009) The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 30(17):2967-75.
- Du H, Yu L, Pei K, Ma K (2011) UV Radiation-Responsive Proteins in Rice Leaves: A Proteomic Analysis. *Plant Cell Physiol* 52(2):306-316.
- Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathways in plants. *Science* 268: 667-675.
- Farinas CS (2011) A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. Cristiane Sanchez Farinas. Embrapa Instrumentação. 13p – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54).
- Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H, Jamet E (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant Methods* 2:10.
- Fornazier RF, Ferreira RR, Vitoria AP, Molina SMG, Lea PJ and Azevedo RA (2002) Effects of cadmium on antioxidant enzymes in sugar cane. *Biol.Plantarum* 45:91-97.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol* 59:309-314.
- Gonçalves ER, Ferreira VM, Silva JV, Endres L, Barbosa TP, Duarte W de G (2010) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental* 14(4):378-386.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481-494.
- Green BR, Pichersky E, Kloppstech K (1991) Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends in Biochemical Sciences* 16:181-186.
- Greenberg BM, Wilson MI, Huang XD, Duxbury CL, Garhardt KE and Gensemer RW (1997) The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS [eds.], *Plants for Environmental Studies* 1-36. Boca Raton, CRC Press, Florida.

- Grimmig B, Matern U (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive *cis*-acting element. *Plant Mol Biol* 33:323-341.
- Hagemann M and Marin K (1999) Salt-induced sucrose accumulation is mediated by sucrose phosphate synthase in cyanobacteria. *J Plant Physiol* 155:424-430.
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455.
- Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian SY, Ober ES, et al. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5:950-960.
- Health RL and Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198.
- Hectors K, van Oevelen S, Guisez Y, Prinsen E and Jansen MA (2012) The phytohormone auxin is a component of the regulatory system that controls UV-mediated accumulation of flavonoids and UV-induced morphogenesis. *Physiol Plant* 145(4):594-603.
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570.
- Inman-bamber NG and Smith DM (2005) Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research* 92:185-202.
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Lomthaisong K, Daduang S, Jaisil P, Thammasirirak S (2010) A Proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *Am J Biochem Biotech* 6:89-102.
- Januškaitienė, I (2013) Low UVB radiation and substrate acidity impact on photosynthetic parameters of *Brassica napus*. *Biologija* 59(2):219-230.
- Jeong IS, Aksoy E, Fukudome A, Akhter S, Hiraguri A, Fukuhara T, Bahk JD, Koiwa H (2013) Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 functions in miRNA accumulation and DNA methylation. *PLoS One*. 2013 Sep 18;8(9):e74739.
- Jiang M, Zhang J (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 2401-2410.
- Jiang O, Chen H, Pan X, Pan Q, Shi Y, Li X, Zhang G, Wang Y, Xie S, Shen S (2008) Proteomic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrid necrosis. *Plant Science* 175:394-401.
- Jiang SS, Liang XN, Li X, Wang SL, Lv DW, Ma CY, Li XH, Ma WJ, Yan YM (2012) Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Mol Sci* 13(12):16065-83.
- Jiao S, Hilaire E, Guikema JA. (2004) Identification and differential accumulation of two isoforms of the CF1-beta subunit under high light stress in *Brassica rapa*. *Plant Physiol Biochem* 42(11):883-90.
- Johnson MP, Havaux M, Triantaphyllides C, Ksas B, Pascal AA, Robert B, Davison PA, Ruban AV, Horton P (2007) Elevated Zeaxanthin Bound to Oligomeric LHCII Enhances the Resistance of *Arabidopsis* to Photooxidative

- Stress by a Lipid-protective, Antioxidant Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 282:22605-22618.
- Jordan BR (1996) The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Advances in Botanical Research* 22:97-162.
- Kalbina I and Strid A (2006) The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 29(9):1783-93.
- Kakani VG, Reddy K, Zhao R, Salaja K (2003) Filed responses to UV-B radiation: a review. *Agr Forest Met* 120:191-218.
- Kaur C, Ghosh A, Pareek A, Sopory SK, Singla-Pareek SL (2014) Glyoxalases and stress tolerance in plants. *Biochem Soc Trans* 42(2):485-90.
- Kerr JB, McElroy CT (1993) Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262:1032-1034.
- Kregel KC (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermo tolerance. *J Appl Physiol* 92:2177-2186
- Larcher W (2004) *Ecofisiologia Vegetal. Trad.: Prado CHBA. São Carlos: RIMA*, p 531.
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Lee JJ, Bahk JD, Kang KY (2009). Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *J Plant Physiol* 166:1-11.
- Lee S, Yoo SY, Kim DYK, Ko TSK, Ok YS, Kim TW (2014) Proteomic evaluation of the response of soybean (*Glycine max* var Seoritae) leaves to UV-B. *Plant Omics Journal* 7(3):123-132.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol* 148:350-382.
- Lin YH, Huang LF, Hase T, Huang HE, Feng TY (2015) Expression of plant ferredoxin-like protein (PFLP) enhances tolerance to heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *N Biotechnol* 32(2):235-42.
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, et al. (2013). Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* 37:1250-1258.
- Locke M, Noble EG, Atkinson BG (1990) Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology* 258:C723-C729.
- Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:63-92.
- Madson M, Dunand C, Li X, Verma R, Vanzin GF, Caplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD (2003) The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15:1662-1670.
- Mazza, CA. Boccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL and Ballaré CL (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122: 117-125.
- McClung CR (2014) Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the *Arabidopsis* circadian clock. *Reports* 6:2.
- Medina M and Gomez-Moreno C (2004) Interaction of Ferredoxin-NADP+ Reductase with Its Substrates: Optimal Interaction for Efficient Electron Transfer *Photosynth Res* 79:113-131.
- Mehlhorn H, O'Shea JM and Wellburn AR (1991) Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible injury. *J Ex Bot* 42: 17-24.

