

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

**Romel Duarte Vilela**

**Análise fisiológica e proteômica do meristema apical da  
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob aplicação de cálcio**

**Recife**

**2016**

**Romel Duarte Vilela**

**Análise fisiológica e proteômica do meristema apical da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob aplicação de cálcio**

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

**Coorientador:** Prof. Dr. Laurício Endres

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Vilela, Romel Duarte**

**Análise fisiológica e proteômica do meristema apical da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) sob aplicação de cálcio/ Romel Duarte Vilela– Recife: O Autor, 2016.**

**150 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Tercilio Calsa Junior**

**Coorientador: Laurício Endres**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Genética, 2016.**

**Inclui referências, apêndice e anexo**

- 1. Cana de açúcar- melhoramento genético 2. Cálcio I. Calsa Junior, Tercilio (orientador) II. Endres, Laurício (coorientador) III. Título**

**581.35**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-175**

**Análise fisiológica e proteômica do meristema apical da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob aplicação de cálcio**

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

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

---

**Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dra. Kátia Castanho Scortecci**  
**Universidade Federal do Rio Grande do Norte**

---

**Dra. Lilia Gomes Willadino**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dra. Maria Clara Pestana Calsa**  
**Universidade Maurício de Nassau**

**Recife**  
**2016**

Aos meus pais Ronaldo Vilela Rodrigues (*in memorian*) e Tereza Cristina Duarte Vilela, por terem preparado em mim a base sem a qual eu não teria chegado tão longe!

A minha esposa Glaucia Marinho por ser a fiel companheira dos momentos bons e ruins... “Que bom que o nosso amor venceu o tempo e a distância!”

Aos meus irmãos Rildo Vilela e Rômulo Vilela por serem os grandes amigos de sempre!

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

A Deus, pela vida, por ser o meu guia, por me dar forças e me acolher nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador professor Dr. Tercilio Calsa Jr., pela orientação, amizade, pelas broncas necessárias, por ter acreditado em mim, pelos conselhos profissionais e pelas palavras de apoio e incentivo sem as quais eu não teria conseguido.

Ao meu co-orientador professor Dr. Laurício Endres, pela orientação e por todo o apoio principalmente durante a experimentação de campo.

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da Universidade Federal de Alagoas, PMGCA/UFAL, através dos professores Geraldo Veríssimo e João Messias pela realização do experimento na Estação e Cruzamento de Cana-de-açúcar, Serra do Ouro. Aos técnicos Luís Cláudio e José Amaro por todo o apoio durante o experimento e ao professor Dr. José Leonaldo de Souza pelo apoio com os dados climatológicos.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UFAL, Luan, Benigno, Nelson, Sihélio, João e Vicente por todo o apoio no experimento de campo e durante as coletas das amostras.

Ao CETENE - Central Analítica e Microscopia, Dra. Júlia Campos e Dra. Janaína Melo pelas análises de Espectrometria de Massas e Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Profa. Dra. Kátia Scortecchi e a doutoranda Kellya Barreto, pela colaboração com as análises de microscopia ótica.

Ao professor Dr. Fábio Gozzo, Espectrometria de Massas/UNICAMP, por ceder acesso ao banco de dados de proteínas.

Ao doutorando Túlio Diego da Silva, Laboratório de Biologia Molecular/UFPE, pelo apoio durante a análise no IPGPhor.

Aos companheiros e amigos do laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas – LGPP/UFPE, Dra. Fabiana Cavalcante, doutorandos: Adauto Barbosa, Paulo Martins, Melquisedec Oliveira, Marciana Morais, aos mestrandos Juliana Souza e Elton Nunes.

E os que passaram pelo LGPP, Téc. Celuza Castro, Nielton Araújo, Dra. Renata Almeida, Dra. Amanda Rocha, Dr. João Dutra, doutoranda Taciana Manso, aos Mestres Raul Felipe Neves, Regina Folha, Luisa Lima, muito obrigado pelo apoio durante as análises, conversas, conselhos, pelos momentos de descontração... sem vocês essa jornada seria mais difícil!

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Genética - PPGG/UFPE pela oportunidade.

Aos professores do PPGG/UFPE pelos ensinamentos durante as aulas e convivência no dia a dia na Universidade.

Aos colegas da turma 2012.1, pela amizade, troca de conhecimentos e experiências, fundamentais durante as disciplinas e estudos.

Aos colegas que dividiram o apartamento comigo durante esses quatro anos, pelas conversas durante o café, pela descontração, pela convivência tranquila.

A família meu alicerce, minha esposa, mãe, irmãos, tios e sobrinhos, vocês foram fundamentais em todos os momentos.

A CAPES pela bolsa de doutorado cedida.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

“O topo da inteligência é alcançar a humildade.”

“Salomão Ibn Gabirol”.

## Resumo

Na cana-de-açúcar, a conversão de meristema vegetativo para reprodutivo é uma etapa importante para o melhoramento genético, no entanto, é indesejável na produção comercial por consumir sacarose para o desenvolvimento da inflorescência. Este estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente acumuladas no meristema apical da variedade de cana RB867515 sob aplicação foliar de sulfato de cálcio, através de eletroforese 2D e espectrometria de massas. Foi testado o efeito do cálcio em parâmetros morfofisiológicos, concentração de macronutrientes e anatomia do ápice meristemático por microscopia ótica. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do cálcio no proteoma do ápice meristemático durante as fases de pré e pós-indução do florescimento. A aplicação foliar de cálcio aumentou a altura de colmos, e a abertura estomática também foi alterada. A composição dos macronutrientes mostrou maiores níveis de cálcio e menores teores de potássio e magnésio. A aplicação foliar de cálcio reduziu em cerca de 20% o florescimento da cana planta e 35% na cana soca. Na análise proteômica, um total de 60 DEPs foram identificados por PMF a partir de perfis 2D de meristemas em pré ou pós indução floral, dos quais 14 foram observadas exclusivamente em meristemas tratados com cálcio, 11 foram identificadas exclusivamente após a indução floral, e 29 foram comuns em ambas as situações, porém mais abundantes em meristemas sem aplicação de cálcio antes da indução floral. A aplicação foliar de cálcio alterou significativamente o proteoma meristemático da cana-de-açúcar. O cálcio parece também melhorar a sinalização celular e a atividade antioxidante em meristemas. O efeito da aplicação foliar de cálcio no proteoma parece ser atenuado pelo tempo. As proteínas identificadas são fortes candidatas a estudos futuros envolvendo o controle do florescimento da cana, visando sua aplicação como marcador molecular funcional associadas ao cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético desta cultura.

**Palavras-chave:** Cálcio, Controle do florescimento, Espectrometria de massas, *Sacharrum*, 2D-PAGE.

## Abstract

In sugarcane (*Saccharum* spp.), the conversion of apical meristem to breeding is an important step for the genetic improvement, however, it is undesirable in commercial production due to consuming sucrose to develop inflorescence. This study aimed to identify differentially accumulated proteins in the apical meristem of the RB867515 variety under foliar application of calcium sulfate through 2D electrophoresis and mass spectrometry. It has been tested the calcium effect on morphophysiological parameters, macronutrient contents and anatomy of the shoot apical meristem by optical microscopy. Additionally, we evaluated the effect of calcium on the proteome of sugarcane apical meristem during the phases of pre and post-induction of flowering. Foliar applications of calcium increased the stalk height, and stomatal opening was also measured. The macronutrient composition showed higher calcium levels and lower levels of potassium and magnesium. Leaf applications of calcium reduces flowering by 20% in sugarcane plant, and 35% reduction in the ratoon cane. In the proteome analysis, a total of 60 DEPs have been identified by PMF from 2D meristems profiles in pre and post-floral induction, of which 14 were found exclusively in meristems treated with calcium, 11 were identified only after floral induction, and 29 were common in both cases, but more abundant in meristems without application of calcium before floral induction. Foliar applications of calcium significantly altered the meristematic proteome of sugarcane. Calcium also appears to enhance cell signaling and antioxidant activity in meristems. It was observed that the effect of foliar calcium application in proteome appears to be attenuated by time. The proteins identified are strong candidates for future studies aiming its use as a functional molecular marker involving control of flowering of sugarcane associated with calcium, can help breeding programs of this culture.

**Key words:** Calcium, Flowering control, *Saccharum*, 2D-PAGE, mass spectrometry.

## Lista de Ilustrações

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Vias de sinalização da indução do florescimento em *Arabidopsis thaliana*. O diagrama apresenta os principais componentes e interações para a indução e repressão floral (Adaptado de Matsoukas *et al.*, 2012). 23
- Figura 2.** Principais genes da via de floração de arroz, *Arabidopsis* e cevada/trigo. Genes de *Arabidopsis* e seus prováveis ortólogos em trigo e cevada estão destacados em vermelho, identificados em bancos de dados de sequências públicas (Adaptado de Cockram *et al.*, 2007). 24
- Figura 3.** O modelo ABCDE para a determinação do órgão floral em *Arabidopsis thaliana*. 26
- Figura 4.** Modelo hipotético da via fotoperiódica de indução floral da cana-de-açúcar. Gigantea (GI), Constans (CO), Flowering locus T (FT), Grain number, Plant Height and Heading Date7 (GHD7) e Early Heading Date1 (EHD1). Cada elemento da via corresponde à EST-contig selecionados através da caracterização *in silico* dos prováveis genes de tempo de floração. 34
- Figura 5.** Fluxo de trabalho de proteômica de plantas a partir de amostragem de plantas para melhoramento genético de culturas. 38
- Figura 6.** Processos de transdução de sinal mediados pelo cálcio ( $Ca^{2+}$ ) em células de plantas. Exemplos de processos de transdução de sinal mediadas por Calmodulinas (CaMs), Proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) e Proteína de ligação a caucineurina (CBL-CIPK) juntamente com suas respectivas proteínas-alvo, as quais foram investigadas em diferentes espécies de plantas (indicado pelas siglas: At, *Arabidopsis*; St, batata; Nt, tabaco). A fosforilação de proteínas alvo é indicada pelo P em amarelo circulado. 41

### Capítulo I

- Figura 1.** Médias mensais de temperaturas mínima, média e máxima (A), registradas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, AL (09° 14' 22" S; 35° 50' 11" W; 480m de altitude). Precipitação pluviométrica (mm) e fotoperíodo (horas) do 15º dia do mês (B). 51
- Figura 2.** Esquema de aplicação dos tratamentos, coletas e análises morfofisiológicas realizadas durante o experimento no período 2013/2014. 52
- Figura 3.** Ilustração de etapas do experimento: plantio em caixas (A), aplicação do tratamento no campo com pulverizador costal (B), experimento no campo (C), coleta da região contendo o ápice meristemático de cana-de-açúcar (D). 53
- Figura 4.** Percentagem de florescimento de colmos da variedade de cana-de-açúcar RB867515 nos meses de abril, maio e junho de 2014, submetidas à 56

aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio  $\text{CaSO}_4$  aos 90, 130, e 165 dias após o corte, cultivadas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, no município de Murici – Alagoas.

- Figura 5.** Valores médios de comprimento de colmos (A), número de entrenós por colmo (B), comprimento da folha +3 (C) e largura da folha +3 (D) na variedade RB867515, submetidos à aplicação foliar de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). 57
- Figura 6.** Variações diurnas de  $A$  fotossíntese (A);  $E$  transpiração foliar (B);  $g_s$  condutância estomática (C) e  $C_i$  concentração interna de  $\text{CO}_2$  (D) na variedade de cana RB867515 sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) cultivadas em condições de campo aos 180 dias após a rebrota (cana-soca). 58
- Figura 7.** Concentração dos macro-nutrientes, cálcio (A), enxofre (B), potássio (C), magnésio (D) e fósforo (E) do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, coletados aos 130 dias após a rebrota (cana-soca) no período anterior à floração, submetida à aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). 59
- Figura 8.** Análise histológica da secção frontal do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (com  $\text{Ca}^{2+}$ ) e controle (sem  $\text{Ca}^{2+}$ ), aumento 5X, espessura 10  $\mu\text{m}$ , coradas utilizando safranina. 61

## Capítulo II

- Figura 1.** Representação esquemática do processo de isolamento e extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar variedade RB867515 - Protocolo A - Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008). 77
- Figura 2.** Representação esquemática do processo de isolamento e extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar variedade RB867515 - Protocolo B - Hurkman e Tanaka (1986), com modificações de Boaretto (2012). 79
- Figura 3.** Gel 1D SDS-PAGE de proteínas totais do meristema apical de cana-de-açúcar: (A) Ácido Tricloroacético TCA e ( B) Fenol; (M) marcador de peso molecular (KDa). 83
- Figura 4.** Localização de fragmentos excisados do gel SDS-PAGE de meristemas apicais da variedade de cana-de-açúcar RB867515, tratamentos Pós-indução do florescimento controle e Pré-indução do florescimento sob aplicação de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) para análise em espectrometria de massas. 1-21: numeração das bandas excisadas do gel. 84
- Figura 5.** Bandas do gel SDS-PAGE de meristemas apicais da variedade de cana-de-açúcar RB867515, analisadas pelo software Gel Analyzer v. 2010a nos tratamentos Pós-indução do florescimento controle (A) numeração 1 a 19 e Pré-indução do florescimento sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (B) numeração 1 a 21. 85
- Figura 6.** Anotação GO por processo biológico de proteínas do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, identificadas em fragmentos do gel SDS-PAGE. 90

### Capítulo III

- Figura 1.** Médias mensais de temperaturas mínima, média e máxima (A), 105 registradas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, AL (09° 14' 22" S, 35° 50' 11" W, 480m de altitude). Precipitação pluviométrica (mm) e fotoperíodo (horas) do 15º dia do mês (B).
- Figura 2.** Ilustração de etapas do experimento: plantio em caixas (A), aplicação 106 do tratamento no campo com pulverizador costal (B), experimento no campo (C), região do meristema do ápice da cana-de-açúcar (D).
- Figura 3.** Esquema de aplicação dos tratamentos e coletas para análise 107 proteômica realizadas durante o experimento no período 2012/2013.
- Figura 4.** Percentagem de florescimento de colmos da variedade de cana-de- 115 açúcar RB867515 nos meses de abril, maio e junho de 2014, submetidas à aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio  $\text{CaSO}_4$  aos 135, 165 e 195 dias após o corte, cultivadas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, no município de Murici – Alagoas.
- Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *matches* (*spots*) com 116 variação significativa na % vol ou (ANOVA  $\leq 0,05$ ), utilizando extrato de proteínas totais do meristema do ápice caulinar da variedade RB867515 no período de pré-indução do florescimento. (A) Gel obtido do tratamento sem cálcio (Controle), (B) Gel obtido do tratamento submetido a aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ).
- Figura 6.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização dos *matches* (*spots*) com 117 variação significativa na % vol ou (ANOVA  $\leq 0,05$ ), utilizando extrato de proteínas totais do meristema do ápice caulinar da variedade RB867515 no período de pós-indução do florescimento. (A) Gel obtido do tratamento sem cálcio (Controle), (B) Gel obtido do tratamento submetido a aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ).
- Figura 7.** Variação em volume (%) dos *matches* (*spots*) comuns na pré-indução 118 do florescimento em ápices meristemáticos da variedade de cana-de-açúcar RB867515, nos tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) com % vol  $\geq 1,5$  e (ANOVA  $\leq 0,05$ ).
- Figura 8.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* 121 diferencialmente expressos no meristema do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 nos tratamentos sem cálcio (controle) (A) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.
- Figura 9.** Categorização da ontologia gênica dos DEPs de meristemas do ápice 128 da cana-de-açúcar expressa durante a pré-indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). 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, encontrado para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento.
- Figura 10.** Categorização da ontologia gênica dos DEPs de meristemas do ápice 129 da cana-de-açúcar na pós-indução do florescimento expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). 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, encontrado para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento.

**Figura 11.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais em meristemas do ápice da cana-de-açúcar durante a Pré-indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>). 130

**Figura 12.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais em meristemas do ápice da cana-de-açúcar durante a Pós-indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>). 130

**Figura 13.** Modelo esquemático dos processos de regulação proteica em meristemas de cana-de-açúcar durante a pré-indução do florescimento em condições normais de cultivo (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de CaSO<sub>4</sub>. 149

## Lista de Tabelas

### Capítulo II

- Tabela 1.** Análise do perfil do Gel SDS-PAGE no tratamento Pós-florescimento controle em meristemas do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 pelo software Gel Analyzer v. 2010a. 86
- Tabela 2.** Análise do perfil do Gel SDS-PAGE no tratamento Pré-florescimento cálcio em meristemas do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 pelo software Gel Analyzer v. 2010a. 87
- Tabela 3.** Anotação presumível de peptídeos detectados em seções de SDS-PAGE de amostras do meristema apical da cana-de-açúcar sob aplicação foliar de 58 mM sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) nos tratamentos Pós-indução controle e Pré-indução cálcio, analisados nos bancos de dados de proteínas de espécies de plantas SwissProt: Viridiplantae, e *Saccharum*. 89

### Capítulo III

- Tabela 1.** Total de *spots* selecionados com razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) nos períodos de Pré e Pós-indução do florescimento. 119
- Tabela 2.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação. 120
- Tabela 3.** Distribuição da identificação obtida para DEPs selecionados, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot. 122
- Tabela 4.** Anotação presumível das DEPs comuns entre os tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pré-indução do florescimento, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. 123
- Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs exclusivos nos tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pré-indução do florescimento, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. 125
- Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs comuns e exclusivos nos tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pós-indução do florescimento, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. 126
- Tabela 7.** . Tabela comparativa de proteínas por processo biológico durante a pré-indução do florescimento da variedade de cana-de-açúcar RB867515. Proteínas mais abundantes no controle (- cálcio) e proteínas mais abundantes sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (+ cálcio). 148

## Lista de Abreviaturas

Item	Definição
PDC	Planta de dia curto
SUCEST	<i>Sugarcane expressed sequence tag</i>
ESTs	Sequências transcritas expressas
<i>GI</i>	<i>GIGANTEA</i>
<i>FT</i>	<i>Flowering locus T</i>
PEPB	Proteína da família de ligação fosfatidiletanolamina
<i>TFL1</i>	<i>TERMINAL FLOWER 1</i>
SAM	<i>Shoot apical meristem</i>
GA	Giberelina
PDL	Planta de dia longo
<i>LFY</i>	<i>Leafy</i>
<i>ELF3</i>	<i>EARLY FLOWERING 3</i>
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
PHY	Fitocromo
CRY	Criptocromo
<i>FLC</i>	<i>FLOWERING LOCUS C</i>
<i>SOC</i>	<i>SUPPRESSOR OVEREXPRESSION OF CONSTANS</i>
mM	milimolar
CaM	Calmodulina
pI	Ponto isoelétrico
IEF	Focalização isoelétrica
IPG	Gradiente de pH imobilizado

DEPs	Spots diferencialmente expressos
CDPKs	Proteínas quinases dependentes de cálcio
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
ATPase	Adenosina trifosfatase
AtACa	Anidrase carbônica alfa 2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
2D PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional
MS	Espectrometria de massas
<i>A</i>	fotossíntese líquida
<i>E</i>	Transpiração
<i>gs</i>	Condutância estomática
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SuSy	Sacarose sintase
G3PDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
UDP	Uridina difosfato
rRNA	Ácido ribonucleotídeo ribossomal
FSII	Fotossistema 2
TCA	Ácido tricloroacético
Pós-Co	Pós-indução do florescimento controle
Pós-Ca	Pós-indução do florescimento cálcio
UDPase	UDP-glicose pirofosforilase
PPO	Polifenol oxidase
ZDS	Zeta-caroteno desaturase
PAL	Fenilalanina amônia liase

ADK	Adenosina quinase
RBCS	Proteína ribulose bisfosfato carboxilase
MDH	Malato desidrogenase

## Sumário

1. Introdução.....	19
2. Revisão de literatura.....	21
2.1 Florescimento e mecanismos de regulação da indução floral.....	21
2.2 A cana-de-açúcar.....	29
2.3 Florescimento da cana-de-açúcar.....	31
2.4 Proteômica.....	34
2.4.1 Eletroforese bidimensional 2D-PAGE.....	35
2.4.2 Espectrometria de Massas (MS).....	36
2.4.3 Proteômica de Plantas.....	37
2.5 Cálcio nas plantas e no florescimento.....	39
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Capítulo I.....	45
5. Capítulo II.....	70
6. Capítulo III.....	99
7. Discussão Geral.....	157
8. Conclusões Gerais.....	159
9. Referências Bibliográficas.....	160
10. Currículo vitae ( <i>Lattes</i> ).....	167

## 1. Introdução

Na cana de açúcar (*Saccharum spp.*) a conversão de meristema vegetativo para meristema floral é uma etapa importante para o melhoramento da cultura, pois a inflorescência contém o material genético fundamental para o cruzamento de clones e para a obtenção de características desejáveis. Por outro lado, a ocorrência do florescimento em cultivos comerciais é extremamente indesejada pelos produtores, uma vez que nesse processo a sacarose acumulada no colmo é desviada para o desenvolvimento da flor. Como consequência, o crescimento da planta é retardado, levando a perdas substanciais no rendimento em sacarose.

Na cana-de-açúcar, a indução florescimento e posterior diferenciação de meristema vegetativo para reprodutivo é controlado por diversos fatores climáticos e genéticos, que envolvem principalmente, fotoperíodo, temperatura, umidade, nutrição e os efeitos destes na regulação da expressão gênica. Dentre esses fatores o fotoperíodo é um dos mais importantes. A cana-de-açúcar floresce num período em que a duração do dia diminuiu abaixo do seu fotoperíodo crítico que é de 12,5 h, sendo considerada uma planta de dia curto (PDC). Além disso, antes da floração a planta necessita de um período de crescimento para que desenvolva entrenós maduros e em número suficiente, entre 2-4 entrenós, dependendo da variedade, como uma sinalização para a evocação floral.

O conhecimento sobre os fatores envolvidos na indução do florescimento da cana é fundamental para o desenvolvimento de estratégias no sentido de controlar sua ocorrência em campo. Como solução para o problema, tem sido sugerido o desenvolvimento de variedades selecionadas menos propensas a florescer em campo, o uso de compostos à base de etileno, a supressão da

irrigação, tratamentos de interrupção do escuro, aplicação foliar de cálcio, dentre outros.

Quanto à base molecular do desenvolvimento da inflorescência, há pouca informação disponível para cana-de-açúcar. Apesar disso, ocorreram alguns avanços, o maior deles foi a formação do banco de dados de sequências transcritas expressas da cana-de-açúcar, projeto SUCEST. A conclusão do sequenciamento completo do genoma do arroz, milho e *Brachypodium* também tem auxiliado na compreensão da maioria dos genes e fatores de transcrição envolvidos na regulação do florescimento em gramíneas. Além disso, a elucidação dos mecanismos moleculares que regulam o florescimento em espécies vegetais modelo, como descritos em *Arabidopsis*, também tem sido crucial.

O conhecimento dos mecanismos que governam a transdução de sinais a diferentes estímulos endógenos e ambientais são importantes na compreensão da transição floral da cana. Dada a especificidade na qual a cana percebe alguns sinais endógenos e ambientais para regular a transição para o desenvolvimento reprodutivo, espera-se que haja uma série de proteínas reguladoras atuando de forma coordenada no controle das diversas vias que culminam na expressão de genes de identidade de meristemas e diferenciação de órgãos florais. Nesse aspecto, o uso de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um alvo interessante de estudo, devido à complexidade de mecanismos com os quais esse íon interage dentro de várias organelas na célula. Desta forma, uma melhor compreensão do papel do cálcio na redução do florescimento da cana será crucial para uma triagem de possíveis marcadores moleculares envolvidos na regulação da transição floral nesta cultura.

A abordagem proteômica, neste caso, é uma estratégia importante por realizar uma análise aberta, proporcionando uma visualização global de todo o processo, e ainda pela vantagem da maior proximidade com o fenótipo. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da aplicação foliar de cálcio no acúmulo diferencial de proteínas no ápice meristemático da variedade de cana RB867515.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Florescimento e mecanismos de regulação da indução floral**

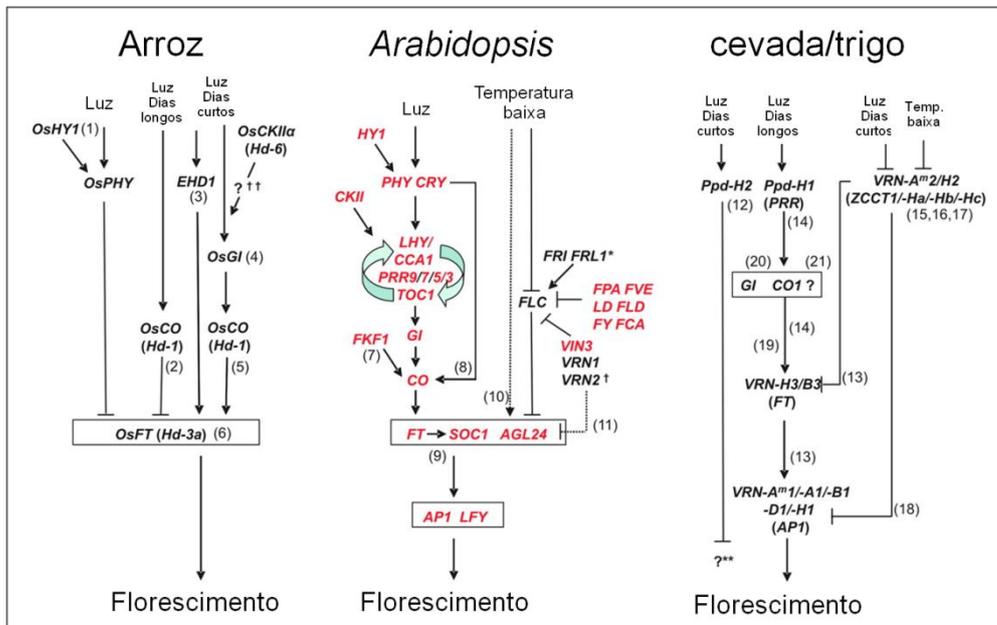
O florescimento corresponde à transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva (Zhou *et al.*, 2007). O momento em que essa mudança ocorre é de grande importância para a agricultura e para o melhoramento de plantas (Junge Müller, 2009). A maioria das plantas percebe sinais ambientais para regular a transição para a floração, de modo que completem o ciclo de reprodução sob condições externas favoráveis (Bernier *et al.*, 1993). A indução floral ocorre após as plantas terem atingido certo estágio de desenvolvimento e em resposta a estímulos endógenos e ambientais (Zhou *et al.*, 2007). Esse processo é marcado pela diferenciação do meristema apical (SAM), o local onde ocorre a organogênese. O SAM consiste de um conjunto de células indiferenciadas, as quais dividem-se continuamente para a formação de caule, ramos e folhas (Glover, 2007). Anatomicamente, o SAM na eudicotiledônea *A. thaliana*, é composto por três camadas de células, L1, a camada mais externa formada por uma única camada de células, L2, abaixo da L1, geralmente possui 2 a 3 camadas de espessura de células, dividindo-se predominantemente em anticlinal, para gerar a epiderme da planta, ou seja, perpendicular a superfície, e a camada

L3, a qual se divide em grande quantidade de tecidos nos sentidos anti e periclinal (Evans e Barton, 1997; Liu e Hu, 2010). Por outro lado, em monocotiledôneas a exemplo do milho, histologicamente é observada na túnica apenas uma camada L1, e corpus algumas vezes é chamado de L2 (Abbe *et al.* 1951) Uma vez que a indução floral ocorre, o SAM irá se preparar para uma série de mudanças moleculares e fisiológicas, e um dos primeiros eventos é o aumento na transcrição, seguido de síntese de proteínas (Tamaki *et al.*, 2007), e alteração nos níveis de carboidratos, como aumento de sacarose (Ohto *et al.*, 2001), de modo a garantir a alta atividade metabólica e gasto energético requerido no processo (Glover, 2007).

Vias genéticas que promovem a floração em resposta a esses sinais foram definidos no modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* e várias proteínas reguladoras envolvidas foram identificadas (Figura 1).



caracterizados em *A. thaliana*, e as suas funções são conservadas. No entanto, outros demonstraram ser homólogos ao gene que controla o tempo de floração em *A. thaliana*, contudo parecendo ter funções distintas, e muitos não são encontrados em *A. thaliana* (Andrés e Coupland, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** Principais genes da via de floração de arroz, *Arabidopsis* e cevada/trigo. Genes de *Arabidopsis* e seus prováveis ortólogos em trigo e cevada estão destacados em vermelho, identificados em bancos de dados de sequências públicas (Adaptado de Cockram *et al.*, 2007).

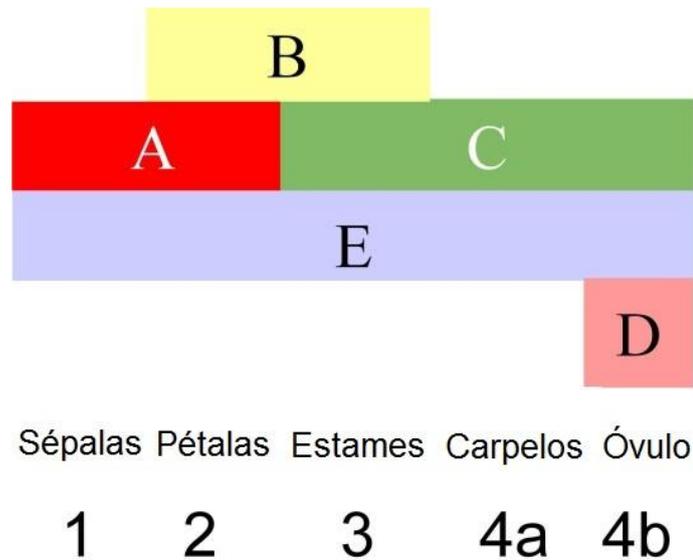
O princípio unificador no campo do desenvolvimento da flor é o modelo ABC. Este modelo, inicialmente proposto no início de 1990 com base em experiências genéticas em *Antirrhinum* e *Arabidopsis*, possui grande simplicidade e é aplicável a uma grande variedade de espécies de angiospermas, eudicotiledôneas e monocotiledôneas, incluindo espécies de gramíneas economicamente importantes, como o arroz e o milho (Koornneef *et al.*, 1991; Causier *et al.*, 2010).

A flor de *Arabidopsis*, por exemplo, como a maioria das angiospermas, consiste em quatro tipos de órgãos que são dispostos numa série de anéis

concêntricos ou espirais. De fora para dentro, a flor é composta por sépalas, pétalas, estames e carpelos (Weigel e Meyerowitz, 1994).

O modelo ABC postula que três atividades, A, B, e C, especificam a identidade do órgão floral de uma forma combinatória. Especificamente, A especifica sépalas, A + B especifica pétalas, B + C especifica estames, e C só especifica carpelos. Um segundo aspecto importante é que as classes A e C são mutuamente repressivas. Na ausência de A, a atividade C está presente em toda a flor. Do mesmo modo, na ausência de C, a atividade A está presente em toda a flor. Ao longo dos anos 1990, os genes ABC foram clonados a partir de uma vasta gama de espécies, e numerosos estudos moleculares foram realizados. Estas experiências moleculares apoiaram amplamente os princípios fundamentais do modelo ABC (Lohmann e Weigel, 2002).

Posteriormente, o modelo ABC foi ampliado para cinco classes de genes (ABCDE) para explicar novos mutantes florais e para acomodar funções que especificam o desenvolvimento do óvulo e do estabelecimento de contexto floral (Ferrario *et al.*, 2003), sendo proposto também em *A. thaliana* e *A. majus* envolvendo os fatores de transcrição MADS-box (van Mourik *et al.*, 2010).



**Figura 3.** O modelo ABCDE para a determinação do órgão floral em *Arabidopsis thaliana*. (adaptado de van Mourik *et al.*, 2010).

Em termos gerais, o desenvolvimento da flor pode ser dividido em quatro etapas que ocorrem em uma sequência temporal. Em primeiro lugar, em resposta a sinais ambientais e endógenos, a planta alterna de crescimento vegetativo para crescimento reprodutivo, o processo é controlado por um grande grupo de genes de tempo de florescência (Zhou *et al.*, 2007). Em segundo lugar, os sinais provenientes das diferentes vias de tempo de floração são integrados e conduzem a ativação de um pequeno grupo de genes que especificam identidade de meristema floral (Simon *et al.*, 1996). Em seguida, os genes de identidade de meristema ativam os genes de identidade de órgãos florais em regiões específicas da flor (Pelaz *et al.*, 2000). Em quarto lugar, os genes de identidade de órgãos florais ativam à jusante, genes de órgãos de formação que especificam os vários tipos de células e tecidos que constituem os quatro órgãos florais (Jack, 2004).

Os genes que regulam o tempo de florescimento funcionam em quatro principais vias de promoção: fotoperíodo, giberelinas (GA), vias autônomas, vernalização e envelhecimento (Khan *et al.*, 2014).

Mutantes na via de promoção de fotoperíodo de dias longos são de floração tardia, quando cultivados em fotoperíodos de dias longos. Foi proposto que estes mutantes participam de uma via que promove a floração especificamente em resposta aos dias longos. Os genes *CONSTANS* (CO) e *FLOWERING LOCUS T* (FT) têm papéis importantes nessa via de regulação. Estes genes são expressos no tecido vascular das folhas, e isto é consistente com experiências fisiológicas que mostraram que a percepção do fotoperíodo ocorre nas folhas. Muitos genes de dias longos codificam vias de proteínas envolvidas na percepção da luz, por exemplo, *PHYTOCHROME* (PHY), e *CRYPTOCHROME* (CRY) ou componentes do relógio circadiano, como *GIGANTEA* (GI) e *EARLY FLOWERING 3* (ELF3) (Hayama e Coupland, 2004). Os componentes do relógio levam à ativação de CO. Já mutantes *co*, são de floração tardia em fotoperíodos de dias longos (Andrés e Coupland, 2012).

Uma segunda via para a promoção do florescimento envolve as GAs. Mutantes com defeito na biossíntese de GAs tais como GA1, exibem atrasos significativos no período de floração quando cultivados em dias curtos, mas não em dias longos, o que sugere que GA é um estimulador importante da floração na ausência de dia longo (Mutasa-Göttgens e Hedden, 2009).

Genes da via autônoma controlam a floração de forma independente de fotoperíodo. Como uma planta de dia longo facultativa, as flores de *Arabidopsis*, por exemplo, florescem mais rapidamente quando cultivadas em dias longos, mas também florescem eventualmente, quando cultivada em dias com fotoperíodos

curtos não indutivos. A quarta via, e um dos principais caminhos de indução do florescimento é a vernalização. Um tratamento prolongado de frio (vernalização) que imita a hibernação, estimula a floração em vários acessos de *Arabidopsis* (Andrés e Coupland, 2012).

A via de envelhecimento foi recentemente identificada, esta via afeta o tempo de floração de duas maneiras: inibindo a atividade de repressores do florescimento, e regulando as vias de integração de sinais e reguladores de identidade de meristemas. As via de envelhecimento é associada à atividade dos microRNAs (miR156 e miR172) em resposta a estímulos endógenos (Khan *et al.*, 2014).

Os genes de identidade de meristema podem ser divididos em duas sub-classes: os genes de identidade de meristema e os genes de identidade de órgãos florais. Os genes que codificam fatores de transcrição que se ligam ao DNA e regulam a expressão dos componentes-chave dessa via pertencem a classe MADS-box (Pelaz *et al.*, 2000). Genes de identidade de meristema, tais como *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) especificam o meristema apical como indeterminado e não florais (Danilevskaya *et al.*, 2010).

A segunda subclasse, os genes de identidade do meristema floral, especificam meristemas laterais em *Arabidopsis* para o desenvolvimento de flores, em vez de folhas ou brotos. Em *Arabidopsis*, *LEAFY* (*LFY*) e *APETALA1* (*AP1*) especificam o primórdio lateral para o desenvolvimento de flores em vez de brotos. Ambos mutantes simples *lfy* e *ap1* exibem uma conversão parcial de flores para a parte aérea. (Bowman *et al.*, 1993).

Sinais das cinco vias de indução floral são integrados pelos fatores de transcrição FLOWERING LOCUS C (FLC), SUPPRESSOR OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1), FT, e LFY. (Jack, 2004; Khan *et al.*, 2014).

As ferramentas disponíveis atualmente para isolamento e purificação de proteínas em larga escala a partir de extratos de plantas, como a proteômica e espectrometria de massas, têm o potencial para identificar componentes bioquímicos complexos, como os fatores de transcrição floral, um desafio importante para o futuro é caracterizar tais fatores na ativação/repressão da transcrição em vários órgãos e em diferentes fases de desenvolvimento.

## 2.2 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea perene que se desenvolve em forma de touceira, sendo a parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências, e a subterrânea formada por raízes e rizoma (Araldi *et al.*, 2010). A planta possui metabolismo de carbono C4, sendo considerada muito eficiente na conversão de energia luminosa em biomassa (Rodrigues, 1995).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana como uma produção no bênio 2015/2016 foi de 665,6 milhões de toneladas de colmos industrializáveis. A maior parte desta produção foi destinada à geração de Etanol, 30,5 bi de litros, seguido do açúcar, 33,5 mi ton. A região Sudeste é responsável por 65,6% dessa produção, enquanto que o nordeste contribui com 6,8% (CONAB, 2016).

As cultivares de cana-de-açúcar constituem um complexo poliploide e aneuploide (Grivet e Arruda, 2001) e são oriundas da recombinação entre diferentes híbridos derivados de duas espécies altamente poliploides, *S. officinarum* ( $x = 10$ ,  $2n = 8x = 80$ ) e *S. spontaneum* ( $x = 8$ ,  $2n = 5-16x = 40-128$ ).

Usualmente, apresentam entre 100 e 130 cromossomos, dos quais 70-80% derivados de *S. officinarum*, 10-20% de *S. spontaneum* e aproximadamente 10% são recombinantes entre as duas espécies (D'Hont *et al.*, 1996; Jannoo *et al.*, 2004).

Muito bem adaptada a regiões de clima tropical, como o Brasil, a cultura necessita de condições edafoclimáticas adequadas para seu pleno desenvolvimento, dentre as quais está uma disponibilidade hídrica em torno de 1200 a 2500 mm durante o ciclo de cultivo (Doorenbos e Kassam, 1979; Singh *et al.*, 2007). Entretanto, muitas vezes não é possível assegurar tais condições adequadas em campo. Com maiores frequências de seca e mudanças climáticas, a produção da cana-de-açúcar vem sofrendo sérios prejuízos e o desenvolvimento de variedades mais adaptadas às constantes alterações no ambiente tem sido o grande desafio dos programas de melhoramento genético (Silva *et al.*, 2008; Cardozo e Sentelhas, 2013).

Dentre os problemas ocasionados pelas mudanças ambientais na produção da cana, tem ganhado destaque o florescimento precoce. Apesar da importância do florescimento para cruzamentos pelos programas de melhoramento genético e obtenção de novas variedades com características desejáveis ao cultivo, sua ocorrência na produção comercial traz prejuízos substanciais, com perdas em torno de 45% de sacarose por tonelada de cana (Gururaja e Kumar, 2003; Barbieri e Silva, 2011). Além disso, quando acompanhada de intensa isoporização do parênquima do colmo, leva à redução na qualidade da matéria-prima, sob o ponto de vista agroindustrial (Leite e Crusciol, 2008).

### 2.3 O florescimento da cana-de-açúcar

Inicialmente, para que ocorra a indução do florescimento da cana, devem ser detectados vários estímulos para que o meristema apical se modifique, deixando de produzir folhas e colmos e passando a formar a inflorescência (Barbieri e Silva, 2011). O florescimento da cana-de-açúcar é controlado por um complexo de fatores climáticos e genotípicos, envolvendo, principalmente, o fotoperíodo, temperatura, umidade e nutrição (Moore, 1987; Glassop *et al.*, 2014).

Dentre esses fatores, o fotoperíodo é um dos mais importantes na indução e posterior diferenciação de meristema vegetativo para floral (Berding e Hurney, 2005). A cana-de-açúcar floresce num período em que a duração do dia diminuiu abaixo do seu fotoperíodo crítico que é de 12,5 h, sendo considerada, portanto uma planta de dia curto (PDC) (Moore e Berding, 2014). Além disso, antes da floração a planta necessita de um período de crescimento (fase juvenil) para que desenvolva entrenós maduros e em número suficiente, entre 2-4 entrenós, dependendo da variedade, como uma sinalização para a indução floral (Rodrigues, 1995).

A temperatura do ar também é um fator que interfere sensivelmente no florescimento da cana, temperaturas entre 18 e 31 °C são indutivas para a cultura, enquanto que fora dessa faixa observa-se atraso no florescimento e diminuição na emissão panículas (Araldi *et al.*, 2010).

O efeito da nutrição da cana sobre o florescimento também tem sido estudado, por exemplo, níveis de nitrogênio em demasia podem atrasar a floração (Clements e Awada, 1967; Nuss e Berding, 1999), a aplicação de fosfato parece reduzir a floração (Gosnell, 1973) enquanto que altos níveis de potássio aumentam a emergência e a viabilidade das panículas (Brunkhorst, 2001). Já o

cálcio foi associado ao atraso e diminuição do florescimento através de aplicação foliar em regiões próximas ao meristema, o que fez sua concentração aumentar e a de potássio diminuir (Endres *et al.*, 2015). Tal alteração pode afetar o carregamento e transporte de carboidratos através do floema (Huber e Moreland, 1981; Lemoine *et al.*, 2013) e influenciar negativamente o desenvolvimento da floração.

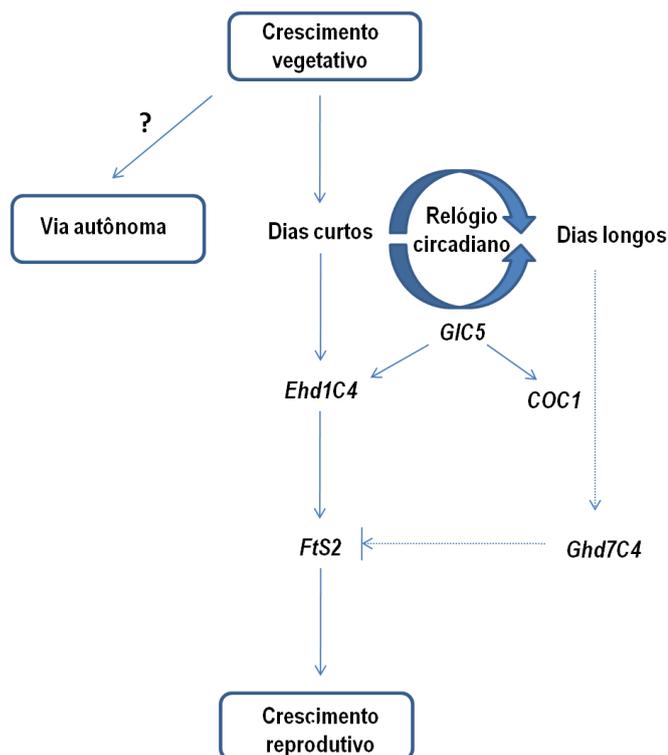
Atualmente o controle do florescimento da cana tem sido realizado principalmente com o uso de compostos à base de etileno (Moore e Osgood 1989; Donaldson, 1996). Isso tem ajudado a minimizar o problema do florescimento precoce. Entretanto, uma pesquisa recente demonstrou que a aplicação foliar de cálcio atingiu resultados satisfatórios no sentido de auxiliar na resolução do problema (Endres *et al.*, 2015).

Quanto à base molecular do desenvolvimento da inflorescência há pouca informação disponível para cana-de-açúcar. A conclusão do sequenciamento completo do genoma de culturas como o arroz e o milho, também tem auxiliado na compreensão da maioria dos genes e fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação do florescimento em gramíneas (Ciaffi *et al.*, 2011). Apesar dos estudos com a eudicotiledônea *A. thaliana* também terem elucidado uma abundância de informações sobre o controle genético e molecular da floração, o que se observa é uma rede complexa de genes e vias, das quais algumas são comuns às encontradas em gramíneas. Por outro lado, foi demonstrado que gramíneas também desenvolveram mecanismos únicos para regular a floração (Colasanti e Coneva, 2009).