- Mészáros I, Láposi R, Veres SZ, Bai E, Lakatos GY (2001) A. Gáspár and O. Mile. Effects of supplemental UV-B and drought stress on photosynthesis activity of sessile oak (*Quercus petraea* L.), Proceedings of 12th International Congress on Photosynthesis. CSIRO publishing, p.34-35. Collingwood.
- Mészáros I, Láposi R, Veres S, Sárvári É, Gáspár A, Bai E, Oláh V, Lakatos G (2005) Effects of supplemental UVB radiation on photosynthesis performance and UVB absorbing compounds in leaves of two oak species. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2):165-166.
- Meyermans H, Morreel K, Lapierre C, Pollet B, De Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, Devreese B, Van Beeumen J, Marita JM, Ralph J, Chen C, Burggraeve B, Van Montagu M, Messens E, Boerjan W (2000) Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J Biol Chem* 24;275(47):36899-909.
- Michaela A, Norbert K and George N (2000) Effect of cold and UV-B stress on scavenging systems of phaseolus vulgaris leaves poster. American society of plant biologist found online at <http://www.uni-bonn.de/obstbau>.
- Middleton EM and Teramura AH (1993) The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiol* 103:741-752.
- Ministério de Minas e Energia, Empresa de Pesquisa Energética (MME/EPE) (2013). Balanço Energético Nacional.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the Weld environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11:15-19.
- Molla MR, Ali MR, Hasanuzzaman M, Al-Mamun MH, Ahmed A, Nazim-Ud-Dowla MAN and Rohman MM (2014) Exogenous Proline and Betaine-induced Upregulation of Glutathione Transferase and Glyoxalase I in Lentil (*Lens culinaris*) under Drought Stress *Md. Not Bot Horti Agrobo* 42(1):73-80.
- Molina MJ, Rowland FS (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes - Chlorine atomic-catalysed destruction of ozone. *Nature* 249:810-812.
- Morgan PW and Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant*, 100: 620-630.
- Murakami T, Matsuba S, Funatsuki H, Kawaguchi K, Saruyama H, Tanida M, et al (2004) Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17. 7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Mol. Breed* 13:165-175.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol* 22:867-880.
- Nogués S, Allen DJ, Morison JIL and Baker NR (1998) Ultraviolet-B Radiation Effects on Water Relations, Leaf Development, and Photosynthesis in Droughted Pea Plants. *Plant Physiol* 117:173-181.
- Oliveira Jr RS (2011) Mecanismos de ação de herbicidas. Oliveira Jr RS, Constantin J, Inoue, MH (Coord.). *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba: Omnipax 7:141-192.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M, Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pineau B, Bourge M, Marion J, Mauve C, Gilard F, Maneta-Peyret L, Moreau P, Satiat-Jeunemaître B, Brown SC, De Paepe R, Danon A (2013) The importance of cardiolipin synthase for mitochondrial ultrastructure, respiratory