O maior avanço para a cana-de-açúcar foi o início de diversas pesquisas que culminaram na formação do banco de dados de sequências transcritas

expressas da cana-de-açúcar, projeto SUCEST (Figueiredo *et al.*, 2001; Vettore *et al.*, 2003). O grande número de informações levantadas por esses estudos trouxeram a tona vários genes candidatos específicos envolvidos com o florescimento, como por exemplo, a descoberta da presença de 21 genes pertencentes à classe MADS-box (Dornelas e Rodriguez, 2001).

Com base nesse banco de dados, Coelho *et al.* (2013) propuseram um modelo da via de indução fotoperiódica em cana, comparando sequências transcritas expressas (ESTs) com transcritos de genes envolvidos na floração de gramíneas, onde foi notado alta similaridade de sequências dos genes *GIGANTEA (GI)*, envolvido na integração de sinais do relógio circadiano em milho e *FLOWERING LOCUS T (FT)* de arroz, que codifica uma proteína sintetizada na folha e que é transportada pelo floema até o SAM, considerada um florigeno (Figura 3). Em outro estudo, Coelho *et al.* (2014), testaram dois membros da família de proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina (PEBP) *FT* e *TFL1* de cana em *Arabidopsis thaliana* e demonstraram que tais proteínas alteraram o tempo de floração e a arquitetura floral nesta espécie.



**Figura 4.** Modelo hipotético da via fotoperiódica de indução floral da cana-de-açúcar. Gigantea (GI), Constans (CO), Flowering locus T (FT), Grain number, Plant Height and Heading Date7 (GHD7) e Early Heading Date1 (EHD1). Cada elemento da via corresponde à EST-contig selecionados através da caracterização *in silico* dos prováveis genes de tempo de floração. (adaptado de Coelho *et al.*, 2013).

## 2.4 Proteômica

A proteômica vem sendo definida como a análise do conjunto de proteínas presentes em tecidos, células ou compartimentos subcelulares, usada para identificar proteínas diferencialmente expressas e potencialmente relacionadas a processos biológicos, ou para fins tão complexos quanto a caracterização de modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (van Wijk, 2001).

Na era pós-genômica, a proteômica posiciona-se no centro da genômica funcional para estudar a função do gene. A grande vantagem da proteômica é sua viabilidade para analisar as mudanças que ocorrem a nível de proteína e que não

podem ser previstos a partir da genômica (Park, 2004; Cánovas *et al.*, 2004) e também pela maior proximidade do fenótipo.

O proteoma de uma célula é dinâmico, e reflete o ambiente imediato em que é estudado. Em resposta a estímulos internos ou externos, as proteínas podem ser alteradas por modificações pós-traducionais, serem submetidas à translocações no interior da célula, serem sintetizadas ou degradadas. Assim, do proteoma analisa uma proteína ou conjunto de proteínas, instantaneamente em uma determinada condição ambiental e/ou momento (Graves e Haystead, 2002).

O principal objetivo da proteômica é estudar, conhecer e compreender "como", "onde", "quando" e "para quê" as várias centenas de milhares de proteínas produzidas em um organismo vivo, interagem entre si e com outras moléculas para construir o edifício celular, e como elas podem ser trabalhadas e modificadas, a fim de se encaixar com o crescimento e desenvolvimento programado de modo a responder e interagir ao seu ambiente biótico e abiótico (Jorrín-Novo *et al.*, 2015).

Tais objetivos certamente exigem a participação de outros ramos da biologia, como a biologia molecular, bioquímica e bioinformática (Graves e Haystead, 2002).

#### **2.4.1 Eletroforese bidimensional 2D-PAGE**

A análise do proteoma é mais frequentemente realizada por uma combinação de 2D-PAGE e Espectrometria de Massas (MS). A eletroforese em gel de poliacrilamida bi-dimensional (2D-PAGE) baseia-se na combinação de duas técnicas de separação ortogonais. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas por seu ponto isoelétrico (pI), por uma técnica conhecida como

focalização isoelétrica (IEF). Há duas variantes importantes na IEF, que são os carregadores de anfóteros à base de IEF e gradiente de pH imobilizado (IPG) à base de IEF. Na segunda dimensão, as proteínas são ainda separadas por sua mobilidade eletroforética utilizando SDS-PAGE. Finalmente, as proteínas podem ser visualizadas e quantificadas por coloração de diferentes procedimentos, como coomassie, prata, ou coloração por fluorescência (May *et al.*, 2012).

Na análise proteômica à base de gel 2D-PAGE, a etapa de eletroforese em gel 2D representa a carga de trabalho essencial de todo o processo. É neste passo que a análise quantitativa é realizada, a qual é normalmente usada para efetuar a seleção de spots diferencialmente expressos (DEPs). Isto tem consequências importantes para a análise de espectrometria de massas (Rabilloud e Lelong, 2011).

#### **2.4.2 Espectrometria de Massas (MS)**

Proteínas são identificadas pelas razões massa-carga  $m/z$  de peptídeos e pela separação de seus fragmentos. Assim, tanto a precisão e a sensibilidade de uma análise de espectrometria de massas dependem de uma separação bi-dimensional eficiente (Yates, *et al.*, 2009).

Medições de espectrometria de massas são efetuadas em fase gasosa sobre analitos ionizados. Por definição, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massa, que mede a relação massa-para-carga ( $m/z$ ) dos analitos ionizados, e um detector, que registra o número de íons de cada valor de  $m/z$ . Ionização por eletrospray (ESI) e ionização por laser assistida por matriz de dessorção (MALDI) são as duas técnicas mais utilizadas para ionizar e volatilizar as proteínas ou peptídeos para análise por

espectrometria de massas (Cantú *et al.*, 2008) . ESI ioniza analitos para fora de uma solução, sendo facilmente acoplada à base líquida (por exemplo, ferramentas de separação cromatográfica e eletroforética). MALDI sublima e ioniza as amostras de uma matriz cristalina seca através de pulsos de laser (Medzihradzsky *et al.*, 2000).

MALDI é acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo íon-trap e a analisadores do tipo time of flight (TOF), denominado de MALDI-TOF ou MALDI TOF-TOF. Primeiro, envolve a separação por célula de colisão (instrumento TOF-TOF), e no segundo, no instrumento híbrido (TOF quadrupolo), a célula de colisão é inserida entre um filtro de massa de quadrupolo e um analisador TOF. Estes instrumentos têm alta sensibilidade, resolução e precisão em massa, e o instrumento quadrupolo TOF pode ser usado de forma intercambiável com uma fonte de ionização ESI (Aebersold e Mann, 2003).

### **2.3.3 Proteômica de Plantas**

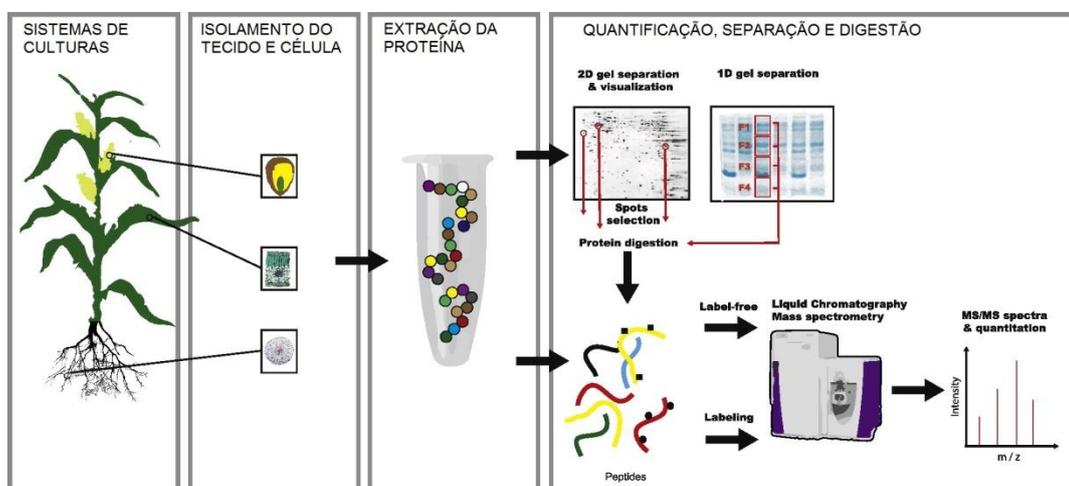
O sequenciamento completo do genoma de várias espécies de plantas permitiu a análise global da expressão gênica, oferecendo inúmeras pistas sobre a função biológica e seu envolvimento nos processos biológicos (Balbuena *et al.*, 2011).

Isso tem permitido avanços na análise proteômica de espécies de importância econômica, em especial as gramíneas, como milho, arroz, trigo e sorgo. Atualmente a proteômica é uma ferramenta valiosa para estudar a função biológica de proteínas de plantas (Jorrín-Novo *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos tem se concentrado na criação de perfis proteômicos e modificações de proteínas em espécies de plantas modelo

(Baerenfaller *et al.*, 2008), mas também tem sido muito utilizado para investigar a dinâmica de proteínas durante a resposta das plantas aos estresses bióticos (Lodha *et al.*, 2013) e abióticos (Barkla *et al.*, 2013).

O potencial da análise proteômica para plantas cultivadas no desenvolvimento de novos marcadores para melhoramento de culturas ainda não foi completamente realizado, no entanto, podem ser úteis para diagnosticar locos de características quantitativas ou apontar elementos cis-regulatórios de interesse (Vanderschuren *et al.*, 2013). Esse conceito foi inicialmente introduzido com a análise do proteoma em larga escala de órgãos de *Arabidopsis* (Baerenfaller *et al.*, 2008). A identificação de proteínas associadas à resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos, são candidatas para uso como biomarcadores fiáveis para o melhoramento de culturas (Figura 4). Os estudos de proteômica comparativa, têm fornecido uma abundância de informações com potencial significativo para programas avançados de melhoramento. Mas se faz necessário a coordenação e padronização dos esforços em proteômica, bem como, curadoria de alta qualidade de bancos de dados de proteínas de espécies cultivadas (Vanderschuren *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Fluxo de trabalho de proteômica de plantas a partir de amostragem de plantas para melhoramento genético de culturas. (adaptado de Vanderschuren *et al.*, 2013)

Pesquisas têm usado a proteômica para investigar proteínas envolvidas com o florescimento, por exemplo, Chen *et al.* (2009) analisaram botões florais de longana (*Dimocarpus longan*) e concluíram que as proteínas identificadas forneceram informações valiosas sobre a base molecular da reversão floral nesta espécie. Em *Dendrocalamus hamiltonii*, 128 DEPs foram identificados a partir de abordagem 2D-PAGE (Kaur *et al.*, 2015) e a maioria das proteínas identificadas foram anotadas como envolvidas com a indução do florescimento do bambu.

No caso da cana-de-açúcar os estudos proteômicos têm priorizado análises comparativas sob estresses bióticos e abióticos em amostras de folhas (Jangpromma *et al.*, 2010; Almeida, 2015, Souza, 2015), colmos (Amalraj *et al.*, 2010), raízes (Pacheco *et al.*, 2013) e brotos (Santos *et al.*, 2010). Na literatura até o momento, inexistem trabalhos que analisaram o meristema apical da cana por abordagem proteômica, com exceção do estudo realizado por (Duarte, 2009), onde foi obtido padrões de géis 2D-PAGE para meristemas do ápice da cana, entretanto sem a identificação das proteínas.

De acordo com Barnabas *et al.* (2015), a maior limitação para a proteômica de cana-de-açúcar atualmente é o pequeno número de proteínas disponíveis em bancos de dados. Para o autor, a criação de um banco de dados abrangente e integrado com informações sobre proteomas de cana sem dúvida traria contribuições significantes para a anotação do genoma da cana, assim como ocorre em *Arabidopsis*.

## **2.5 Cálcio nas plantas e no florescimento**

O cálcio  $\text{Ca}^{2+}$  é um nutriente essencial para as plantas. É necessário para as funções estruturais da parede celular e membranas e atua como mensageiro

secundário no citosol (White e Broadley, 2003). Ao examinar a quantidade total de  $\text{Ca}^{2+}$  numa célula observa-se concentração abundante, aproximadamente 10 mM (Hepler e Winship, 2010), porém sua exigência é a de um micronutriente. Estudos revelam que várias moléculas não proteicas servem como mensageiros em sinais de transmissão para a maquinaria celular em plantas (Hepler, 2005), e dentre essas moléculas está o  $\text{Ca}^{2+}$ .

O  $\text{Ca}^{2+}$  é tomado pela planta de forma passiva. É transportado pelo fluxo de água via xilema. Assim, órgãos que transpiram, como frutas, tubérculos, folhas, flores, etc. são as mais afetadas pelos sintomas de deficiência de cálcio. Níveis mais altos de cálcio são necessários quando a concentração dos elementos  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  está elevada (antagonismo), sob limitação do crescimento radicular, ou devido à temperatura e umidade no solo, seca e salinidade (Jha, 2006)

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  tem um papel vital na mediação de respostas moleculares aos estímulos externos seja de origem abiótica, luz, frio, calor, movimento, hipoxia e seca (Knight e Knight, 2001; Kaur e Gupta, 2005) ou origem biótica, fitormônios, patógenos, interações com simbiontes (Dodd *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que canais de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  vacuolar podem participar de múltiplas vias de sinalização em plantas superiores (White, 2000) (Figura 5).

A modulação de proteínas de ligação celular dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como a calmodulina (CaM) é um das mais bem caracterizadas (Jha, 2006). Está bem documentado que o  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido nas vias de transdução induzida pela luz (fitocromo) em plantas superiores (Neuhaus *et al.*, 1994; Frohnmeyer *et al.*, 1998; Tretyan *et al.*, 1999).



durante o crescimento, e em resposta a uma vasta gama de estímulos ambientais e de desenvolvimento em plantas (Jaworski *et al.*, 2012)

As CDPKs são capazes de converter sinais  $[Ca^{2+}]$  citosólico em consequências bioquímicas e genéticas, através da fosforilação de diversas proteínas-alvo, incluindo transportadores de solutos de membrana ( $Ca^{2+}$  - ATPase, AtACA2), canais de íons e água, oxidases de NADPH, enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e do metabolismo do nitrogênio, as proteínas do citoesqueleto, proteases e proteínas de ligação ao DNA (Cheng *et al.*, 2002). CDPKs estão implicadas no desenvolvimento do pólen, no controle do ciclo celular, na transdução de sinal a fito hormônios, na regulação da expressão do gene em resposta à luz, gravitropismo, nodulação, aclimatação ao frio, tolerância à salinidade, tolerância à seca e respostas a agentes patogênicos (White e Broadley, 2003).

Friedman *et al.* (1989) investigando o envolvimento do cálcio no processo de indução floral em *Pharbitis nil*, uma planta de dia curto, em resposta ao fotoperíodo, sugeriram que os moduladores de  $Ca^{2+}$  afetam a indução floral através de algum efeito sobre o ritmo endógeno da planta. Também foi sugerida a influencia de uma proteína quinase de ligação cálcio/calmodulina como responsável pelo atraso do florescimento e extensão do período vegetativo de tabaco (Hua *et al.*, 2004).

Além disso, tem sido relatado que o cálcio possui um papel fisiológico fundamental na sinalização e regulação durante a reprodução sexual em plantas, e que a elevação da quantidade de cálcio é uma previsão exata da fertilidade das plantas (Zienkiewicz *et al.*, 2011). O pólen geralmente requer cálcio para a germinação. Tem sido sugerido que o cálcio possua alguma função na

determinação da direção do alongamento do tubo polínico, além disso, interações entre gametas e gametófitos masculinos e femininos envolvem diferentes formas de cálcio, ocorrem em diferentes escalas de organização e requerem diferentes formas de regulação de cálcio em cada fase (Steinhorst e Kudla, 2013). No ovário e óvulo, uma abundância de sinais de receptividade de cálcio, fornece nutrição mineral essencial, e guia o tubo polínico, em algumas plantas. A fusão de gametas de plantas *in vitro* também apresentaram oscilações de cálcio no zigoto e no endosperma durante a fertilização (Ge *et al.*, 2007).

Com a conclusão das sequências do genoma de *Arabidopsis* tornou-se evidente que as plantas possuem uma grande quantidade de proteínas vinculadas ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Reddy e Reddy, 2004). O uso de técnicas moleculares em conjunto com a espectrometria de massas permite identificar proteínas, funções e mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  medeia uma variedade de respostas celulares que já estão sendo desvendadas em plantas (He *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2014; Černý *et al.*, 2015).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Identificar proteínas e peptídeos diferencialmente expressos no meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob aplicação de cálcio.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Detectar possíveis alterações anatômicas e morfofisiológicas influenciadas pela aplicação de cálcio.
2. Obter perfis de eletroforese (1D e 2D-PAGE) para a pré e pós-indução do florescimento.
3. Selecionar peptídeos com acúmulo diferencial no meristema apical potencialmente associados à inibição do florescimento.
4. Identificar e anotar presumivelmente os peptídeos selecionados através de espectrometria de massas (MS), de modo a inferir possíveis mecanismos fisiológicos e moleculares de inibição do florescimento.

## 4. CAPÍTULO I

### **Efeito da aplicação foliar de cálcio na morfologia e fisiologia da floração da cana-de-açúcar**

Romel Duarte Viela<sup>1</sup>, Laurício Endres<sup>2</sup>, Katia Castanho Scortecci<sup>3</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup>Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

A ser submetido à revista **Theoretical and Experimental Plant Physiology**

## Resumo

A floração é uma etapa fundamental para o melhoramento da cana-de-açúcar, pois é através do cruzamento entre clones floridos que se obtêm novas variedades com características desejáveis para a cultura. Por outro lado, do ponto de vista comercial sua ocorrência é prejudicial para a produção por desviar a sacarose estocada no colmo para o desenvolvimento dos órgãos florais. Diante disso, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da aplicação foliar de cálcio em aspectos morfofisiológicos e anatômicos relacionados ao florescimento da variedade de cana-de-açúcar RB867515. Para tanto, aplicou-se sulfato de cálcio na folha da cana e foram analisados os parâmetros morfofisiológicos: altura de colmos, número de entrenós por colmo, comprimento e largura da folha +3; trocas gasosas: fotossíntese (*A*), transpiração (*E*) e condutância estomática (*gs*); concentração dos macronutrientes Ca, S, K, Mg e P do meristema; e anatomia do ápice meristemático por microscopia ótica. A aplicação foliar de cálcio alterou a abertura estomática, aumentando a taxa de transpiração e diminuição da condutância estomática, porém sem alterar a fotossíntese. A composição de macronutrientes mostrou maiores níveis de cálcio e menores teores de potássio e magnésio. Tais alterações resultaram na redução de 35% no florescimento da cana-de-açúcar e em colmos maiores no final da floração. Além disso, a análise anatômica apontou para o acúmulo de lignina no meristema. Nossos dados trazem alguns indícios que apontam para um suposto envolvimento da aplicação foliar de cálcio na redução do florescimento da cana-de-açúcar,

Palavras-chave: Adubação foliar, Cálcio, Anatomia, *Saccharum*, Redução do florescimento da cana.

## Abstract

Flowering is a fundamental step for sugarcane improvement, it is through the cross between flowering clones, that are obtained new varieties with desirable characteristics for culture. On the other hand, commercially its occurrence is detrimental to production, by diverting stalk sucrose to development of floral organs. Thus, this study aimed to investigate the effect of foliar application of calcium in morphophysiological and anatomical aspects related to flowering of the RB867515 sugarcane variety. To this end, it applied calcium sulfate in the sugarcane leaf and Morphophysiological parameters were analyzed: stalk height, internode number per stalks, length and width of the leaf +3; gas exchanges: photosynthesis (A), transpiration (E) and stomatal conductance (gs); macronutrient contents Ca, S, K, Mg and P in meristem; and anatomy of the shoot apical meristem by optical microscopy. Foliar calcium applications alters stomatal opening, increasing transpiration rate and decreased stomatal conductance, but without changing photosynthesis. The macronutrient composition showed higher calcium levels and lower levels of potassium and magnesium. These changes resulted in a reduction of 35% in the flowering of sugarcane and larger culms at the end of flowering. Furthermore, the anatomical analysis suggested lignin accumulation in the meristem. Our data provide some evidence pointing to an alleged involvement of foliar application of calcium in reducing the flowering of sugarcane,

**Key words:** Calcium, Foliar fertilization, Anatomy, *Saccharum*, Sugarcane flowering reduction.

## Introdução

A floração é uma etapa importante para o melhoramento da cana-de-açúcar, é nesse período que são realizados os cruzamentos entre clones para a obtenção de novas variedades com características desejáveis para a cultura. Por outro lado, do ponto de vista comercial sua ocorrência em campo é economicamente prejudicial. A indução do florescimento da cana desvia a sacarose estocada no colmo para o fornecimento de energia, a qual é usada no desenvolvimento dos órgãos florais. Como consequência, o crescimento da planta é paralisado, ocorrendo aumento no teor de fibras e perdas no rendimento de sacarose por tonelada de cana (Rao e Kumar, 2003; Barbieri e Silva, 2011; Moore e Berding, 2014).

Na cana-de-açúcar, o florescimento é controlado por um complexo de fatores climáticos e genéticos, que envolvem principalmente, fotoperíodo, temperatura, umidade e nutrição (Moore, 1987), e os efeitos destes na regulação da expressão gênica. A combinação desses fatores é fundamental para a indução e posterior diferenciação de meristema vegetativo para floral ou reprodutivo. Dentre esses fatores, o fotoperíodo é um dos mais importantes (Berding e Hurney, 2005). A cana-de-açúcar floresce num período em que a duração do dia é menor do que o seu fotoperíodo crítico que é de 12,5 h, sendo considerada uma planta de dia curto (PDC). Além disso, antes da floração a planta necessita de um período de crescimento para que desenvolva entrenós maduros e em número suficiente, entre 2-4 entrenós, dependendo da variedade, como uma sinalização para a indução floral (Rodrigues, 1995).