- function, plant development, and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25(10):4195-208.
- Predieri S, Norman HA, Krizek DT, Pillai P, Mirecki RM and Zimmerman RH (1995) Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene evolution in doyenne d'hiver pear shoots grown in vitro under different photosynthetic photon fluxes. *Env Exp Bot* 35:151-160.
- Rakwal R, Kumar AG and J NS (2001) Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 24:263(1-2):189-98.
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R (1986) Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 39: 51-56.
- Ribeiro, ILAC (2010) Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico. Recife. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco.
- Rohrich RC, Englert N, Troschke K, Reichenberg A, Hintz M, Seeber F, Balconi E, Aliverti A, Zanetti G, Kohler U, Pfeiffer M, Beck E, Jomaa H and Wiesner J (2005). Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* 579: 6433-6438.
- Rybus-Zajac M and Kubiś J (2010) Effect of UV-B radiation on antioxidative enzyme activity in cucumber cotyledons. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52:97-102.
- Salama HMH, Watban AAI, Fughom AAI (2011) Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18:79-86.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Res* 76:199-219.
- Shin M and Arnon DI (1965). Enzymatic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplast. *J. Biol. Chem* 240, 1405-1411.
- Silva MA, Jifon JL, Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz J Plant Physiol* 19:193-201.
- Silva HAP da, Galisa P de S, Oliveira RS da S, Vidal MS, Simões-Araújo JL (2012) Expressão gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(6):797-807.
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environ* 54:529-536
- Scholander PF, Hammel HT, Hemingsen EA, Bradstreet ED (1965) Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy Science* 51:119-125.
- Schultz HR, Löhnertz O, Bettner W, Bálo B, Linsemmeier A, Jähnisch A, Müller M, Gaubatz B, Váradi G (1998) Is grape composition affected by current levels of UV-B radiation? *Vitis* 37:191-192.
- Seeber F, Aliverti A and Zanetti G (2005). The plant-type ferredoxin-NADP+ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Curr. Pharm. Des* 11, 3159-3172.

- Schuppler U, He PH, John PC and Munns R (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117(2):667-78.
- Sgherri CLM, Maffei M, Navari-Izzo P (2000) Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *J. Plant Physiol* 157:273-279.
- Singh SC, Sinha RP and Hader DP (2002) Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica* 41:297-308.
- Skórska E (2011) Comparison of chlorophyll fluorescence parameters of *Cucumis sativus* and *Mentha piperita* leaves exposed to short-term UV-B irradiation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 53:16-19.
- Smith JL, Buritt DJ and Bannister P (2000) Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. *Annals of Botany* 86:1057-1063.
- Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, Ehsanpour AA, Jazii FR, Motamed N, Komatsu S (2010) Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*, 8:19.
- Solovchenko AE and Merzlyak MN (2008) Screening of Visible and UV Radiation as a Photoprotective Mechanism in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(6):719-737.
- Souza CC, Oliveira FA, Silva IF, Amorim Neto MS (2000) Avaliação de métodos determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4(3):338-342.
- Srivastava HS, Shankar N and Yamaya T (2002) Role and Regulation of Glutamate Synthases in Higher Plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 8:39-60.
- Strand A, Foyer CH, Gustaffson P, Garderstrom P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at lower temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* 26:523-535.
- Subbaiah CC and Sachs MM (2001) Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiol* 125:585-594.
- Skirpan AL, Dowd PE, Sijacic P, Jaworski CJ, Gilroy S, Kao TH (2006) Identification and characterization of PiORP1, a *Petunia oxysterol-binding-protein* related protein involved in receptor-kinase mediated signaling in pollen, and analysis of the ORP gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* Jul;61(4-5):553-65.
- Sultana N, Florance HV, Johns A, Smirnoff N (2014) Ascorbate deficiency influences the leaf cell wall glycoproteome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 38(2):375-84.
- Sung SJS, Xu DP, Black CC (1989) Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol* 89: 1117-1121.
- Sun JD, Loboda T, Sung SS, Black CC (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii* and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* 98: 1163-1169.
- Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ and Millar AH (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Journal* 32:891-904.

- Taiz L and Zeiger E (2009) Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 449-484.
- Terol J, Bagues M, Carrasco P, Pérez-Alonso M and Paricio N (2002) Molecular characterization and evolution of the protein phosphatase 2A B' regulatory subunit family in plants. *Plant Physiol* 129(2):808-22.
- Tang Y, Wen X, Lu Q, Yang Z, Cheng Z, Lu C (2007) Heat Stress Induces an Aggregation of the Light-Harvesting Complex of Photosystem II in Spinach Plants. *Plant Physiology* 143:629-638.
- Teramura AH, Ziska LH (1996) Ultraviolet-B radiation and photosynthesis. In NR Baker, ed, *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 435-450.
- Tevini M and Teramura AH (1989) UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol* 50:479-487.
- Ueda A, Li P, Feng Y, Vikram M, Kim S, Kang CH, Kang JS, Bahk JD, Lee SY, Fukuhara T, Staswick PE, Pepper AE, Koiwa H (2008) The *Arabidopsis thaliana* carboxyl-terminal domain phosphatase-like 2 regulates plant growth, stress and auxin responses. *Plant Mol Biol* 67(6):683-97.
- Umate P (2011) Oxysterol binding proteins (OSBPs) and their encoding genes in *Arabidopsis* and rice. *Steroids* 76(5):524-9.
- Van Dillewijn C and Waltham M (1952) Botany of sugarcane. New York: Chronica Botanica 371p.
- Verma, AK et al (2011) Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. *Plant Biology* 13(2):325-32.
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal* 8:1-14.
- Wu M, Grahm E, Eriksson LA, Strid A (2011) Computational evidence for the role of *Arabidopsis thaliana* UVR8 as UV-B photoreceptor and identification of its chromophore amino acids. *J Chem Inf Model* 51:1287-1295.
- Xiong L, Zhu J-K (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 25:131-139.
- Xu C, Sullivan JH, Garrett WM, Caperna TJ, Natarajan S (2008) Impact of solar UV-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. *Phytochemistry* 69:38-48.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2001) Water deficit induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agron J* 93:196-206.
- Yang L, Wang CC, Guo WD, Li XB, Lu M, Yu CL (2006) Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. *Russ J Plant Physiol* 53:390-395.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 123:223-233.
- Yu QB, Jiang Y, Chong K and Yang ZN (2009) AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript accD RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 59(6):1011-23.
- Zhang J, Ma H, Chen S, Perl A, Kovacs L and Chen S (2009) Stress response proteins differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon - A proteomic approach. *Plant Science* 177:103-113.