A temperatura do ar também é um fator que interfere sensivelmente no florescimento da cana, temperaturas entre 18 e 31°C são indutivas para a cultura,

enquanto que fora dessa faixa observa-se atraso no florescimento e diminuição na emissão panículas (Araldi *et al.*, 2010).

O efeito da nutrição da cana sobre o florescimento também tem sido estudado, por exemplo, níveis de nitrogênio em demasia pode atrasar a floração (Clements and Awada, 1967; Nuss and Berding, 1999), a aplicação de fosfato parece reduzir a floração (Gosnell, 1973) enquanto que altos níveis de potássio aumentam a emergência e a viabilidade das panículas (Brunkhorst, 2001). Já o cálcio foi associado ao atraso e diminuição do florescimento através de aplicação foliar em regiões próximas ao meristema (Endres *et al.*, 2015).

Atualmente o controle do florescimento da cana tem sido realizado principalmente com o uso de compostos à base de etileno (Moore e Osgood 1989; Donaldson, 1996; Wiedenfeld, 2003). Esse tratamento é usado para padronizar a maturação da cultura, reduzindo as perdas sacarose após a indução do florescimento, ao passo que também facilita a programação da colheita no campo. Isso tem ajudado a minimizar o problema do florescimento precoce. Recentemente foi sugerida a aplicação foliar de cálcio no sentido de controlar o florescimento (Endres *et al.*, 2015).

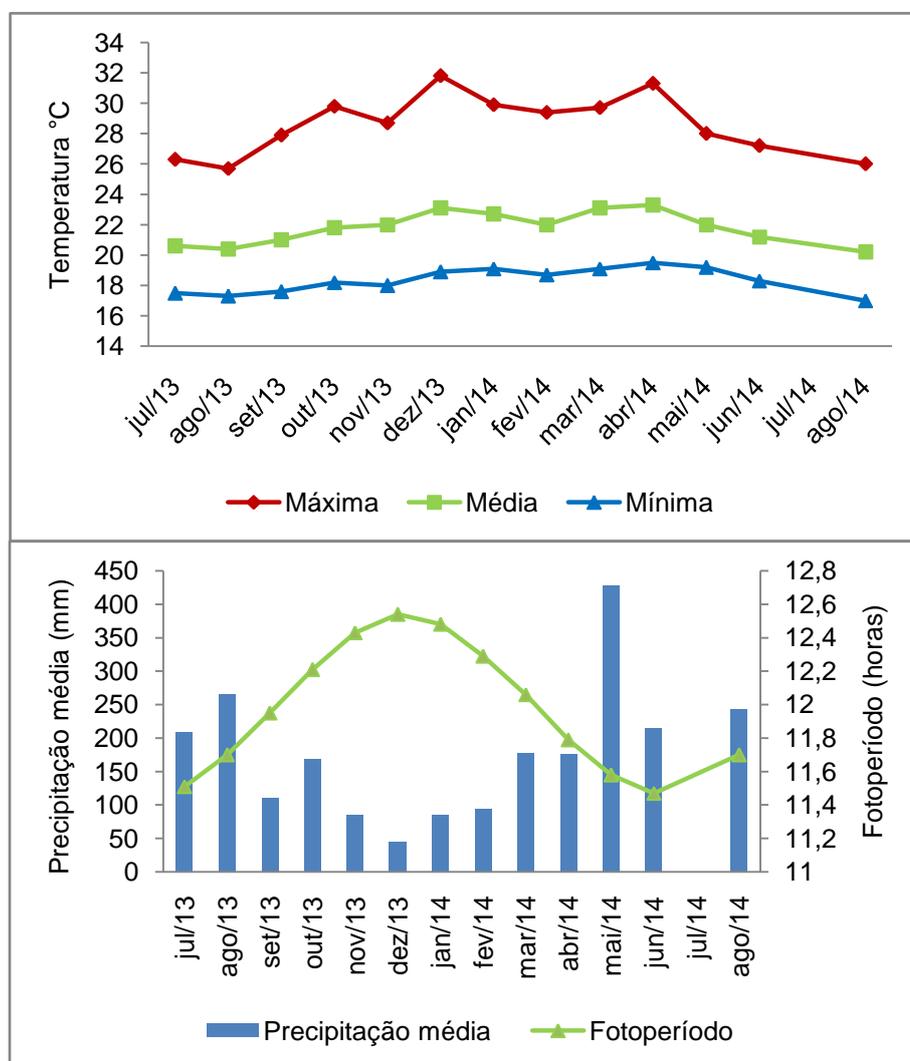
O cálcio é um importante componente da parede celular, o qual é atraído pelas cargas negativas das pectinas formando uma ligação cruzada (Hepler e Winship, 2010). Além disso, o cálcio é um mensageiro secundário e está envolvido com uma série de respostas moleculares a estímulos ambientais, dentre os quais o florescimento (Tretyn *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1989; Zienkiewicz *et al.*, 2011) Apesar do conhecimento disponível sobre os vários mecanismos celulares influenciados pelo cálcio, pouco se sabe sobre o seu efeito no florescimento da cana. Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da

aplicação foliar de cálcio no florescimento e em parâmetros morfofisiológicos da cana antes e após a indução da floração.

## Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em condições de campo na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, Brasil (09° 14' 22" S, 35° 50 11" W ; 480 m de altitude).

Os dados climatológicos foram registrados por estação meteorológica automática localizada a 300 m do experimento (Figura 1). A variedade analisada foi a RB867515, que apresenta florescimento profuso quando cultivada em condições favoráveis ao florescimento, tal como no local do experimento.



**Figura 1.** Médias mensais de temperaturas mínima, média e máxima (A), registradas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, AL (09° 14' 22" S; 35° 50 11" W; 480m de altitude). Precipitação pluviométrica (mm) e fotoperíodo (horas) do 15º dia do mês (B).

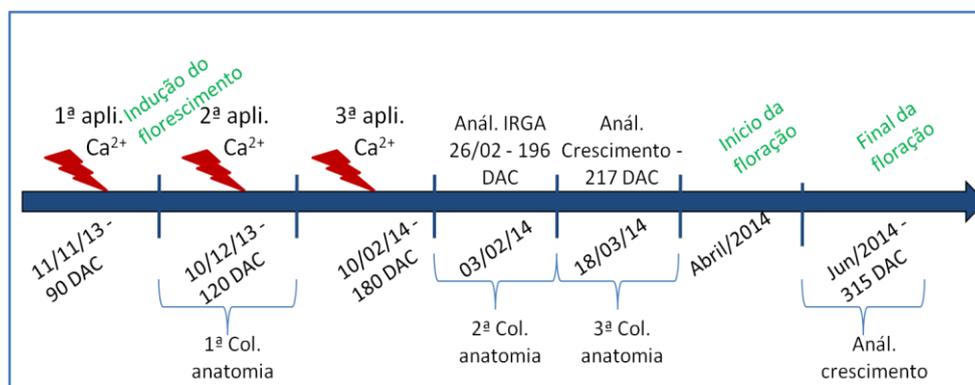
Para testar o efeito do cálcio no florescimento na cana foram montados os seguintes tratamentos:

- Pré e Pós - indução do florescimento sem cálcio - somente adubação convencional;
- Pré e Pós - indução do florescimento - adubação convencional + aplicação foliar de 58,0 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (Cruz, 2010; Endres *et al.*, 2015).

As aplicações foliares de  $\text{CaSO}_4$  foram efetuadas com bomba costal aos 90, 120 e 180 dias após o corte (DAC), cana soca, , pulverizando-se até o ponto de escorrimento (Cunha *et al.*, 2005). Tais períodos antecedem a indução do florescimento na Estação de Floração Serra do Ouro.

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com 20 parcelas. A parcela experimental foi composta por cada touceira, contendo em média 14 colmos/touceira, espaçadas 1,5 x 2,0m.

Foi instalado um sistema de irrigação por micro aspensão durante o experimento, e o controle de plantas daninhas foi realizado através de capina manual.



**Figura 2.** Esquema de aplicação dos tratamentos, coletas e análises morfofisiológicas realizadas durante o experimento no período 2013/2014. Dias após o corte (DAC).



**Figura 3.** Ilustração de etapas do experimento: plantio em caixas (A), aplicação do tratamento no campo com pulverizador costal (B), experimento no campo (C), coleta da região contendo o ápice meristemático da cana-de-açúcar, com destaque em vermelho (D).

A quantificação de colmos florescidos iniciou no dia 09 de abril de 2014. A floração foi avaliada através da observação da emissão total da panícula pelo caule e a percentagem de floração por unidade experimental (touceira) foi determinada pela relação entre o número de colmos com panículas e o número total de colmos x 100.

### **Análises morfofisiológicas e de minerais do meristema**

#### **Fotossíntese (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs)**

O efeito do cálcio em parâmetros morfofisiológicos foi analisado. Aos 217 e 315 DAC, antes e após a emissão de panículas, respectivamente, foram avaliados os parâmetros morfológicos: altura de colmos, número de entrenós por colmos, comprimento e largura da folha +3 nomenclatura de acordo com (van

Dillewijn, 1952) que se refere à terceira folha superior completamente expandida, a partir da primeira folha com a lígula visível, sendo representativa do dossel da cultura, conforme Hermann e Câmara (1999) e Oliveira *et al.* (2007). A altura do colmo foi obtida medindo-se o comprimento da base até a lígula da folha +1, usando uma trena. O diâmetro do colmo foi medido na região mediana com paquímetro.

As medições de fotossíntese líquida ( $A$ ), transpiração ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) foram realizadas com um analisador de gás infravermelho portátil (IRGA modelo LCI da ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). Foi obtida curva analisando os parâmetros  $A$ ,  $E$  e  $g_s$  das 6 h às 14 h em quatro pontos. A análise de trocas gasosas foi efetuada 196 DAC, e as leituras foram feitas com cinco repetições na mesma folha +1.

### **Análise de minerais do meristema**

Os ápices meristemáticos usados na quantificação de minerais foram coletados aos 217 DAC (cana soca), período anterior a floração. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C. Para a determinação dos nutrientes:  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , P,  $K^+$  e S foi realizada inicialmente digestão nitro-perclórica. A quantificação de Ca e Mg foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica, modelo Varian SpetrAA 20. A concentração de P e S foi determinada em espectrofotômetro CELM E-225 D a 725nm e 420 nm respectivamente, e o K foi determinado por fotômetro de chama, modelo Micronal B 462. Todas as análises foram realizadas conforme recomendações de (Silva, 2009).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste *t* de Student usando o software Assistat 7.7 beta (Silva, 2006).

## **Análises Anatômicas**

### **Processamento do material vegetal**

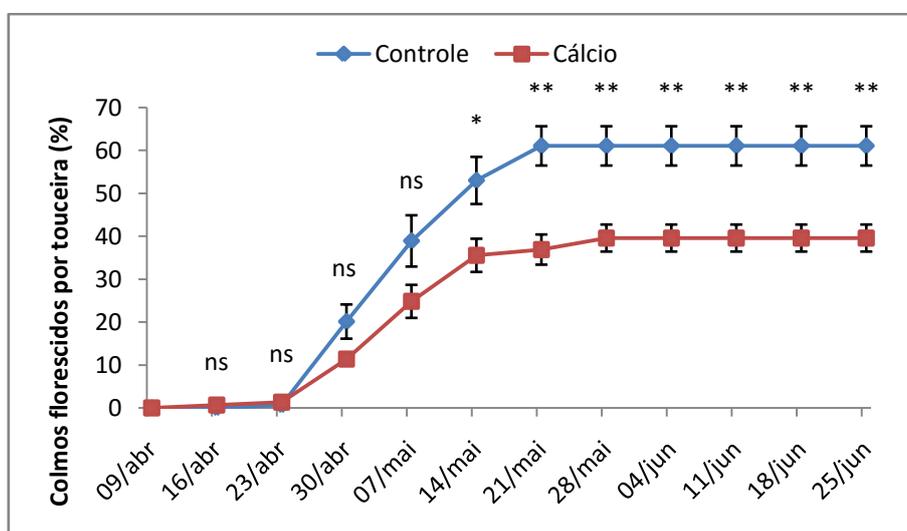
Com o objetivo de analisar possíveis alterações estruturais em regiões meristemáticas apicais submetidas à aplicação foliar de 58 mM de (CaSO<sub>4</sub>), foram coletadas amostras entre os meses de janeiro e fevereiro de 2013 e fevereiro e março de 2014.

Amostras foram coletadas e fixadas em FAA 50 (formaldeído: ácido acético glacial: etanol 50%, na proporção de 1:1:8), desidratadas em série etanólica ascendente (70-100%) e infiltradas em parafina, de acordo com Johansen (1940). O material foi seccionado em micrótomo rotativo para a obtenção de cortes com 5 µm de espessura, os quais foram submetidos ao processo de coloração com safranina (Kraus e Arduin, 1997).

Os cortes foram analisados de modo a compreender as possíveis alterações estruturais decorrentes da aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio. Foi usado o corante safranina, indicador de lignina. Imagens do tecido vegetal foram obtidas através do Microscópio Confocal - Zeiss Examiner Z.1, no Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Antes da utilização do microscópio, foi conferida a iluminação Kohler, a qual garante uma quantidade de luz igualmente distribuída por toda a imagem fotografada. Sendo assim, a intensidade da lâmpada e o tempo de abertura da câmera foram iguais para todas as imagens captadas.

## Resultados

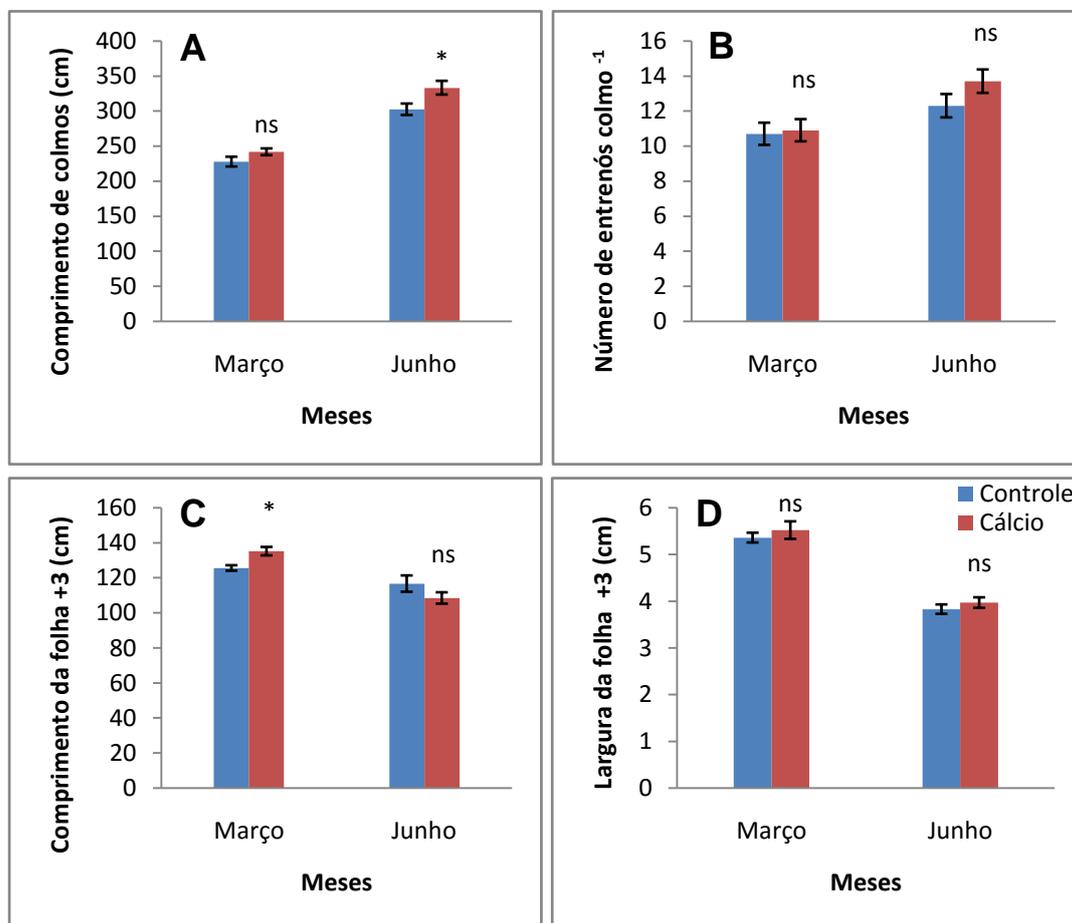
O início da emissão das panículas da cana-de-açúcar ocorreu no mês de abril de 2014, coincidindo com o aumento da umidade e diminuição do fotoperíodo, os quais são fatores comumente indutivos de florescimento em cana (Figura 1). Neste período foi observado um aumento significativo na taxa de floração, seguida por uma estabilização no número de inflorescências no mês de junho. No final do período de floração constatamos que a aplicação foliar de cálcio reduziu em 35% o florescimento da cana (Figura 4).



**Figura 4.** Percentagem de florescimento de colmos da variedade de cana-de-açúcar RB867515 nos meses de abril, maio e junho de 2014, submetidas à aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) aos 90, 130, e 165 dias após o corte, cultivadas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, no município de Murici - Alagoas. Médias no mesmo tempo representadas por \* e \*\* diferem a 5 e 1% de probabilidade pelo *t* de Student. ns - não significativo.

Nas análises dos componentes morfológicos da cana-de-açúcar, notou-se que as plantas tratadas com cálcio apresentaram aumento significativo no comprimento médio de colmos no final da floração (junho) quando comparado às plantas sem cálcio (Figura 5 A). Já o comprimento da folha +3 também foi maior em plantas com cálcio no período anterior à floração, entretanto, em junho esse

parâmetro não diferiu entre os tratamentos (Figura 5 C). O número médio de entrenós e a largura da folha +3 foram sutilmente maiores em folhas tratadas com cálcio, mas sem diferir significativamente do controle (Figura 5).



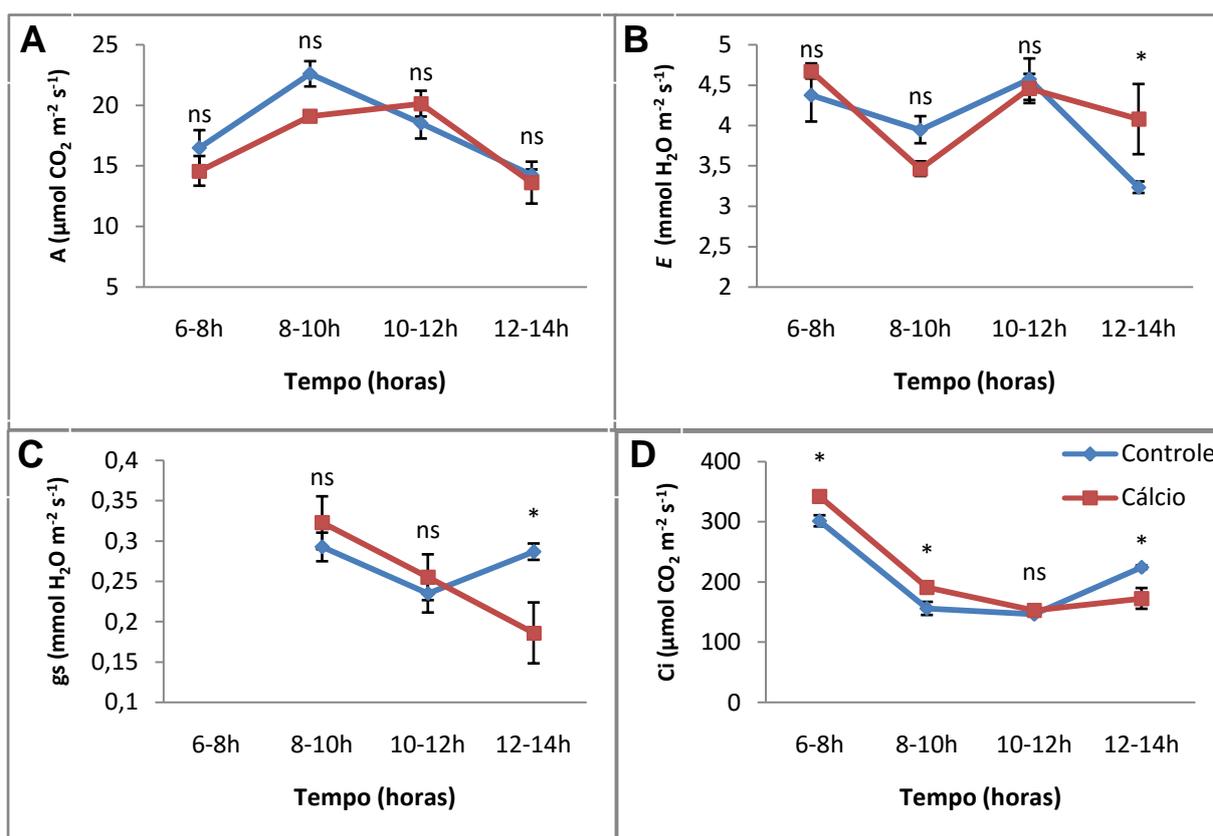
**Figura 5.** Valores médios de comprimento de colmos (A), número de entrenós por colmo (B), comprimento da folha +3 (C) e largura da folha +3 (D) na variedade RB867515, submetidos a aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). As médias comparam os tratamentos no mesmo mês pelo teste *t* de Student a 5 e 1% probabilidade. (n=10).

Na fotossíntese líquida (A), não houve diferença significativa de plantas tratadas com cálcio em relação ao controle, ambos os tratamentos demonstraram um padrão muito parecido nos períodos analisados (Figura 6 A).

Quanto à taxa de transpiração foliar (E), também não foi notada diferença entre os tratamentos até o meio dia, entretanto, após este período plantas que

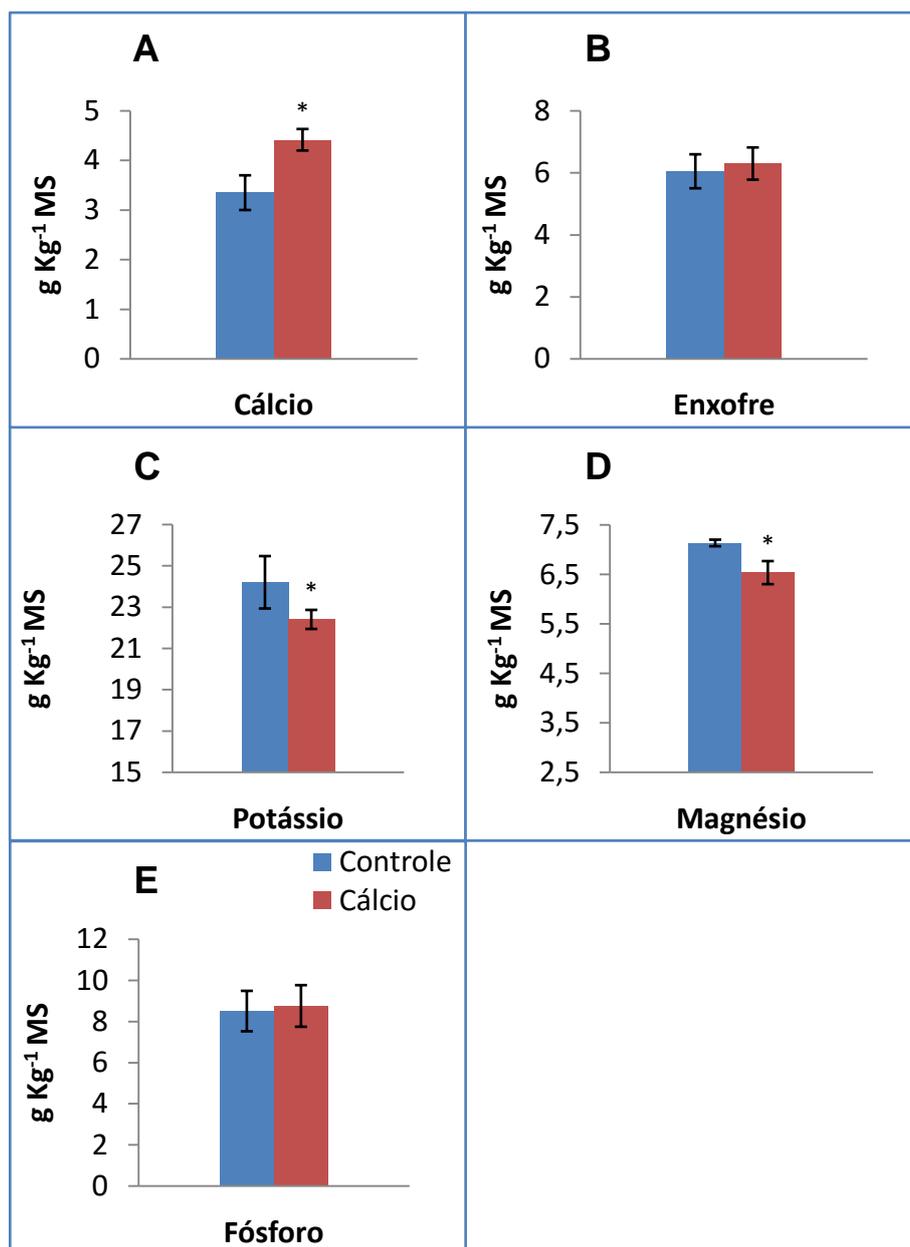
receberam aplicação de cálcio nas folhas transpiraram 20% mais que o controle (Figura 6 B).

Na análise da condutância estomática ( $g_s$ ) iniciada às 6 h da manhã, o equipamento não detectou leituras para todas as plantas analisadas no mesmo tratamento, por isso a (Figura 6 C) não apresenta valores da  $g_s$  nesse horário. Até o meio dia, foi observado que plantas tratadas com cálcio demonstravam  $g_s$  sutilmente superior ao controle, porém sem diferir significativamente. No entanto, após este período, a  $g_s$  em plantas tratadas com cálcio decaiu linearmente enquanto que no controle a  $g_s$  foi aproximadamente 35% maior do que as plantas sem cálcio.



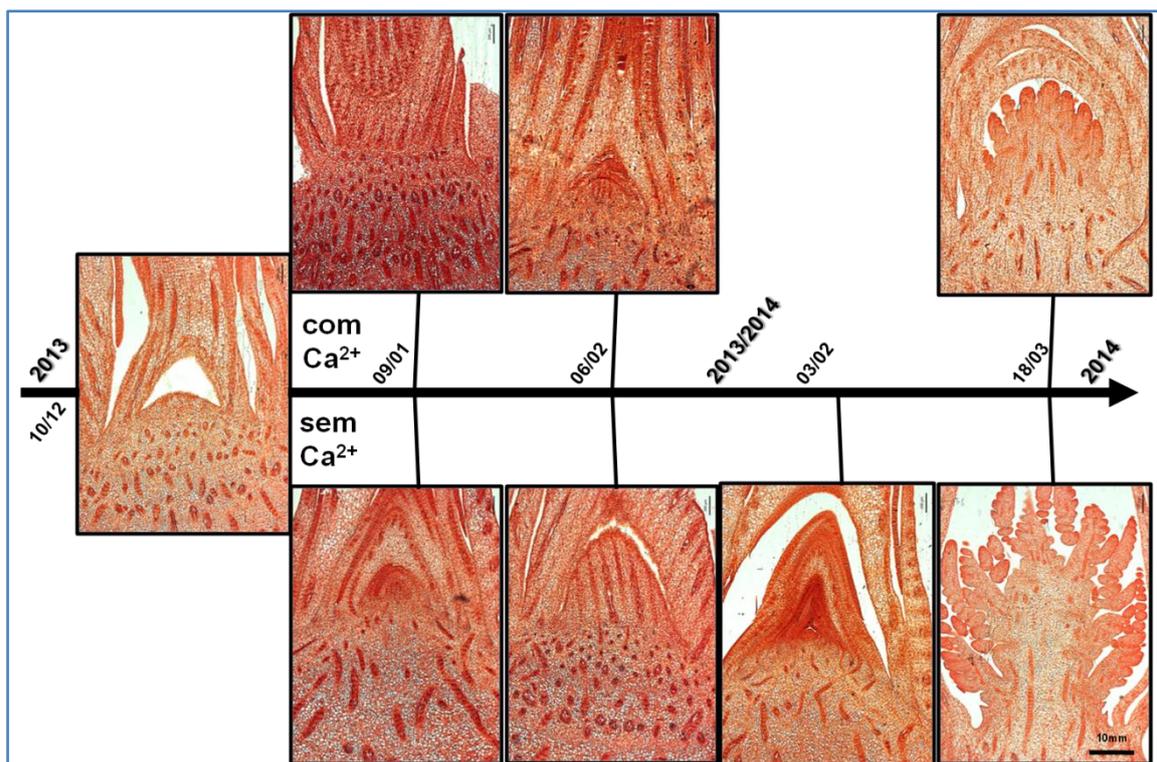
**Figura 6.** Variações diurnas de A fotossíntese (A); E transpiração foliar (B);  $g_s$  condutância estomática (C) e  $C_i$  concentração interna de  $\text{CO}_2$  (D) na variedade de cana RB867515 sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) cultivadas em condições de campo aos 180 dias após a rebrota (cana-soca). As médias comparam os tratamentos controle e cálcio dentro do mesmo tempo a 5% de probabilidade pelo teste  $t$  de Student.

A composição de minerais do meristema sofreu alteração após a aplicação de Ca, os níveis de Ca aumentaram diferindo significativamente de meristemas sem Ca (controle), enquanto que as concentrações de K e Mg diminuíram. Os demais minerais analisados não sofreram mudanças significativas após a aplicação de Ca na folha (Figura 7).



**Figura 7.** Concentração dos macro-nutrientes, cálcio (A), enxofre (B), potássio (C), magnésio (D) e fósforo (E) do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, coletados aos 130 dias após a rebrota (cana-soca) no período anterior à floração, submetida à aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>). As médias comparam os tratamentos controle e cálcio a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

A análise da organização estrutural desse tecido possibilitou uma melhor compreensão, sobre o efeito da aplicação foliar de cálcio na diferenciação do meristema em condições indutivas para o florescimento. Para tanto, análises da anatomia do meristema foram realizadas através da elaboração de lâminas com cortes histológicos em amostras com e sem cálcio, coletadas no período anterior e posterior a indução floral. A análise de histologia com o corante safranina, o qual é indicador de lignina, permitiu boa visualização e diferenciação do meristema apical da cana-de-açúcar. Também foi possível notar em meristemas tratados com cálcio, maior número de vasos quando comparado aos meristemas não tratados (Figura 8). Foi constatado em meristemas com maior teor de cálcio, aumento concentração de lignina no período anterior a floração (09/01/2013). Por outro lado, ao analisar o tratamento sem cálcio no mesmo período, observamos que o meristema já estava induzido. Já em 2014 foi possível notar que a aplicação foliar de cálcio parece atrasar o desenvolvimento da estrutura floral.



**Figura 8.** Análise histológica da secção frontal do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (com  $\text{Ca}^{2+}$ ) e controle (sem  $\text{Ca}^{2+}$ ), aumento 5X, espessura 10  $\mu\text{m}$ , coradas utilizando safranina.

## Discussão

A aplicação foliar de cálcio reduziu o florescimento da cana em 35%, resultado semelhante ao relatado por Endres *et al.* (2015), os quais constataram uma redução superior a 40% e atraso de 21 dias no florescimento da cana testada nas mesmas condições deste estudo.

Este nutriente é considerado um elemento de baixa mobilidade no floema (White, 2003), o que dificultaria sua translocação para regiões de crescimento rápido como o meristema do ápice caulinar. Entretanto, estudos realizados com  $^{45}\text{Ca}$  mostraram que o cálcio aplicado em concentrações muito elevadas pode alterar o gradiente de concentração de nutrientes nas folhas, movendo-se para outras regiões (Shear e Faust, 1970). Também foi demonstrado que a

redistribuição lenta de Ca não ocorre devido incapacidade de se mover nos elementos do floema, mas em grande parte, à sua acumulação e capacidade de absorção pelos vários tecidos foliares (Ringoet *et al.*, 1968). Dentre os aspectos mais críticos, os autores citaram a penetração inicial de cálcio através da cutícula, epiderme e pelas células do mesofilo ao tecido vascular. Notamos neste estudo que parte da solução contendo sulfato de cálcio quando aplicada na folha fica acumulada na região do cartucho da cana, a qual é próxima ao meristema, tal fato juntamente com a concentração elevada de 58 mM pode ter sido preponderante para a absorção e aumento na concentração desse nutriente no meristema apical.

Em cana-de-açúcar, Endres *et al.* (2015) relataram alterações morfológicas influenciadas pela aplicação foliar de cálcio após a floração da cana, com destaque para o aumento no número médio de entrenós e na altura de colmos em plantas que receberam aplicação foliar de cálcio. Além disso, foi observada uma redução no comprimento médio de entrenós por colmo e no diâmetro médio de colmos. O aumento na altura de colmos em plantas tratadas com cálcio está de acordo com o observado neste trabalho. Por outro lado, não foi notada diferenças no número de entrenós e diâmetro do colmo.

Tais respostas podem estar associadas à alteração da composição de minerais observadas no meristema, concordando com o relatado em outros trabalhos. Por exemplo, o cálcio foi associado ao atraso e diminuição do florescimento através de aplicação foliar em regiões próximas ao meristema, o que fez sua concentração aumentar e a de potássio diminuir (Endres *et al.*, 2015). Tal alteração pode afetar o carregamento e transporte de carboidratos através do floema (Huber e Moreland, 1981; Lemoine *et al.*, 2013) e influenciar negativamente a indução floral. Os níveis de Mg também estão ligados ao

transporte de carboidratos no floema, em especial, a sacarose (Cakmak *et al.*, 1994). Os nutrientes Ca, Mg e K são antagônicos (Diem e Goldbolt, 1993; Armstrong, 1998), sugerindo que o aumento nos níveis de cálcio, provavelmente foram cruciais na redução da concentração de K e Mg no meristema apical.

Ambos os tratamentos demonstraram um comportamento semelhante na análise de trocas gasosas no parâmetro fotossíntese líquida ( $A$ ), transpiração ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) até o meio dia. Após este período houve uma redução na fotossíntese líquida ( $A$ ), o que é uma resposta comum nesse horário em muitas plantas (Huang *et al.*, 2006), e ocorre geralmente associado a uma diminuição da  $g_s$  e redução da transpiração (Yu *et al.*, 2001). Entretanto, após o meio dia, observou-se um aumento da transpiração foliar em conjunto com a diminuição da  $g_s$  em folhas tratadas com cálcio.

Vários estudos têm encontrado diferentes respostas de células foliares aos níveis de Ca. Gilliam *et al.* (2011), por exemplo, correlacionaram o cálcio com altas taxas de transpiração em tecidos vegetais, principalmente em regiões com maior requerimento desse íon, dentre os quais o mesófilo foliar. Outro estudo demonstrou em *Phaseolus* e *Pisum sativum* que o aumento na concentração de cálcio no xilema acima de 5 mM está ligado a redução da transpiração foliar (Rothwell e Dodd, 2014). Também é atribuído ao  $Ca^{2+}$  efeito *cross-linking* na parede celular, conferindo maior rigidez a esse tecido (Hepler e Winship, 2010), tal efeito resulta em paredes mais espessas e menos extensíveis, diminuindo a permeabilidade. Entretanto, a maior transpiração em folhas com cálcio relatada entre 12 e 14h, pode estar ligada aos níveis desse nutriente em apoplastos próximos às células-guarda, atuando como sinalizador na regulação da abertura estomática em resposta ao ácido abscísico (ABA) (Webb *et al.*, 2001), e a

aplicação na folha de uma concentração elevada de cálcio, também pode ter influenciado o controle da abertura estomática aumentando a transpiração. Embora plantas tratadas com  $\text{Ca}^{2+}$  tenham apresentado menor transpiração entre 12 e 14h, não houve diferença no que se refere a fotossíntese.

Outros trabalhos demonstram ainda que a redução da capacidade do mesofilo em acumular cálcio dentro do vacúolo, com consequente aumento desse nutriente no apoplasto, diminuiu a extensibilidade da parede, e em consequência a abertura estomática e transpiração, alterando também a expressão de proteínas da parede celular (Conn *et al.*, 2011). Estes pesquisadores associaram tal resposta a alterações na expressão da proteína CAX1, localizada no tonoplasto, e associada ao influxo de cálcio para o vacúolo (Cheng *et al.*, 2005).

As respostas fisiológicas das plantas à aplicação foliar de cálcio têm recebido pouca atenção da pesquisa, a maioria dos trabalhos tem explorado o fornecimento do nutriente a partir das raízes. Diante disso, esse trabalho traz algumas evidências sobre o efeito da aplicação foliar de cálcio na morfologia, concentração de nutrientes do meristema apical, trocas gasosas da folha e na anatomia do meristema, tais alterações resultaram na redução da floração da cana-da-açúcar.

## **Conclusões**

A aplicação foliar de cálcio é eficiente para reduzir a floração da variedade RB867515 de cana-de-açúcar.

As alterações na transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO<sub>2</sub> provocados pela aplicação de cálcio, não alteram a fotossíntese na planta.

A aplicação de Ca<sup>2+</sup> altera a composição de macronutrientes do ápice meristemático, aumentando o acúmulo de lignina, tais mudanças resultaram em colmos maiores no final da floração.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar PMGCA/UFAL pela disponibilização do material vegetal e da área experimental, e a professora Dra. Kátia Castanho Scortecci / UFRN pela colaboração nas análises de microscopia ótica.

## Referências Bibliográficas

- Araldi R, Silva F M L, Ono E O and Rodrigues J D (2010) Flowering in sugarcane. *Ciência Rural* 40:3, 694-702.
- Armstrong D I (1998) Potassium interactions with other nutrients. *Better Crops* 28:3, 12-14.
- Barbieri V and Silva F C D (2011) Efeito do florescimento na brotação e perfilhamento da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Bioenergia em Revista: Diálogos* (ISSN: 2236-9171) 1:1, 118-128.
- Brunkhorst M J (2001) A preliminary investigation into the effect of plant nutrient levels on sugarcane flowering. In *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association* 75:143-150.
- Cakmak I, Hengeler C and Marschner H (1994) Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany* 45:9, 1251-1257.
- Cheng N H, Pittman J K, Shigaki T, Lachmansingh J, LeClere S, Lahner B ... and Hirschi K D (2005) Functional association of Arabidopsis CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiology* 138:4, 2048-2060.
- Clements H F and Awada M (1967) Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane. *International Society of Sugar Cane Technologists* 12:795-812.
- Conn S J, Gilliam M, Athman A, Schreiber A W, Baumann U, Moller I ... and Burton R (2011) Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration gas exchange and plant productivity in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23:1, 240-257.
- Cruz, S J S (2010) Efeito da aplicação de cálcio e silício visando a redução do florescimento da variedade de cana-de-açúcar RB867515. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas*, 44pp.
- Cunha J P A R, Teixeira M M, Vieira R F and Fernandes H C (2005) Deposição e deriva de calda fungicida aplicada em feijoeiro em função de bico de pulverização e de volume de calda. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9:1, 133-138.
- Diem B and Godbold D L (1993) Potassium calcium and magnesium antagonism in clones of *Populus trichocarpa*. In *Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice* 613-616, Springer Netherlands.
- Donaldson R A and Sugar Association (1996) Effects of ethephon applied to two sugarcane varieties to prevent flowering. In *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association* 70.
- Endres L, Cruz S J S, Vilela R D, Santos J M, Souza Barbosa G V and Silva J A C (2015) Foliar Applications of Calcium Reduce and Delay Sugarcane Flowering. *BioEnergy Research* 1-11.
- Friedman H, Goldschmidt E E and Halevy A H (1989) Involvement of calcium in the photoperiodic flower induction process of *Pharbitis nil*. *Plant physiology* 89:2, 530-534.
- Gilliam M, Dayod M, Hocking B J, Xu B, Conn S J, Kaiser B N ... and Tyerman S D (2011) Calcium delivery and storage in plant leaves: exploring the link with water flow. *Journal of Experimental Botany* 62:7, 2233-2250.

- Gosnell J M (1973). Some factors affecting flowering in sugarcane. In Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association 144-147.
- Hepler P K and Winship L J (2010) Calcium at the Cell Wall-Cytoplasm Interface. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:2, 147-160.
- Hermann E R and Câmara G M S (1999) Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. *Revista da STAB* 17, 32-34.
- Huang L F, Zheng J H, Zhang Y Y, Hu W H, Mao W H, Zhou Y H and Yu J Q (2006) Diurnal variations in gas exchange chlorophyll fluorescence quenching and light allocation in soybean leaves: the cause for midday depression in CO<sub>2</sub> assimilation. *Scientia Horticulturae* 110:2, 214-218.
- Huber S C and Moreland D E (1981) Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* 67:1, 163-169.
- Johansen, D A (1940) *Plant microtechnique*. MacGraw-Hill, New York, London, 523p.
- Kraus J E, and Arduin M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Edur, 198p.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N... and Faucher M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4:272, 2.
- Moore P H and Berding N (2014) Flowering. *Sugarcane: Physiology Biochemistry and Functional Biology* 379-410.
- Moore P H and Osgood R V (1989) Prevention of flowering and increasing sugar yield of sugarcane by application of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid). *Journal of Plant Growth Regulation* 8:3, 205-210.
- Nuss K J, Berding N, Singh V and Kumar V (1999) Planned recombination in sugarcane breeding: artificial initiation of flowering in sugarcane in sub-tropical and tropical conditions. In Proceedings of the XXIII ISSCT Congress New Delhi India 22-26 February, 1999. V.2:504-508, Sugar Technologists' Association of India.
- Oliveira R A, Daros E, Zambon J L C, Weber H, Ido O T, Bessalho-Filho J C ... and da Silva D K T (2007). Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. *Pesquisa Agropecuária Tropical Agricultural Research in the Tropics* 37:2, 71-76.
- Rao P G and Kumar K N (2003) Effect of flowering on juice quality and fibre content in sugarcane. *Sugar Tech* 5:3, 185-187.
- Ringoet A, Sauer G and Gielink A J (1968) Phloem transport of calcium in oat leaves. *Planta* 80:1, 15-20.
- Rodrigues J D (1995) *Fisiologia da cana-de-açúcar*. Botucatu:Unesp, 100pp.
- Rothwell S A and Dodd I C (2014) Xylem sap calcium concentrations do not explain liming-induced inhibition of legume gas exchange. *Plant and Soil* 382:1-2, 17-30.
- Shear C B and Faust M (1970) Calcium transport in apple trees. *Plant Physiology* 45:6, 670-674.
- Silva F C D S (Ed.) (2009) *Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes*. Embrapa Informação Tecnológica, Rio de Janeiro: Embrapa Solos.
- Silva F D A S and de Azevedo C A V (2006). A new version of the assistant-statistical assistance software. In *Computers in Agriculture and Natural Resources*, 23-25 July 2006, Orlando Florida p. 393, American Society of Agricultural and Biological Engineers.

- Tretyn A, Czaplewska J, Cymerski M, Kopcewicz J and Kendrick R E (1994) The mechanism of calcium action on flower induction in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Physiology* 144:4-5, 562-568.
- van Dillewijn C (1952) Botany of sugarcane. *Botany of Sugarcane* 371pp.
- Webb A A, Larman M G, Montgomery L T, Taylor J E, Hetherington A M (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *The Plant Journal* 26:3, 351-362.
- White P J (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465:1, 171-189.
- Wiedenfeld B (2003) Enhanced sugarcane establishment using plant growth regulators. *Journal of American Society of Sugarcane Technologists* 23, 48-61.
- Yu G R, Zhuang J and Yu Z L (2001) An attempt to establish a synthetic model of photosynthesis-transpiration based on stomatal behavior for maize and soybean plants grown in field. *Journal of Plant Physiology* 158:7, 861-874.
- Zienkiewicz K, Rejón J D, Suárez C, Castro A J, de Dios Alché J and García M I R (2011) Whole-Organ analysis of calcium behaviour in the developing pistil of olive (*Olea europaea* L.) as a tool for the determination of key events in sexual plant reproduction. *BMC Plant Biology* 11:1, 150.