Zhou XF, Jin YH, Yoo CY, Lin XL, Kim WY, Yun DJ, Bressan RA, Hasegawa PM and Jin JB (2013) CYCLIN H1 regulates drought stress responses and blue light-induced stomatal opening by inhibiting reactive oxygen species accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 162(2):1030-41.

7. Discussão Geral

A exposição de plantas de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579) para o reforço da radiação ultravioleta B (UVB) e seca afetou negativamente e significativamente o processo da fotossíntese, incluindo assimilação de CO₂ (A), a condutância estomática (gs) e a taxa de transpiração (E). No entanto, a amplitude dos efeitos de ambos os fatores de estresse era dependente das interações. Ambos, seca severa e radiação UVB reduziram a condutância estomática e alterou as limitações aparentes para capacidade fotossintética, transpiração e eficiência do uso da água, com exceção da variedade RB867515, que nessas condições de alta UVB e seca severa apresentou respostas superiores comparadas à RB92579, inferindo a possibilidade da RB867515 possuir mecanismos mais eficientes de tolerância comparados à RB92579. Mascaramento dos efeitos do estresse hídrico na presença de radiação UVB pode ser em parte devido a ajustes na anatomia (espessamento da folha) ou alterações bioquímicas (acumulação de pigmentos) à seca que aparentemente também protegem as plantas da radiação UVB. Já o estresse hídrico moderado imposto juntamente com a UVB, não proporcionou efeitos significativos sobre a fotossíntese. Na taxa de transpiração e condutância estomática os estresses aplicados não foram capazes de provocar alterações nessas variáveis e, somente se diferenciaram quanto ao comportamento entre as cultivares avaliadas, onde a RB867515 se mostrou superior à RB92579.

Pesquisas sobre a importância das enzimas antioxidantes no sistema de defesa em cana-de-açúcar sob diferentes condições de estresses têm recebido atenção de vários colaboradores na busca da melhor compreensão da atuação dessas enzimas no sistema de defesa contra o estresse oxidativo. Os dois

experimentos (estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo, juntamente com dois níveis de UVB), apresentaram respostas divergentes para algumas variáveis analisadas. Essa resposta diferencial pode ser devido à intensidade do estresse aplicado, que foi distinto entre os dois estudos. Quando sob estresse hídrico moderado, a variedade RB92579 apresentou uma peroxidação lipídica superior sob alta UVB comparada à variedade RB867515, diferentemente do observado no experimento com estresse hídrico severo. No entanto, a RB867515 se mostrou mais estável, não mostrando alterações significativas no teor de peróxido de hidrogênio e no nível de peroxidação lipídica quando se aumentou a intensidade de UVB. No primeiro estudo (estresse hídrico moderado) verificou-se que a alta radiação UVB promoveu processo lipoperoxidativo nas membranas foliares, independente do regime hídrico. Já no segundo estudo (estresse hídrico severo), os dados obtidos demonstraram que o estresse hídrico severo provocou danos mais graves às membranas do que a alta radiação UVB, danos esses, avaliados como mudanças no conteúdo de MDA.

De maneira geral, os estresses impostos nos dois estudos provocaram alterações significativas no proteoma da fração enriquecida de parede celular nas folhas de cana-de-açúcar (RB867515). No estudo com estresse hídrico moderado, todas as proteínas identificadas como preditas da parede celular vegetal e/ou potencialmente envolvidas em estruturas extracelulares, foram mais abundantes sob alta incidência de radiação UVB. Destas, duas se destacaram por terem sido expressas sob elevada UVB nos dois experimentos: a Proteína associada à Lignina e a Proteína de Choque Térmico. A primeira é constituinte da parede celular e desempenha um papel importante na biossíntese de lignina e flavonóides, sugerindo um papel desta na proteção e defesa contra os danos

causados pelos altos níveis de UVB. E a segunda, proteína de Choque Térmico, por proteção de células e dobramento de proteínas quando expostas a níveis elevados UVB. Outras proteínas foram expressas nas condições de seca e alta UVB, especialmente envolvidas em defesa celular, reposta a estresses abióticos, transdução de sinais, entre outros.

Na literatura são escassos os relatos de trabalhos que relacionem UVB e estresse hídrico, assim como, trabalhos que mencionem esses fatores de estresses potencialmente envolvidos em mecanismos de respostas na parede celular. Em cana-de-açúcar não há relatos de estudos sobre os efeitos do aumento da radiação UVB concomitante à seca. Dessa forma, salienta-se a importância dos resultados obtidos nesse estudo traçando um perfil protéico produzido diferencialmente em frações enriquecidas de parede celular de cana-de-açúcar, bem como, as respostas obtidas do sistema antioxidativo e fisiológico, potencialmente associados aos mecanismos de resposta por estresse de radiação ultravioleta B e seca, simultaneamente.

8. Conclusões Gerais

A exposição à alta UVB e seca ocasionou estresse oxidativo em plantas de cana-de-açúcar, porém a resposta do sistema antioxidante ao estresse hídrico e UVB variou em função das variedades e enzimas analisadas e, da intensidade do estresse hídrico imposto;

A variedade RB867515 apresentou mecanismos de proteção de danos causados por elevação de UVB, de tal forma que, a aplicação da radiação UVB em conjunto com a seca demonstrou efeitos protetores através da redução ou manutenção da intensidade da peroxidação lipídica causada, bem como na manutenção das taxas fotossintéticas, transpiratória e na eficiência do uso da água;

Os estresses por seca e UVB, promoveram alterações significativas no proteoma da fração enriquecida de parede celular;

A Proteína associada à Lignina e a Proteína de Choque Térmico, entre outras identificadas nesse estudo se revelam como promissoras para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares funcionais para a identificação e desenvolvimento de variedades tolerantes ao estresse hídrico e UVB.

9. Referências Bibliográficas

- Abbasi F and Komatsu S (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4:2072-2081.
- Aghaei K, Ehsanpour AA, Shah AH, Komatsu S (2009) Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids* 36(1):91-98.
- Ali GM and Komatsu S (2006) Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath During Drought Stress. *Jornal of Proteome Research* 5:396-403.
- Almeida CMA, Silva TD, Malafaia CB, Amaral DOJ, Arruda IRS, Brito GG, Donato VMTS, Silva MV, Correia MTS (2013) Proteomic and physiological analysis of response to water deficit in sugarcane. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* 2:2315-7259.
- Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirschhoffmann M, Yalovsky S, Zimmermann P, Grossniklaus U, Gruissem W, Baginsky S (2008) Genome-Scale Proteomics Reveals *Arabidopsis thaliana* Gene Models and Proteome Dynamics. *Science* 320:938-941.
- Barbosa MHP (2000) Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. In: simpósio de atualização em genética e melhoramento de plantas. Genética e melhoramento de espécies de propagação vegetativa, 4. Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.1-17.
- Bischof K, Gómez, I, Molis M, Hanekt D, Karsten U, Luder U, Roleda MY, Zacher K and Wience C (2006) Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol* 5:141-166.
- Boeger MRT and Poulson ME (2006) Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta bot. bras* 20(2):329-338.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé M-T and Pont-Lezica R (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5:212-221.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses To Abiotic Stress. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (ed.) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiology 158-1203.
- Caldwell MM, Ballare CL, Bornman JF, Flint SD, Björn LO, Teramura, A.H. et al. (2003) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci* 2: 29-38.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science* 177:570-576.
- Casati P, Zhang X, Burlingame AL, Walbot V (2005) Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Mol Cell Proteomics* 4:1673-1685.
- Cesnik R and Miocque J (2004) Melhoramento da cana-de-açúcar, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 307p.
- Chen S and Harmon AC (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6:5504-5516.

- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso em: 21 outubro 2015.
- Day TA, Ruhland CT and Xiong FS (2001) Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study. *J Photochem Photobiol B Biol* 62:78-87.
- Dennis ES, Dolfreus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants *Jornal of Experimental Botany* 31:89-97.
- Du H, Yu L, Pei K, Ma K (2011) UV Radiation-Responsive Proteins in Rice Leaves: A Proteomic Analysis. *Plant Cell Physiol* 52(2):306-316.
- Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H, Jamet E (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant Methods* 2:10.
- Frohnmeier H and Staiger D (2003) Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology* 133:1420-1428.
- Ghini R, Bettiol W and Hamada E (2011) Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. *Plant Pathology* 60:122-132.
- Hidema J, Song IK, Kumagai T (2001) Relationship between ultraviolet-B sensitivity and cyclobutane pyrimidine dimer photorepair in rice. *Journal Radiation Research* 42:295-303.
- James RA, Blake C, Byrt CS, Munns R. (2011) Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany* 1- 9.
- Jamet E, Boudart G, Borderies G, Charmont S, Lafitte C, Rossignol M, Canut H, Pont-Lezica RF (2008) Isolation of plant cell wall proteins. *Methods Mol Biol* 425:187-201a.
- Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, et al (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* 8:893-908b.
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Lomthaisong K, Daduang S, Jaisil P, Thammasirirak S (2010) A Proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *Am J Biochem Biotech* 6:89-102.
- Kaczkowski J (2003) Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiologiae Plantarum* 25:287-305.
- Kang JG, Pyo YJ, Cho JW, Cho MH (2004) Comparative analysis of differentially expressed proteins induced by K⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 4: 3549-3559.
- Komatsu S and Yano H (2006) Update and challenges on proteomics in rice. *Proteomics* 6:4057-4068.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics* 74(8):1301-22.
- Larcher W (2004) *Ecofisiologia Vegetal*. Trad.: Prado CHBA. São Carlos: RIMA, p 531.