## 5. CAPÍTULO II

### **Extração de proteínas e proteômica 1D-PAGE do meristema apical da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob aplicação de cálcio.**

Romel Duarte Viela<sup>1</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

A ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**

## Resumo

Meristemas apicais do caule (SAM) são estruturas que abrigam células tronco e pluripotentes. A mudança de meristema vegetativo para reprodutivo é chamada de transição floral. Este ponto crítico no desenvolvimento da planta é exercido especificamente pelo SAM. Apesar dos avanços na separação de proteínas e técnicas de espectrometria de massas, ainda há uma grande lacuna no que se refere a metodologias específicas e eficientes no isolamento de moléculas raras, como por exemplo, proteínas e fatores de transcrição que regulam o florescimento. Neste trabalho testou-se dois protocolos de extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar para estabelecer o mais eficaz, além de investigar o efeito da aplicação foliar de cálcio através de abordagem proteômica 1D e espectrometria de massas, com o objetivo de identificar proteínas expressas no SAM e que tenham relação com a inibição do florescimento desta relevante cultura. Para tanto, foram testados dois protocolos de extração de proteínas totais do SAM, um protocolo à base de TCA/acetona (protocolo A) e outro baseado em fenol (protocolo B). A purificação e extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar usando o protocolo A permitiu obtenção de extrato 57% mais concentrado em proteínas em relação ao protocolo B, fornecendo uma maior representatividade do proteoma e de proteínas potencialmente envolvidas na indução do florescimento da cana-de-açúcar. A anotação presumível de algumas proteínas isoladas do meristema apical da cana-de-açúcar detectados no gel 1D-PAGE, apontam para uma provável alteração no proteoma influenciada pela aplicação foliar de cálcio. Dentre as proteínas identificadas, CDPK e sacarose sintase são potenciais candidatas a estudos futuros visando sua aplicação como marcador molecular funcional envolvendo a regulação do florescimento da cana-de-açúcar associados ao uso do cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético desta cultura.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Espectrometria de massas, Extração de proteínas, Meristema apical.

## Abstract

Shoot apical meristems (SAM) are structures that harbor stem cells and pluripotent. The change of apical meristem to reproductive is called floral transition. This critical point in the plant development is specifically performed by SAM. Despite advances in protein separation and mass spectrometry techniques, there is still a huge gap regarding the specific and efficient methods for the isolation of rare molecules, such as proteins and transcription factors that regulate flowering. In this study was analyzed two protocols in protein extraction of sugarcane apical meristem to establish the most effective, and to investigate the effect of foliar calcium application through 1D-proteomic approach and mass spectrometry, aiming to identify proteins expressed in SAM and that are related to flowering inhibition of this important culture. For that, was tested two total SAM protein extraction protocols, a protocol based on the TCA / acetone (protocol A) and another based on phenol (B protocol). Purification and protein extraction of sugarcane apical meristem using Protocol A, allowed obtaining 57% higher protein concentration in relation to protocol B, providing a higher representation of the proteome and potential proteins involved in sugarcane flowering induction. The annotation of some proteins isolated from the sugarcane apical meristem detected in 1D-PAGE gel, pointed to a likely change in the proteome influenced by calcium foliar application. Among the identified proteins, sucrose synthase and CDPK are potential candidates for future studies of its use as a functional molecular marker involving the flowering regulation of sugarcane associated with calcium use, which help breeding programs of this culture.

**Key words:** Apical meristem, Mass spectrometry, Proteins extraction, Sugarcane.

## Introdução

Os meristemas apicais do caule (SAM) são estruturas que abrigam células-tronco e pluripotentes (Glover, 2007). Consistem de um conjunto de células embrionárias que se proliferam durante toda a vida da planta, dando origem as folhas, caules e flores (Bowman e Eshed, 2000). A mudança de meristema vegetativo para reprodutivo é chamada de transição floral. Este ponto crítico no desenvolvimento da planta é exercido especificamente pelo SAM, o qual permite que as plantas programem a mudança para desenvolvimento reprodutivo quando as condições ambientais estão favoráveis, de maneira a garantir a propagação da espécie (Colasanti e Coneva, 2009).

Durante o período de transição floral, várias alterações ocorrem nas células do SAM, indicando que essa estrutura está coordenando a mudança de estágio vegetativo para reprodutivo, dentre as quais, o aumento do número de plasmodesmas e na taxa de divisão celular que é observada horas após a evocação floral (Colasanti e Sundaresan, 2000; Bernier e Perilleux, 2005). Padrões alterados de divisão celular são acompanhados por mudanças na morfologia do meristema, levando ao zoneamento e a iniciação de estruturas florais. Em termos de alterações fisiológicas, há um aumento na respiração celular, nos níveis de transcrição e síntese proteica, as quais estão relacionadas a reprogramação molecular do SAM, indicando sua atuação como fator chave no processo de transição floral (Colasanti e Sundaresan, 2000; Coelho *et al.*, 2014)

Anos de pesquisa genética delinearam uma rede complexa e interativa de fatores de transcrição (Shore e Sharrocks, 1995), sinais hormonais (Mutasa-Göttgens e Hedden, 2009), marcas epigenéticas (He, 2012) e metabólitos (Wada *et al.*, 2014) que contribuem para a regulação da função do SAM. Tem sido

relatado desde a ação de um único gene à integração de sinais de vários outros genes como envolvidos na alteração da estrutura e função do SAM (Glover, 2007)

Tais descobertas foram realizadas principalmente na eudicotiledônea modelo *Arabidopsis thaliana*. No caso das monocotiledôneas, vários mecanismos moleculares da indução floral foram decifrados em arroz e milho (Buckler *et al.*, 2009; Yoshida e Nagato, 2011). Apesar dessas espécies possuírem genes com funções ancestrais comuns, observa-se a presença de mecanismos específicos na integração e sinalização dos fatores indutivos do florescimento até mesmo entre espécies muito próximas, com é o caso da cana-de-açúcar (Colasanti e Coneva, 2009).

Compreender essas especificidades e a evolução dos mecanismos de indução do florescimento tem sido o grande desafio atualmente (Zhang *et al.*, 2013). Somado a isto, o pequeno tamanho do meristema apical, a presença de parede celular, compostos fenólicos, altos níveis de carboidratos e metabólitos secundários tem representado barreiras técnicas para experimentos bioquímicos e moleculares como a análise proteômica, principalmente na cana-de-açúcar (Amalraj *et al.*, 2010).

Apesar dos avanços na separação de proteínas e técnicas de espectrometria de massas, ainda há pouca informação no que se refere a metodologias específicas e eficientes no isolamento de moléculas raras, como por exemplo, proteínas e fatores de transcrição que regulam o florescimento (Smaczniak, *et al.*, 2012). Neste trabalho, testou-se dois protocolos de extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar de modo a estabelecer o mais eficaz. Além disso, investigou-se o efeito da aplicação foliar de cálcio através de abordagem proteômica 1D e espectrometria de massas, com o objetivo de

identificar proteínas expressas no SAM e que tenham relação com a inibição do florescimento desta relevante cultura.

## **Materiais e métodos**

### **Primeira extração de proteínas - teste de protocolos**

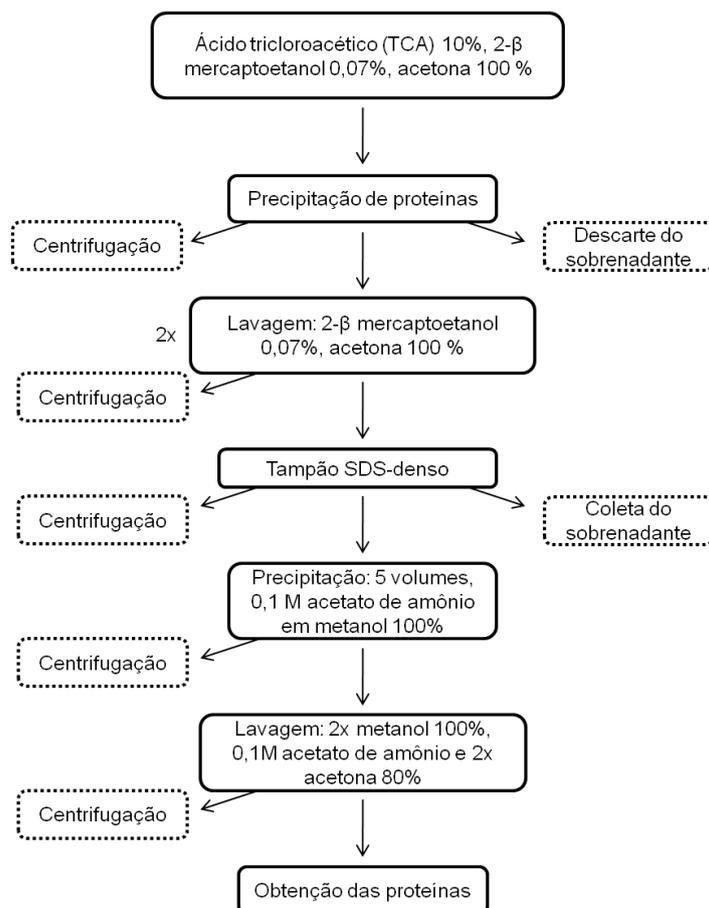
Para selecionar um protocolo de extração de proteínas para o ápice meristemático da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), foram realizados dois testes de isolamento e extração proteica do SAM para escolha do mais eficiente.

As amostras usadas nos ensaios foram obtidas de meristemas apicais de plantas cultivadas em canaviais comerciais na localidade de Tiúma, Município de São Lourenço da Mata - PE. As proteínas do SAM foram purificadas e extraídas de acordo com métodos descritos por Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008) (protocolo A); e Hurkman e Tanaka (1986), com modificações de Boaretto (2012) (protocolo B).

### **Protocolo A - Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008):**

Para testar o protocolo A, foram usados aproximadamente 1,0 g de amostras do meristema apical da cana-de-açúcar, macerados em moinho criogênico e adicionados a 6 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, contendo 2-β mercaptoetanol 0,07% e acetona 100 %. O material foi homogeneizado e mantido sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 5 min. Em seguida, a solução foi mantida a -20°C por 3 h para precipitação das proteínas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14000xg a 4°C por 10 min e o sobrenadante descartado. Na próxima etapa, o precipitado foi lavado 2x em acetona 100% contendo 2-β mercaptoetanol 0,07% por centrifugação a 14000xg a 4°C por 10

min. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. No próximo passo da extração, o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de tampão SDS-denso contendo (fenol, tris HCl 0,1 M pH 8,0) e SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, tris HCl 0,1 M pH 8,0 e 2-β mercaptoetanol 0,07%). Em seguida, a mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 10.000xg por 5 min a 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 5 volumes de metanol contendo 0,1 M de acetato de amônio, após agitação em vortex o material foi estocado a -20°C para precipitação das proteínas. Após esta etapa, as proteínas foram recuperadas por centrifugação a 10.000xg durante 5 min. Em seguida, foram realizadas lavagens 2x em metanol 100% contendo 0,1 M de acetato de amônio e 2x em acetona 80%, após as lavagens o precipitado foi submetido a secagem em câmara de fluxo laminar e armazenado a -80° C até as análises.



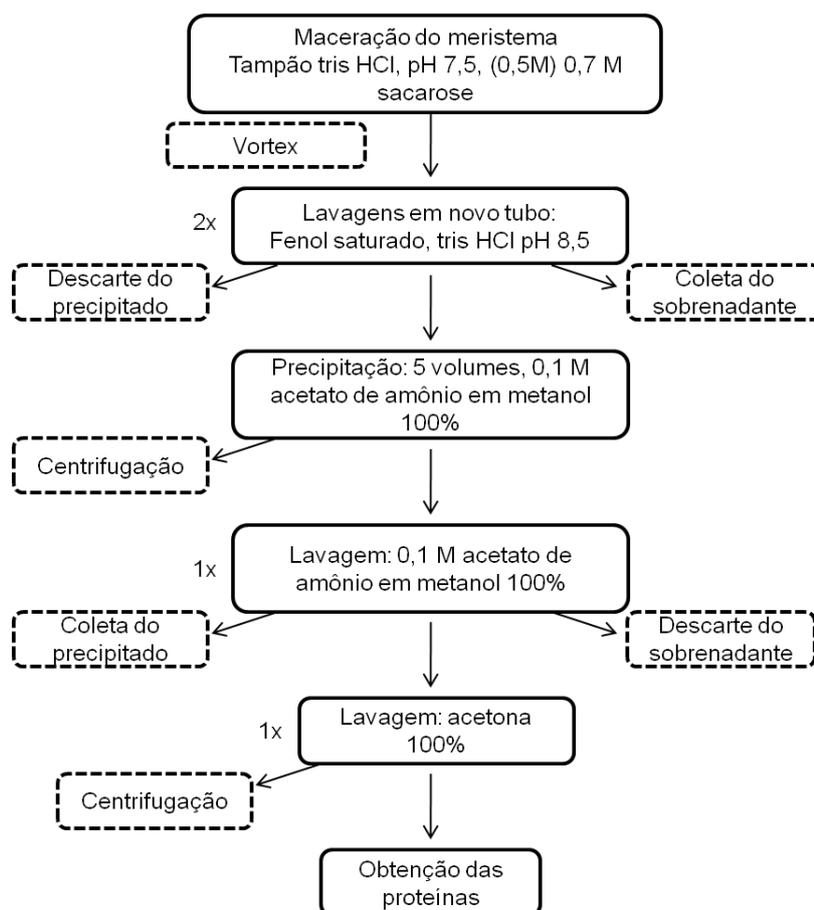
**Figura 1.** Representação esquemática do processo de isolamento e extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar variedade RB867515 - Protocolo A Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008).

**Protocolo B - Hurkman e Tanaka (1986), com modificações de Boaretto (2012):**

Para o isolamento de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar usando o protocolo B, aproximadamente 1,0 g de material vegetal foi macerado em moinho criogênico e em seguida adicionado 15 mL tampão Tris HCl, pH 7,5 (0,5 M) e 0,7 M sacarose, 2 mM fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF), 2-β mercaptoetanol 2% (Figura 1). O material foi homogeneizado e mantido sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 15

mL de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5), e os tubos foram novamente mantidos em agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min.

Posteriormente, os extratos foram 2x centrifugados a 10.000xg por 30 min a 4°C, e o sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para tubo novo, sendo adicionado a este 5 volumes de 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%. Os tubos foram mantidos a -20°C durante 18 h (*overnight*) para precipitação das proteínas, e logo após centrifugados a 16.000xg por 30 min a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado (*pellet*) foi lavado três vezes sob centrifugação a 16.000xg por 30 min a 4°C com 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%, uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 100%. Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por 1 h a -20°C. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos, acondicionados em gelo, em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. Após secagem, os *pellets* foram solubilizados em solução de ureia 8 M e tiourea 2 M, incubados em temperatura ambiente por 15 min e em seguida armazenados à -80°C.



**Figura 2.** Representação esquemática do processo de isolamento e extração de proteínas do meristema apical da cana-de-açúcar variedade RB867515 - Protocolo B Hurkman e Tanaka (1986), com modificações de Boaretto (2012).

Após a extração das proteínas, os extratos proteicos obtidos pelos protocolos A e B foram quantificados pelo método de Bradford (1976) a 595 nm e pelo kit 2D quant (GE Life Sciences) a 480 nm ambos em triplicata por meio de espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) e analisados por SDS-PAGE (12,5%).

### **Segunda extração de proteínas - análise SDS-PAGE e seleção de bandas para MS**

Na segunda extração de proteínas, foram usadas amostras de meristemas do ápice da variedade de cana-de-açúcar RB867515, provenientes de plantas

cultivadas em campo na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro/ AL (09° 14' 22" S; 35° 50' 11" W; 480 m de altitude), durante a pré e pós-indução do florescimento sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) e sob condições normais de cultivo (controle). As proteínas foram extraídas a partir de 4,6 g de amostras do meristema apical utilizando o protocolo A, Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008) e a concentração de proteínas determinadas pelo uso do kit 2D Quant (GE Life Sciences).

O extrato proteico foi sonificado 3x com amplitude de 50%, foram realizados ciclos de 5s ligado / 5s desligado. Em seguida foram aplicados 40 µg de proteínas totais juntamente com 10 µL de marcador de baixo peso molecular (GE) e aplicadas no gel. O gel SDS-PAGE 12,5% foi submetido à eletroforese no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems). Após a eletroforese, os géis foram corados com azul de *Coomassie Brilliant*, conforme Candiano *et al.* (2004).

Fragmentos do gel SDS-PAGE foram selecionados visualmente considerando bandas diferenciais entre os tratamentos com cálcio e sem cálcio. Para confirmação, foi realizada análise quanto à intensidade e volume bruto usando o software Gel Analyzer v. 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) que permitiu selecionar os tratamentos pós-floração controle e pré-floração cálcio como os mais contrastantes. As bandas diferenciais foram então excisadas e analisadas por espectrometria de massas.

### **Espectrometria de massas e Identificação presumível**

Os fragmentos do gel SDS-PAGE contendo bandas de proteínas (protocolos A) 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 incubadas por 30 min à 60°C. Logo após, o excesso de líquido foi retirado e adicionado 30 µL de solução 10 mM de IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio para serem alquiladas, também por 30 min 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, foram adicionados cerca de 30 a 50 µL de solução contendo tripsina na concentração de 20 ng/µL<sup>-1</sup> e incubado a 37 °C em banho seco, *overnight* (16 h), garantindo 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, após 40 min 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  $\alpha$ -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) e *Saccharum* disponíveis no banco de dados de proteínas de cana da UNICAMP (<http://dalton-server.iqm.unicamp.br/mascot/>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de dados: Swissprot; taxonomia: Viridiplantae; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância  $\pm 1.2$  Da. 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 da 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.

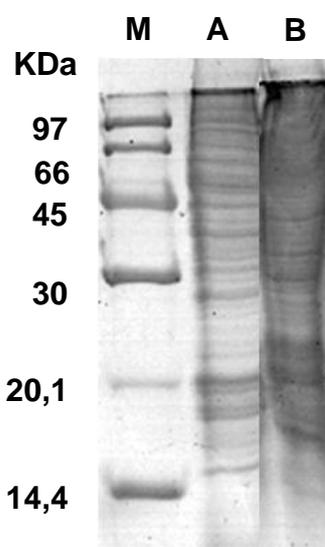
## **Resultados**

### **Análise proteômica**

Na análise dos métodos de extração de proteínas, constatou-se que o protocolo A apresentou distribuição de bandas semelhante ao protocolo B (Figura 3). O gel SDS-PAGE revelou que o protocolo A teve melhor perfil eletroforético e integridade de bandas.

A quantificação da concentração proteica pelo método de Bradford (1976) demonstrou que o protocolo A também foi mais eficiente na extração de proteínas do SAM em relação ao B. No primeiro teste foi observada uma concentração de  $2,45 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  enquanto que no segundo  $1,03 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  de extrato proteico.

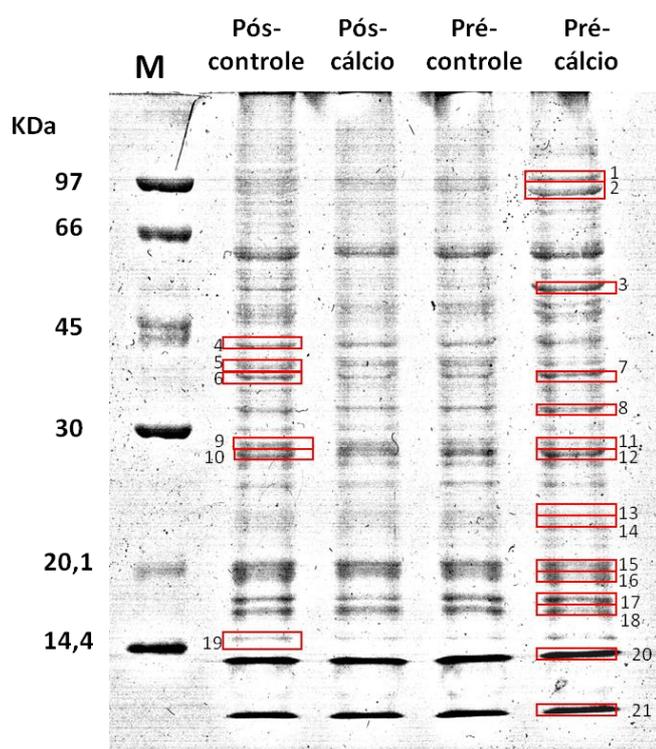
Já na quantificação proteica usando o kit 2D quant (GE Life Sciences) foi observado um rendimento de  $900 \mu\text{g}$  de proteínas por grama do meristema apical da cana para o protocolo A, enquanto que no método de extração fenólica, protocolo B, foi notado um rendimento de  $214 \mu\text{g}$  de proteínas por grama do mesmo tecido (Figura 3 B). Com base nesse resultado optou-se por adotar o protocolo A (Wang *et al.*, 2003 modificado) para a realização de um novo teste de eletroforese SDS-PAGE para seleção de bandas para espectrometria de massas.



**Figura 3.** Gel 1D SDS-PAGE de proteínas totais do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867517 (gel editado). Protocolo A (A), Protocolo B (B), (M) marcador de peso molecular (KDa).