- Lee S-J, Saravanan RS, Damasceno CMB, Yamane H, Kim B-D, Rose JKC (2004) Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:979-988.
- Lima DU, Santos HP, Tiné MA; Molle FRD, Buckeridge MS (2001) Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 24(1-4):191-198.
- Machado O (2011) Informe à imprensa: Plano Decenal de Expansão de Energia – PDE 2020: matriz energética terá aumento de participação de renováveis nesta década. Rio de Janeiro: EPE, 5p.
- Menossi M, Souza GM, Cantarella H (2011) Descobertos genes de cana-de-açúcar que dão tolerância à seca. Programa Bioen – Fapesp. *Revista STAB - Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil* 29:5.
- Ming R, Liu SC, Lin YR, da Silva J, Wilson W, Braga D, van Deynze A, Wenslaff TF, Wu KK, Moore PH, Burnquist W, Sorrells ME, Irvine JE and Paterson AH (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* 150:1663-1682.
- Mpoloka SW (2008) Effects of prolonged UV-B exposure in plants. *African Journal of Biotechnology* 7(25):4874-4883.
- Negri AS, Prinsi B, Scienza A, Morgutti S, Cocucci M, Espen L (2008) Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *Journal of Plant Physiology* 165:1379-1389.
- Newsham KK and Robinson SA (2009) Responses of plants in polar regions to UVB exposure: a meta-analysis. *Global Change Biology* 15: 2574-2589.
- Ngamhui N, Akkasaeng C, Zhu YJ, Tantisuwichwong N, Roytrakul S, Sansayawichai T (2012) Differentially expressed proteins in sugarcane leaves in response to water deficit stress. *Plant Omics Journal* 5(4):365-371.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M, Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pages M (2009) Drought Tolerance in Maize, an Important Crop in Agriculture. In: *Plant Abiotic Stress – from signaling to development, meeting of the INPAS*, 2., 2009, Tartu, Estonia. Livro de resumos. Estonia: International Network of Plant Abiotic Stress (INPAS), p.14.
- Pont-Lezica R, Minic Z, Roujol D, Clemente HS, Jamet E (2010) Plant cell wall functional genomics: Novelties from proteomics. *Advances in Genetics* 1:10.
- Ramalho MAP, Santos JB, Pinto CABP (2008) *Genética na Agropecuária*. 4a ed. Lavras: UFLA, p. 464.
- Ries G, Heller W, Puchta H, Sandermann H, Seidlitz HK and Hohn B (2000) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* p.406.
- Rodrigues FA, Laia ML, Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176:286-302.
- Rossignol M, Peltier JB, Mock HP, Matros A, Maldonado and Jorin AMJ (2006) Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. *Proteomics* 6:5529-5548.
- San Clemente H, Pont-Lezica R, Jamet E (2009) Bioinformatics as a tool for assessing the quality of subcellular proteomic strategies and inferring functions of proteins: plant cell wall proteomics as a test case. *Bioinform. Biol. Insight* 3:15-28.

- Segato SV, Mattiuz CFM, Mozambani AE (2006) Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: Segato SV, Pinto AS, Jendiroba E, et al (Eds.) Atualização em produção de cana-de-açúcar. 1.ed. Piracicaba: Livrocere, p.19-36.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217-223.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410-417.
- Soheila A and Mackerness H (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B): 280–320 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regulation* 32: 27-39.
- Sultana N, Florance HV, Johns A, Smirnoff N (2014) Ascorbate deficiency influences the leaf cell wall glycoproteome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 38(2):375-84.
- Sullivan JH (2003) La Radiación UV-B y sus efectos sobre el crecimiento y la fotosíntesis de plantas terrestres. In: *La Ecofisiología Vegetal: Uma Ciência de Síntesis*, 199-222.
- Taiz L and Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 449-484.
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* 16:1-10.
- Vitamvas P, Saalbach G, Prašil IT, Čapkova V, Opatrna J, Jahoor A (2007) WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in coldacclimated winter wheat. *Plant Physiology* 164:1197-1207.
- Watson BS, Lei Z, Dixon RA and Sumner LW (2004) Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* 65:1709-1720.
- Watson BS, Sumner LW (2007) Isolation of cell wall proteins from *Medicago sativa* stems. *Methods Mol Biol* 355:79-92.
- Yao XQ and Liu Q (2006) Changes in morphological, photosynthetic and physiological responses of Mono Maple seedlings to enhanced UV-B and to nitrogen addition. *Plant Growth Regul* 50:165-177.
- Zhu J, Chen S, Alvarez S, Asirvatham VS, Schachtman DP, Wu Y, Sharp RE (2006) Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol* 140:311-25.
- Zuk-Golaszewska K, Upadhyaya MK, Golaszewski J (2003) The effect of UV-B radiation on plant growth and development. *Plant Soil Environ* 49-3:135-140.
- Wu XC, Fang CX, Chen JY, Wang QS, Chen T, Lin WX (2011) A proteomic analysis of leaf responses to enhanced ultraviolet-B radiation in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in UV sensitivity. *Journal of Plant Biology* 54 (4):251-261.