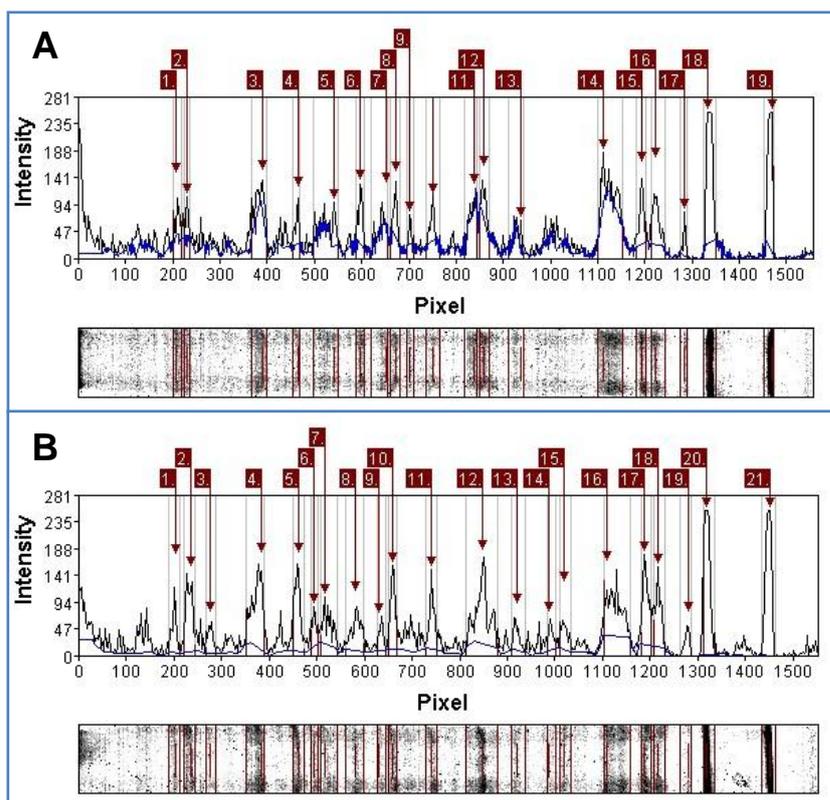
Na segunda análise do gel SDS-PAGE usando o protocolo A, foi realizado um teste de quantificação proteica com o kit 2D Quant, obtendo-se em média  $4,2 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  de extrato proteico para todos os tratamentos. O gel SDS-PAGE

demonstrou perfis de bandas semelhantes entre os tratamentos, entretanto, pode-se notar que os tratamentos pós-florescimento controle e pré-florescimento cálcio exibiram bandas mais contrastantes (Figura 4). Com base nesse resultado, selecionaram-se as bandas visualmente mais distintas, tal diferença foi ainda confirmada com auxílio do software Gel analyzer, e as bandas foram posteriormente analisadas por espectrometria de massas.



**Figura 4.** Localização de fragmentos excisados do gel SDS-PAGE de meristemas apicais da variedade de cana-de-açúcar RB867515, tratamentos pós-indução do florescimento controle e pré-indução do florescimento sob aplicação de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) para análise em espectrometria de massas. 1-21: numeração das bandas excisadas do gel.

Na análise dos perfis dos géis SDS-PAGE pelo software Gel Analyzer, observamos de modo geral, que o tratamento pré-floração cálcio (Figura 5 B) demonstrou maior intensidade de bandas comparado ao tratamento pós-floração controle (Figura 5 A).



**Figura 5.** Bandas do gel SDS-PAGE de meristemas apicais da variedade de cana-de-açúcar RB867515, analisadas pelo software Gel Analyzer v. 2010a nos tratamentos pós-indução do florescimento controle (A) numeração 1 a 19 e pré-indução do florescimento sob aplicação de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (B) numeração 1 a 21.

Nas tabelas 1 e 2 são apresentados os resultados obtidos na análise com o software Gel Analyzer, onde foi possível constatar que as bandas detectadas no tratamento pré-florescimento cálcio (Tabela 2) exibiram em geral maior volume bruto ou intensidade comparado às bandas do tratamento pós-florescimento controle (Tabela 1). A banda 2 do tratamento pré-Ca, por exemplo, demonstrou volume bruto 9x maior que a mesma banda no tratamento pós-controle. Nas demais comparações o tratamento Pré-Ca teve em média 2x maior volume bruto comparado ao pós-controle.

**Tabela 1.** Análise do perfil do Gel SDS-PAGE no tratamento pós-florescimento controle em meristemas do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 pelo software Gel Analyzer v. 2010a.

Coluna	Banda	Rf	Vol. bruto	MW (KDa)
2.	1.	0.133	515	99
2.	2.	0.148	203	93
2.	3.	0.251	1041	62
2.	4.	0.299	563	52
2.	5.	0.348	733	44
2.	6.	0.384	814	40
2.	7.	0.418	327	36
2.	8.	0.431	783	34
2.	9.	0.451	218	33
2.	10.	0.483	627	30
2.	11.	0.539	245	26
2.	12.	0.551	663	25
2.	13.	0.603	130	23
2.	14.	0.715	920	19
2.	15.	0.766	1350	18
2.	16.	0.785	1466	18
2.	17.	0.825	372	17
2.	18.	0.857	3734	17
2.	19.	0.945	3290	16

**Tabela 2.** Análise do perfil do Gel SDS-PAGE no tratamento pré-florescimento cálcio em meristemas do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 pelo software Gel Analyzer v. 2010a.

Coluna	Banda	Rf	Vol. bruto	MW (KDa)
5.	1.	0.133	1213	99
5.	2.	0.154	1921	91
5.	3.	0.179	638	82
5.	4.	0.249	3082	63
5.	5.	0.299	2124	52
5.	6.	0.32	638	49
5.	7.	0.335	1266	46
5.	8.	0.376	1509	41
5.	9.	0.407	542	37
5.	10.	0.427	1673	35
5.	11.	0.479	1426	30
5.	12.	0.548	3580	26
5.	13.	0.593	763	23
5.	14.	0.636	483	22
5.	15.	0.657	940	21
5.	16.	0.715	3066	19
5.	17.	0.766	1993	18
5.	18.	0.785	1486	18
5.	19.	0.825	459	17
5.	20.	0.85	4025	17
5.	21.	0.935	3947	16

Das 21 bandas selecionadas visualmente como contrastantes e comuns e excisadas do SDS-PAGE nos tratamentos (pós-Co) e (pré-Ca) (Figura 4), foram obtidos espectros com qualidade de 19 amostras, os quais foram posteriormente submetidos à análise no software Mascot através do método *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) e classificados pelo Gene Ontology (GO) por processo biológico (Figura 6).

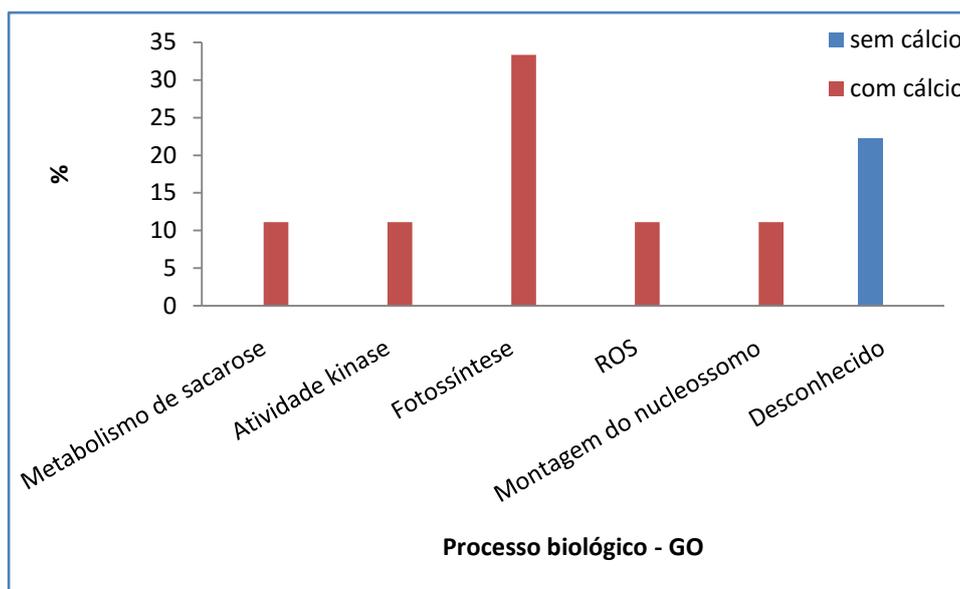
Dos peptídeos analisados foram identificadas nove proteínas, das quais se destacaram a sacarose sintase (SuSy) na banda 2 do tratamento Pré-Ca e a proteína quinase dependente de cálcio isoforma 11 (CDPK 11) detectada na banda 3 do mesmo tratamento (Tabela 3). A proteína cloroplástica PSB28 do centro de reação do fotossistema II foi detectada três vezes nas bandas 7, 17 e

18, todas de meristemas tratados com cálcio. Das seis bandas analisadas no tratamento Pós-Co foram identificadas duas proteínas de função desconhecida nas bandas 6 e 9 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Anotação presumível de peptídeos detectados em seções de SDS-PAGE de amostras do meristema apical da cana-de-açúcar sob aplicação foliar de 58 mM sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) nos tratamentos Pós-indução controle e Pré-indução cálcio, analisados nos bancos de dados de proteínas de espécies de plantas SwissProt: Viridiplantae e *Saccharum*.

Banda/ Tratamento	Acesso	Banco de dados	Anotação presumível	Score	e-value	Espécie ortóloga	Mr	pI
2	SUS2_MAIZE	SwissProt	Sacarose sintase 2	170/57	2.9e-013	<i>Zea mays</i>	93.507	6,03
Cálcio	S4UAT5	<i>Saccharum</i>	Sacarose sintase 1	174/47	1.1e-014	<i>Saccharum officinarum</i>	93.492	6,01
3	CDPKB_ORYSJ	SwissProt	Proteína quinase dependente de cálcio isoforma 11	64/57	0.011	<i>Oryza sativa</i>	61.627	5,50
Cálcio	B3GEB9	<i>Saccharum</i>	Proteína de resistência tipo NBS-LRR (Fragmento)	37/47	0.58	<i>Saccharum arundinaceum</i>	25.567	7,05
6	B4G0K5	Maize	Proteína desconhecida	69/62	0.011	<i>Zea mays</i>	38.770	6,30
Controle	A0A0C6WCU0	<i>Saccharum</i>	Proteína ScMYB57	31/47	2.1	<i>Saccharum hybrid</i>	10.256	10
7	PSB28_ORYSJ	SwissProt	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II, cloroplástica	58/57	0.042	<i>Oryza sativa</i>	19.838	9,79
Cálcio	W0F8W1	<i>Saccharum</i>	Proteína quinase ativada por mitógeno	30/47	2.4	<i>Saccharum hybrid</i>	40.211	5,32
9	MATK_PANGI	SwissProt	Maturase K	43/57	1.4	<i>Panax ginseng</i>	59.670	9,61
Controle	A0A059Q0Z0	<i>Saccharum</i>	Proteína desconhecida	51/47	0.022	<i>Saccharum hybrid</i>	25.540	10,40
12	RUBA_RICCO	SwissProt	Proteína de ligação a subunidade grande da RuBisCO subunidade alfa (Fragmento)	45/57	0.87	<i>Ricinus communis</i>	52.461	4,77
Cálcio	S4WDN5	<i>Saccharum</i>	Ascorbato peroxidase	80/47	2.5e-005	<i>Saccharum hybrid</i>	27.556	5,68
15	H2B7_ARATH	SwissProt	Histona H2B.7	62/57	0.018	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15.902	10,02
Cálcio	A0A059Q0K8	<i>Saccharum</i>	Histona H3	40/47	0.26	<i>Saccharum hybrid</i>	15.454	11,15
17	PSB28_ORYSJ	SwissProt	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II, cloroplástica	59/57	0.033	<i>Oryza sativa</i>	19.838	9,79
Cálcio	A0A059Q0K8	<i>Saccharum</i>	Histona H3	48/47	0.039	<i>Saccharum hybrid</i>	15.454	11,15
18	PSB28_ORYSJ	SwissProt	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II, cloroplástica	58/57	0.05	<i>Oryza sativa</i>	19.838	9,79
Cálcio	A0A0C6WCR9	<i>Saccharum</i>	Proteína ScMYB46	40/47	0.26	<i>Saccharum hybrid</i>	10.748	9,23

A análise por processo biológico das proteínas identificadas demonstrou que 33% das proteínas estavam ligadas à fotossíntese, 11% apresentaram envolvimento com o metabolismo da sacarose, atividade quinase, montagem do nucleossomo ou resposta ao estresse oxidativo, enquanto que 22% foram anotadas com função desconhecida (Figura 6)



**Figura 6.** Anotação GO por processo biológico de proteínas do meristema apical da variedade de cana-de-açúcar RB867515, identificadas em fragmentos do gel SDS-PAGE.

## Discussão

### Análise comparativa - protocolos A e B

A partir da quantificação e visualização do gel SDS-PAGE constatou-se em amostras do meristema apical da cana-de-açúcar que o protocolo A permitiu a obtenção de um extrato 57% mais concentrado em proteínas em relação ao protocolo B. Também foi notado maior integridade das bandas reveladas na análise 1D-PAGE para o mesmo protocolo e aumento de 76% no rendimento em  $\mu\text{g}$  de proteína extraída por g de meristema.

O protocolo A foi inicialmente desenvolvido para extração de proteínas de folhas de oliveira, tendo como principais características a moagem em acetona até pó seco, TCA/acetona e fenol, mais conhecida como método ADP (acetone dry powder) (Wang *et al.*, 2003). Anos mais tarde, esse mesmo grupo aperfeiçoou o método ADP para uma gama de espécies vegetais, tornando-o eficiente para tecidos foliares de bambu, videira, tabaco e cana-de-açúcar (Wang *et al.*, 2006). Contudo, o principal avanço foi a rapidez no processo de extração, que reduziu o protocolo de 3 h para 1 h. Em seguida, Pirovani *et al.* (2008) testaram o mesmo método em folhas e meristemas de cacau, adicionando às etapas de extração 0,07% de  $\beta$ -mercaptoetanol (em todas as soluções), além de SDS-Denso e ultrassonicação das amostras. A adição dessas etapas melhorou consideravelmente a resolução das proteínas para análises 1D e 2D-PAGE. Este resultado também foi observado nesse trabalho para o meristema do ápice da cana-de-açúcar aumentando consideravelmente a obtenção de proteínas e permitindo uma maior representatividade do proteoma desse tecido.

Já o método de extração fenólica (protocolo B), baseado em TCA/acetona e fenol, inicialmente proposto por (Hurkman e Tanaka, 1986), já havia sido bem

relatado para colmos (Amalraj *et al.*, 2010) e raízes (Pacheco *et al.*, 2013) de cana-de-açúcar. Entretanto, revelou nesse trabalho baixa resolução em 1D-PAGE para meristemas do ápice caulinar, além de ser um processo de extração demorado comparado ao protocolo A.

Através da análise comparativa entre os métodos testados, foi possível selecionar para este estudo, o protocolo A como sendo o mais rápido e eficiente para a extração de proteínas do SAM da cana-de-açúcar.

### **Análise proteômica 1D-PAGE**

A expressão da enzima sacarose sintase 1 (SuSy), detectada na banda 2 em plantas tratadas com cálcio, é requerida no meristema apical provavelmente devido à necessidade de utilização da sacarose como fonte glicose e frutose para a obtenção de energia metabólica para a indução, diferenciação e desenvolvimento da flor. Esta proteína é a maior enzima do metabolismo de sacarose na cana-de-açúcar (Lingle e Dier, 2001), e catalisa a conversão reversível de sacarose em UDP-glicose e frutose (Hirose, *et al.*, 2008).

A elevação da concentração de sacarose em meristemas florais durante a indução do florescimento já foi mencionada na literatura (Bodson *et al.*, 1985; Fleming, 2006). Na cana-de-açúcar, a atividade da SuSy foi relatada em vários órgãos da planta: no desenvolvimento da parte aérea e em gemas laterais (Verma *et al.*, 2013). Endres *et al.* (2015) analisaram o conteúdo de carboidratos do meristema apical da cana e constataram um aumento nos níveis de sacarose em plantas tratadas com aplicação foliar de cálcio. Neste estudo, observamos que o volume bruto da banda 2 (sacarose sintase 1) foi maior em meristemas com

cálcio, e tal resultado poderia influenciar um aumento na concentração deste carboidrato no meristema.

Na banda 15 de meristemas tratados com cálcio, foi identificada a proteína histona H2B. A monoubiquitinação dessa proteína é um fator chave na modificação de histonas, consequentemente regulando a expressão de genes. Está envolvida com o tempo de floração de *Arabidopsis* alterando a expressão do gene *FLOWERING LOCUS C* (Cao *et al.*, 2008; Shimitz *et al.*, 2009; Bourbonousse *et al.*, 2012).

Na banda três de meristemas tratados com cálcio foi identificada a proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), também com maior volume bruto através da análise comparativa do gel. As CDPKs são sensores essenciais que desempenham papéis importantes durante o crescimento e em resposta a uma vasta gama de estímulos ambientais e de desenvolvimento em plantas (Jaworski *et al.*, 2012).

O papel fisiológico dessa proteína é conhecido na sinalização e regulação durante a reprodução sexuada de plantas (Zienkiewicz *et al.*, 2011), como também o seu envolvimento em vias de transdução induzidas pela luz através do fitocromo (Tretyn *et al.*, 1994). As CDPKs têm sido associadas ao desenvolvimento do pólen (White e Broadley, 2003), inibição do florescimento da eudicotiledônea *Pharbitis nil* (Friedman *et al.*, 1989; Tretyn *et al.*, 1990), e atraso do florescimento e extensão do período vegetativo em tabaco através da conversão de sinais de  $[Ca^{2+}]$  citosólico influenciado por uma ligação cálcio/calmodulina (Hua *et al.*, 2004). Em contraste, Jaworsky *et al.* (2003) relataram um aumento na expressão de CDPKs sob condições fotoperiódicas

indutivas nas plantas de dia curto *P. nil*, culminando no florescimento desta espécie.

Outros trabalhos também constataram a ligação entre o gene *PPF1* e o atraso do florescimento de *A. thaliana*. Esse gene codifica a proteína PPF1 localizada nas membranas do cloroplasto e está envolvida com o transporte de Ca para esta organela (Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Estes autores correlacionaram altos níveis de cálcio com maior expressão de PPF1, enquanto que pouco Ca na folha foi associado à menor expressão da proteína. Concluindo que o maior acúmulo de cálcio no cloroplasto regulado pelo gene *PPF1* foi preponderante na floração tardia de *Arabidopsis*.

A análise proteômica nos forneceu indícios que apontam para um suposto envolvimento da aplicação foliar de cálcio na redução do florescimento da cana-de-açúcar através da alteração do acúmulo de proteínas responsivas a este íon. No entanto, este trabalho traz apenas uma visão inicial da potencial relação da sacarose sintase e proteínas quinases dependentes de cálcio já descritas na literatura como envolvidas com o florescimento de plantas, mas pela primeira vez identificadas com associação à redução do florescimento desta relevante cultura.

## Conclusão

A purificação e extração de proteínas do meristema do ápice da cana-de-açúcar através do protocolo A permite a obtenção de maior representatividade do conjunto de proteínas potencialmente envolvidas com o florescimento da cana-de-açúcar.

A anotação presumível de algumas proteínas isoladas do meristema apical da cana-de-açúcar detectados no gel 1D-PAGE, apontam para uma provável alteração no proteoma influenciada pela aplicação foliar de cálcio. A sacarose sintase e proteína CDPK são potenciais candidatas a estudos futuros visando sua aplicação como marcadores moleculares funcionais envolvendo a regulação do florescimento da cana-de-açúcar associados ao uso do cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético desta cultura.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar PMGCA/UFAL pela disponibilização do material vegetal e área experimental. Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilização da plataforma analítica em espectrometria de massas, e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo (instituto de Química, Unicamp) pelo acesso ao programa Mascot com banco de dados proteicos de *Saccharum*.

## Referências

- Almeida R R (2015) Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 235pp.
- Amalraj R S, Selvaraj N, Veluswamy G K, Ramanujan R P, Muthurajan R, Palaniyandi M... and Viswanathan R (2010) Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. *Electrophoresis* 31:12, 1959-1974.
- Bernier G and Périlleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 3:1, 3-16.
- Boaretto L F (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose (Doctoral dissertation Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz") 178pp.
- Bodson M and Outlaw W H (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* 79:2, 420-424.
- Bourbousse C, Ahmed I, Roudier F, Zabulon G, Blondet E, Balzergue S ... and Barneche F (2012) Histone H2B monoubiquitination facilitates the rapid modulation of gene expression during *Arabidopsis* photomorphogenesis. *PLoS Genetics* 8:7, e1002825.
- Bowman J L and Eshed Y (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science* 5:3, 110-115.
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:1-2, 248-254.
- Buckler E S, Holland J B, Bradbury P J, Acharya C B, Brown P J, Browne C ... and Goodman M M (2009) The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325:5941, 714-718.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B ... and Righetti P G (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:9, 1327-1333.
- Cao Y, Dai Y, Cui S and Ma L (2008) Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20:10, 2586-2602.
- Coelho C P, Costa Netto A P, Colasanti J and Chalfun-Junior A (2013) A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. *Genetics and Molecular Research* 12:1347-1359.
- Colasanti J and Coneva V (2009) Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed something new. *Plant Physiology* 149:1, 56-62.
- Colasanti J. and Sundaresan V (2000) 'Florigen' enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower. *Trends in biochemical sciences* 25:5, 236-240.
- Fleming A (2006) Metabolic aspects of organogenesis in the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany* 57:9, 1863-1870.
- Friedman H, Goldschmidt E E and Halevy A H (1989) Involvement of calcium in the photoperiodic flower induction process of *Pharbitis nil*. *Plant Physiology* 89:2, 530-534.