10. Curriculum vitae (*Lattes*)

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5922316241647873>

Amanda Emanuella Rocha de Souza

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, 2009), Mestre em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, 2011). Atualmente é aluna do Programa de Pós-Graduação em Genética (Doutorado) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética. Atua nas áreas de Melhoramento Vegetal e Genética, com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, atuando principalmente nos seguintes temas: Genômica, Expressão Gênica, Proteômica, Saccharum e bioenergia.

Artigos completos publicados em periódicos

ALBUQUERQUE, Francimar da Silva; SILVA, E. F. F. E. ; NUNES, M. F. F. N.; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de**. Biomass allocation and water use efficiency in fertigated sweet pepper. Engenharia Agrícola (CD-ROM) *JCR*, v. 32, p. 315-325, 2012.

ALBUQUERQUE, F.S.; SILVA, E. F. F.; SILVA, E. F. F.; BEZERRA NETO, E. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de**; SANTOS, A. N. . Nutrientes minerais em pimentão fertirrigado sob lâminas de irrigação e doses de potássio. Horticultura Brasileira (Impresso) *JCR*, v. 30, p. 681-687, 2012.

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de; OLIVEIRA, F. J. ; ANUNCIACAO FILHO, C. J. ; MELO FILHO, P. A.; MELO, L. J. O. T.; TABOSA, J. N. SELEÇÃO DE FAMÍLIAS RB VISANDO ALTA PRODUTIVIDADE E PRECOCIDADE NA MATURAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR. Bragantia (São Paulo, SP. Impresso) *JCR*, v. 70, p. 788-795, 2011.

ALBUQUERQUE, Francimar da Silva; SILVA, E.F.F. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; ROLIM, M. M. . Lixiviação de potássio em um cultivo de pimentão sob lâminas de irrigação e doses de potássio. Revista Caatinga (UFERSA. Impresso) **JCR**, v. 24, p. 135-144, 2011.

Citações: **SCOPUS**6

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SOUZA, J. M. ; **SOUZA, A.E.R. de** ; PENA, E. P. N. ; CALSA, M. C. P. ; CALSA JUNIOR, T. . Isolamento Da Parede Celular e Extração De Proteínas De Diferentes Tecidos Em Cana-De-Açúcar. In: 65 Reunião Anual da SBPC, 2013, Recife. 65 Reunião Anual da SBPC, 2013.

SOUZA, J. M.; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de**; PENA, E. P. N.; CALSA, M. C. P. ; CALSA JUNIOR, T. . Análise comparativa da extração de proteínas de parede celular utilizando dois protocolos em cana-de-açúcar. In: XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Recife. XII JEPEX, 2012.

SOUZA, J. M. ; SILVA, M. F. L. T. ; PENA, E. P. N ; OLIVEIRA, R. S. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; CALSA, M. C. P. ; ALMEIDA, R. R. ; CALSA JUNIOR, T. . Otimização da extração de proteínas totais de folha em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para 2D-PAGE. In: V SICBIO, 2012, Recife. V SICBIO, 2012.

SOUZA, J. M. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; FOLHA, R. E. O. ; BARBOSA NETO, A. G. ; PENA, E. P. N. ; SILVA, M. F. L. T. ; OLIVEIRA, R. S. ; CALSA, M. C. P. ; CALSA JUNIOR, T. . OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR PURIFICATION OF CELL WALL PROTEOME OF LEAF IN SUGARCANE. In: XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2012, Recife. XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2012.

PENA, E. P. N.; FOLHA, R. E. O. ; PACHECO, C. M.; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de**; LIRA, N. P. V. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . ANALISE CLOROPLASTIDIAL DE SORGO RELACIONADO À SÍNTESE DE CARBOIDRATOS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL. In: XI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (XI JEPEX), 2011, Recife - PE. ANAIS DO XI JEPEX, 2011.

SOUZA, J. M.; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de**; FOLHA, R. E. O. ; LIRA, N. P. V.; MANSO, T. C.; PESTANA-CALSA, M. C.; CALSA JUNIOR, T. . ANÁLISE IN SILICO DE GENES TRANSCRITOS RELACIONADOS À PAREDE CELULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR. In: XI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (XI JEPEX), 2011, Recife - PE. ANAIS DO XI JEPEX, 2011.

ALBUQUERQUE, Francimar da Silva ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; SILVA, E. F. F. E. . RELAÇÕES ENTRE CÁTIOS FOLIARES E TROCÁVEIS NO SOLO EM UM CULTIVO DE PIMENTÃO FERTIRRIGADO. In: Anais do XI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (XI JEPEX), 2011, Recife - PE. ANAIS DO XI JEPEX, 2011.

SOUZA, J. M. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; PENA, E. P. N. ; LIRA, N. P. V. ; MANSO, T. C. ; PACHECO, C. M. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE GENES DE EXPANSINA PRESENTES EM CANA-DE-AÇÚCAR. In: I CONGRESSO NACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E IV SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - I CONABIO/ IV SIMCBIO CATÓLICA, 2011, Recife. Anais do I CONABIO/IV SIMCBIO CATÓLICA, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de ; SOUZA, J. M. ; BARBOSA NETO, A. G. ; SILVA, F. A. C. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . Sugarcane cell wall proteome response to high ultraviolet-B radiation stress. In: I International Plant Proteomics Organization World Congress, 2014, Hamburg. Abstracts of I INPPO World Congress. Hamburg Universitat, 2014. p. 110-110.

SILVA, F. A. C. ; **SOUZA, A.E.R. de** ; SOUZA, J. M. ; PENA, E. P. N. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . PHOTOOXIDATIVE STRESS TRIGGERING PROTEOME RESPONSE MECHANISMS IN SUGARCANE. In: 2nd Proteomics Meeting of the Brazilian Proteomics Society jointly with the 2nd Pan American HUPO Meeting, 2014, Búzios. 2nd Proteomics Meeting of the Brazilian Proteomics Society jointly with the 2nd Pan American HUPO Meeting, 2014.

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de ; SOUZA, J. M. ; CALSA JUNIOR, T. . Sugarcane leaf cell wall proteome isolation for 2D-PAGE/MS analysis. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013, Bento Gonçalves. Anais do IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013.

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de ; SOUZA, J. M. ; MANSO, T. C. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . Isolamento do proteoma de parede celular de cana-de-açúcar para análise via 2D-PAGE/MS. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste e I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste, 2012, Petrolina/Juazeiro. Anais do XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012.

SOUZA, A.E.R. de . Estabelecimento de um protocolo de extração de proteínas de parede celular para análise proteômica em diferentes tecidos de cana-de-açúcar. In: II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, 2012, Recife. II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, 2012.

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de ; OLIVEIRA, F. J. ; Matias Júnior, J. M. . GENETIC DISSIMILARITY AMONG PROGENIES FAMILIES OF SUGAR CANE. In: Xº GERMPLASM & BREEDING and 7º MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, 2011, MACEIÓ. Anais do Xº GERMPLASM & BREEDING and 7º MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, 2011. p. 36-36.

PACHECO, C. M. ; FOLHA, R. E. O. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; LIRA, N. P. V. ; MACIEL, L. S. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M. C. ;

CALSA JUNIOR, T. . Proteomics of drought-tolerant sugarcane roots under salinity. In: Anais do 7th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (AB3C) and 3rd International Conference of the IberoAmerican Society for Bioinformatics (SolBio), 2011, Florianópolis. Anais do X-MEETING, 2011.

GOMES, N. O. C. ; LIRA, N. P. V. ; MANSO, T. C. ; PACHECO, C. M. ; FOLHA, R. E. O. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . In silico transcriptome matching of mass-spectrometry-derived protein sequence associated to salinity tolerance in sugarcane roots. In: 7th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (AB3C) and 3rd International Conference of the IberoAmerican Society for Bioinformatics (SolBio), 2011, Florianópolis. Anais do X-MEETING, 2011.

MANSO, T. C. ; FOLHA, R. E. O. ; **SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de** ; CALSA JUNIOR, T. . TOWARDS COWPEA CHLOROPLAST GENOME ASSEMBLY. In: 7th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (AB3C) and 3rd International Conference of the IberoAmerican Society for Bioinformatics (SolBio), 2011, Florianópolis. Anais do X-MEETING, 2011.

SOUZA, Amanda Emanuella Rocha de ; PACHECO, C. M. ; FOLHA, R. E. O. ; LIRA, N. P. V. ; MACIEL, L. S. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA JUNIOR, T. . Differential peptides from salt-sensitive sugarcane roots. In: 7th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (AB3C) and 3rd International Conference of the IberoAmerican Society for Bioinformatics (SolBio), 2011, Florianópolis. Anais do X-MEETING, 2011.