- Glover B J (2007). Understanding flowers and flowering: an integrated approach Vol. 277, Oxford UK: Oxford University Press 239pp.
- He Y (2012) Chromatin regulation of flowering. *Trends in Plant Science* 17:9, 556-562.
- Hirose T, Scofield G N and Terao T (2008) An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. *Plant Science* 74:5, 534-543.
- Hua W, Zhang L, Liang S, Jones R L and Lu Y T (2004) A tobacco calcium/calmodulin-binding protein kinase functions as a negative regulator of flowering. *Journal of Biological Chemistry* 279:30, 31483-31494.
- Hurkman W J and Tanaka C K (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* 81:3, 802-806.
- Jaworski K, Pawełek A, Kopcewicz J and Szmidt-Jaworska A (2012) The calcium-dependent protein kinase (PnCDPK1) is involved in *Pharbitis nil* flowering. *Journal of Plant Physiology* 169:16, 1578-1585.
- Jaworski K, Szmidt-Jaworska A, Tretyn A and Kopcewicz J (2003) Biochemical evidence for a calcium-dependent protein kinase from *Pharbitis nil* and its involvement in photoperiodic flower induction. *Phytochemistry* 62:7, 1047-1055.
- Li J, Wang D Y, Li Q, Xu Y J, Cui K M. and Zhu Y X (2004) PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation. *Cell Calcium* 35:1, 71-77.
- Lingle S E and Dyer J M (2001) Cloning and expression of sucrose synthase-1 cDNA from sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 158:1, 129-131.
- Mutasa-Göttgens E and Hedden P (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* erp040.
- Pirovani C P, Carvalho H A S, Machado R C R, Gomes D S, Alvim F C, Pomella A W V ... and Micheli F (2008) Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems organs infected by *Moniliophthora perniciosa* the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis* 29:11, 2391-2401.
- Schmitz R J, Tamada Y, Doyle M R, Zhang X and Amasino R M (2009) Histone H2B deubiquitination is required for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C and for proper control of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149:2, 1196-1204.
- Shore P and Sharrocks A D (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry* 229:1, 1-13.
- Smaczniak C, Immink R G, Muiño J M, Blanvillain R, Busscher M, Busscher-Lange, J ... and Parcy F (2012) Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5, 1560-1565.
- Souza A E R (2015) Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e seca. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 234pp.
- Tretyn A, Cymerski M, Czaplewska J, Łukasiewicz H, Pawlak A and Kopcewicz J (1990) Calcium and photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiologia Plantarum* 80:3, 388-392.

- Tretyn A, Czaplewska J, Cymerski M, Kopcewicz J and Kendrick R E (1994) The mechanism of calcium action on flower induction in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Physiology* 144:4-5, 562-568.
- Verma A K, Agarwal A K, Dubey R S, Solomon S and Singh S B (2013) Sugar partitioning in sprouting lateral bud and shoot development of sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry* 62:111-115.
- Wada K C, Mizuuchi K, Koshio A, Kaneko K, Mitsui T and Takeno K (2014) Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in *pharbitis*. *Journal of Plant Physiology* 171:11, 895-902.
- Wang D, Xu Y, Li Q, Hao X, Cui K, Sun F and Zhu Y (2003) Transgenic expression of a putative calcium transporter affects the time of *Arabidopsis* flowering. *The Plant Journal* 33:2, 285-292.
- Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S and Cresti M (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24:14, 2369-2375.
- Wang W, Vignani R, Scali M and Cresti M (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27:13, 2782-2786.
- White P J and Broadley M R (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:4, 487-511.
- Yoshida H and Nagato Y (2011) Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany* 62:14, 4719-4730.
- Zhang D, Ren L, Yue J H, Wang L, Zhuo L H and Shen X H (2013) A comprehensive analysis of flowering transition in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton by using transcriptomic and proteomic techniques. *Journal of Proteomics* 80:1-25.
- Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Rodríguez-García M I and Castro A J (2011) Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. *BMC Plant Biology* 11:1, 122.

## 6. CAPÍTULO III

### **Proteômica do meristema apical da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob aplicação de cálcio.**

Romel Duarte Viela<sup>1</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

A ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**

## Resumo

Na cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) a conversão de meristema vegetativo para floral é uma etapa importante para o melhoramento genético, no entanto, é indesejável para a produção comercial por consumir sacarose para o desenvolvimento da inflorescência. Este estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente acumuladas no ápice meristemático da variedade RB867515 sob aplicação foliar de cálcio através de eletroforese 2D e espectrometria de massas. A aplicação foliar de cálcio reduziu em 20% o florescimento da cana em comparação com o controle. Na análise proteômica, um total de 60 proteínas diferencialmente expressas (DEPs) foram identificadas por PMF, das quais 14 foram observadas exclusivamente em meristemas tratados com cálcio, 11 proteínas foram identificadas exclusivamente após a indução floral, e 29 proteínas eram comuns, porém mais abundantes em meristemas sem cálcio antes da indução floral. A distribuição de termos de ontologia gênica (GO) associados aos DEPs por processo biológico na pré-indução revelou em meristemas sem cálcio que 15,7% das proteínas estavam envolvidas na transcrição, 26,3% na tradução e 10,5% na sinalização celular ou glicólise. Por outro lado, em meristemas tratados com cálcio, 8,3% das proteínas foram associadas ao metabolismo secundário, tradução, parede celular, maior metabolismo de carboidratos e atividade antioxidante, 16,6% estavam ligados à glicólise e sinalização, enquanto que 16,6% não possuíam anotação. A aplicação foliar de cálcio alterou significativamente o do ápice meristemático de cana-de-açúcar, reduzindo o acúmulo de proteínas importantes para o florescimento. O cálcio parece também melhorar a sinalização celular e a atividade antioxidante em meristemas. Foi observado ainda que o efeito do cálcio no proteoma é atenuado pelo tempo, sendo mais significativo na pré-indução. As proteínas identificadas neste estudo são fortes candidatas a estudos futuros visando sua aplicação como marcador molecular funcional envolvendo a regulação do florescimento da cana-de-açúcar associados ao uso do cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético desta cultura.

Palavras-chave: Cálcio, Cana-de-açúcar, Controle do florescimento, Espectrometria de massas, 2D-PAGE.

## Abstract

In sugarcane (*Saccharum* spp.), the conversion of apical meristem to plant breeding is an important step for the genetic improvement, however, it is undesirable in commercial production by consume sucrose to inflorescence development. This study aimed to identify differentially accumulated proteins in the apical meristem of the RB867515 cane variety under foliar application of calcium sulfate through 2D electrophoresis and mass spectrometry. Leaf application of calcium reduced by 20% the sugarcane flowering compared to control. In proteome analysis, a total of 60 differentially expressed proteins (DEPs) have been identified from 2D meristems profiles in pre and post-floral induction by PMF, of which 14 were found exclusively in meristems treated with calcium, 11 were identified only after floral induction, and 29 were common in both cases, but more abundant in meristems without application of calcium before floral induction. Gene ontologies (GO) associated with DEPs by biological process in the pre-induction revealed in meristems without calcium that 15.7% of the proteins were involved in transcription, 26.3% in the translation and 10.5% in cell signaling or glycolysis. On the other hand, in meristems treated with calcium, 8.3% of proteins were linked to secondary metabolism, translation, cell wall, increased metabolism of carbohydrates and antioxidant activity; 16.6% were linked to glycolysis and signaling, and 16.6% had no annotation. Calcium foliar applications significantly altered the meristematic proteome of sugarcane, reducing the accumulation of important proteins associated with the differentiation and reproductive development in plants. Calcium also appears to enhance cell signaling and antioxidant activity in meristems. It was observed that the effect of foliar calcium application in proteome appears to be attenuated by time. The proteins identified in this study are strong candidates for future studies aiming its use as a functional molecular marker involving control of sugarcane flowering associated with calcium, can help breeding programs of this culture.

Palavras-chave: Calcium, Flowering control, Mass spectrometry, Sugarcane, 2D-PAGE.

## Introdução

Em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), a conversão de meristema vegetativo para reprodutivo é uma etapa importante para o melhoramento genético, pois a inflorescência é usado cruzamento entre clones no sentido de se obter características desejáveis para a cultura (Glassop *et al.*, 2014). Por outro lado, a ocorrência do florescimento em cultivos comerciais é extremamente indesejada pelos produtores, uma vez que nesse processo a sacarose acumulada no colmo é desviada para o desenvolvimento da inflorescência. Como consequência, o crescimento da planta é paralisado, levando a perdas substanciais no rendimento em sacarose (Rodrigues, 1995).

O florescimento da cana-de-açúcar ocorre quando a planta percebe os sinais indutivos, os quais incluem fotoperíodo em torno de 12,5 h, boa disponibilidade hídrica e temperaturas entre 18 e 31°C. Além desses fatores, a nutrição, a maturidade fisiológica e uma quantidade mínima de colmos maduros (quatro colmos) também são limitantes para a indução do florescimento (Moore e Berding, 2014).

O conhecimento sobre os fatores envolvidos na indução do florescimento da cana são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias no sentido de controlar sua ocorrência em campo. Vários estudos já foram realizados na busca de soluções para o problema, como por exemplo, o controle do fotoperíodo (Rizk *et al.*, 2007), o uso de compostos à base de etileno como o etefon (Moore e Osgood, 1989), a supressão da irrigação (Humbert, 1974). Recentemente foi sugerida a aplicação foliar de cálcio, esse tratamento atrasou o início do florescimento e reduziu sua incidência em 40% (Endres *et al.*, 2015).

Quanto à base molecular do desenvolvimento da inflorescência, há pouca informação disponível para a cana-de-açúcar. Apesar disso, ocorreram alguns avanços, o maior deles se deu com o início de diversas pesquisas que culminaram na formação do banco de dados de sequências transcritas expressas da cana-de-açúcar, projeto SUCEST (Figueiredo *et al.*, 2001; Vettore *et al.*, 2003). A conclusão do sequenciamento completo do genoma de culturas como o arroz e o milho também tem auxiliado na compreensão da maioria dos genes e fatores de transcrição envolvidos na regulação do florescimento em gramíneas (Ciaffi *et al.*, 2011). Além disso, a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam o florescimento em espécies vegetais modelo como descrito em *Arabidopsis*, também tem sido crucial.

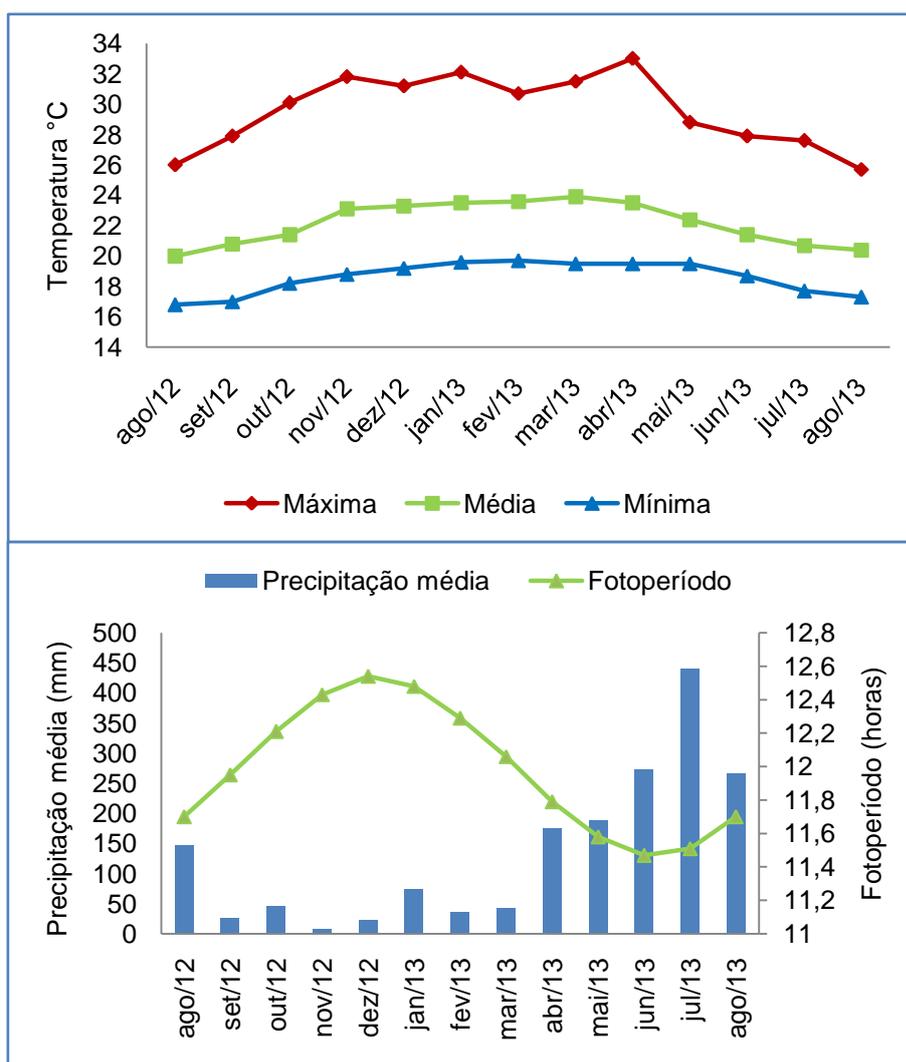
Nesse sentido, o que se conhece até o momento sobre os genes envolvidos na indução floral da cana foi extraído do projeto SUCEST, como por exemplo, a descoberta da presença de 21 genes pertencentes à classe MADS-box (Dornelas e Rodriguez, 2001), e a sugestão do modelo da via de indução fotoperiódica da cana (Coelho *et al.*, 2013), tendo como base o banco de dados de sequências transcritas expressas (ESTs) do projeto SUCEST, que através de análise comparativa de sequências de cana com outras gramíneas, constataram alta similaridade entre transcritos do genes *GIGANTEA (GI)*, envolvido com a integração de sinais do relógio circadiano em milho, e *FLOWERING LOCUS T (FT)* de arroz, que codifica uma proteína sintetizada na folha e que é transportada pelo floema até o meristema apical, considerada um florigeno. Além disso, descoberto que membros da família da proteína de ligação a fosfatidiletanolamina (PEBP), *FT* e *TFL1* de cana, alteram o tempo de floração e a arquitetura floral em *Arabidopsis thaliana* (Coelho *et al.*, 2014).

O conhecimento dos mecanismos que governam a transdução de sinais a diferentes estímulos endógenos e ambientais são de extrema importância na compreensão da transição floral da cana (Coelho *et al.*, 2014). Dada a especificidade na qual a cana percebe alguns sinais endógenos e ambientais para regular a transição para o desenvolvimento reprodutivo, espera-se que haja uma série de proteínas reguladoras atuando de forma coordenada no controle das diversas vias que culminam na expressão de genes de identidade de meristemas e diferenciação de órgãos florais. Nesse aspecto, o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um alvo interessante devido à complexidade de mecanismos com os quais esse íon interage dentro de várias organelas na célula (White e Broadley, 2003). Desta forma, uma melhor compreensão do papel do cálcio na redução do florescimento da cana será crucial para uma triagem de possíveis marcadores moleculares envolvidos na regulação da transição floral nesta cultura. A abordagem proteômica, neste caso, é uma estratégia importante por realizar uma análise aberta, o que proporciona a visualização global de todo o processo, e ainda pela vantagem da maior proximidade com o fenótipo. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar proteínas diferencialmente acumuladas no ápice meristemático da variedade de cana RB867515 influenciada pela aplicação foliar de cálcio através de eletroforese 2D e espectrometria de massas.

## Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em campo na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, Brasil (09° 14' 22" S ; 35° 50 11" W ; 480m de altitude).

Os dados climatológicos foram registrados por uma estação meteorológica automática localizada a 300m do experimento (Figura 1).



**Figura 1.** Médias mensais de temperaturas mínima, média e máxima (A), registradas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, AL (09° 14' 22" S ; 35° 50 11" W ; 480m de altitude). Precipitação pluviométrica (mm) e fotoperíodo (horas) do 15º dia do mês (B).

A variedade analisada foi a RB867515, quando cultivada em condições favoráveis, como as observadas na Serra do Ouro, a mesma apresenta florescimento profuso.

Os segmentos de colmos da referida variedade contendo uma gema, foram tratados termicamente a 50°C por 2 h para minimizar ocorrência de raquitismo das soqueiras (*Leifsonia*), e em seguida plantadas em caixas contendo substrato. Após 73 dias da brotação, as mudas foram transplantadas para o campo experimental.



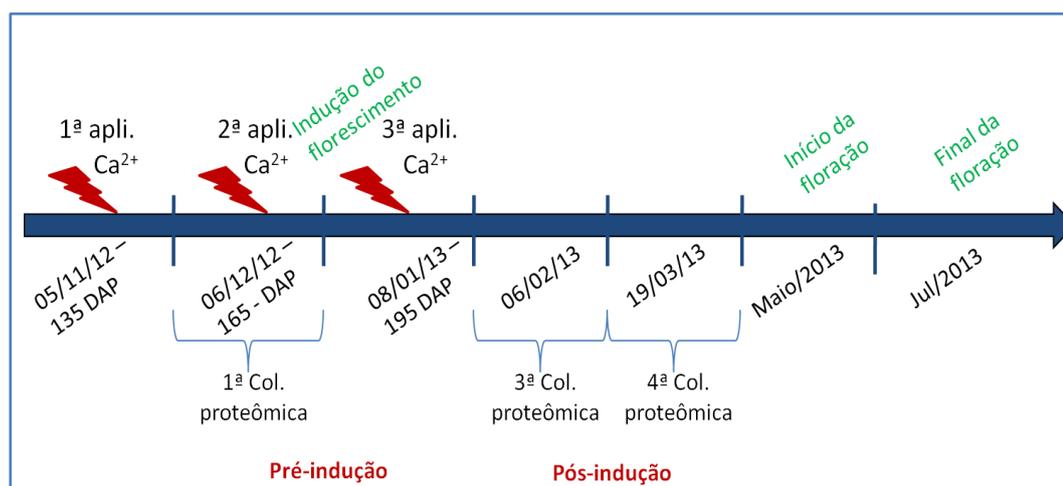
**Figura 2.** Ilustração de etapas do experimento: plantio em caixas (A), aplicação do tratamento no campo com pulverizador costal (B), experimento em campo (C), região do ápice meristemático da cana-de-açúcar, com destaque em vermelho (D).

O delineamento usado foi o de blocos casualizados com 30 parcelas. A parcela experimental foi composta por cada touceira, contendo em média 12 plantas/touceira, espaçadas 1,5 x 2,0 m

Para testar o efeito do cálcio no florescimento na cana foram montados os seguintes tratamentos:

- Pré e Pós-indução do florescimento sem cálcio - somente adubação convencional;
- Pré e Pós-indução do florescimento com cálcio - adubação convencional + aplicação foliar de 58,0 mM de  $\text{CaSO}_4$  (Cruz, 2010; Endres *et al.*, 2015).

As aplicações foliares de  $\text{CaSO}_4$  foram efetuadas com bomba costal aos 135, 165 e 195 dias após o plantio (DAP), pulverizando-se até o ponto de escoamento (Cunha *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Esquema de aplicação dos tratamentos e coletas para análise proteômica realizadas durante o experimento no período 2012/2013. Dias após o plantio (DAP)

Foi instalado um sistema de irrigação por micro aspersão para o fornecimento de água durante o experimento, o controle de plantas daninhas também foi realizado através de capina manual.

A quantificação de colmos florescidos iniciou em 08 de maio de 2013. A floração foi avaliada através da observação da emissão total da panícula pelo caule. A percentagem de floração por unidade experimental (touceira) foi

determinada pela relação entre o número de colmos com panículas e o número total de colmos x 100.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste *t* de Student usando o software Assistat 7.7 beta (Silva, 2006).

### **Extração de proteínas**

Na extração das proteínas foi usado o protocolo descrito por Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008), para tanto, foi realizado um *pool* contendo 20 ápices meristemáticos para cada tratamento, contendo aproximadamente 4,6 g de amostras, macerados com gelo seco em moinho criogênico e adicionados de 6 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, contendo 2-β mercaptoetanol 0,07% e acetona 100 %. O material foi homogeneizado e mantido sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 5 min. Em seguida, a solução foi mantida a -20°C por 3 h para precipitação das proteínas. Posteriormente o material foi centrifugado a 14.000xg a 4°C por 10 min e o sobrenadante descartado. Na próxima etapa, o precipitado foi lavado 2x em acetona 100% contendo 2-β mercaptoetanol 0,07% por centrifugação a 14.000xg a 4°C por 10 min. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. No próximo passo da extração, o *pellet* foi ressuspensão em 5 mL de tampão contendo (fenol, tris HCl 0,1 M pH 8,0) e SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, tris HCl 0,1 M pH 8,0 e 2-β mercaptoetanol 0,07%). Em seguida a mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 10.000xg por 5 min a 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 5 volumes de metanol contendo 0,1

M de acetato de amônio, após agitação em vortex o material foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitação das proteínas. Após esta etapa, as proteínas foram recuperadas por centrifugação a  $10.000\times g$  durante 5 min. Em seguida foram realizadas lavagens 2x em metanol 100% contendo 0,1 M de acetato de amônio e 2x em acetona 80%, após as lavagens o precipitado foi submetido a secagem em câmara de fluxo laminar e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises.

Após a extração, as amostras foram sonicadas 3x com amplitude de 50%, e realizados ciclos de 5s ligado/5s desligado.

## **Eletroforese Bidimensional**

### **Focalização isoeétrica (IEF)**

A IEF foi realizada em fita IPG de 11 cm e pH 3-10 não linear (GE Life Sciences) para 200  $\mu\text{g}$  de proteínas totais de meristemas do ápice da cana-de-açúcar dissolvidas em solução de ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A hidratação das fitas foi realizada em IPG-Box (GE Life Sciences) a temperatura ambiente por 18 h. As fitas foram focalizadas no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Life Sciences), em 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). Após a focalização, as fitas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização da segunda dimensão.

### **Eletroforese (2D-PAGE)**

Para a segunda dimensão (eletroforese), foram realizadas a redução e alquilação das fitas focalizadas anteriormente. Estas foram submetidas à redução

através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Decorrido esse tempo, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 min. 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 2:30 h; voltagem fixa de 300 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de  $\text{CaSO}_4$ . 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 18 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%).

### **Digitalização e análise de imagens**

Os géis foram digitalizados com auxílio de *scanner* de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences) calibrado para densidade ótica, utilizando-se o programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences) com os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 DPI e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie*. Para a captura da imagem foi realizada previamente uma etapa de calibração do scanner com a 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). Todas as triplicatas de géis de cada tratamento, ou réplicas técnicas, foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots* (manchas coradas delimitadas e representativas de proteínas), conforme (Pacheco *et al.*, 2013), com inspeção visual para eliminação de interferentes como bolhas e resíduos 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 ANOVA  $\leq 0,05$ . Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

### **Digestão com tripsina e preparo das amostras para MS**

Os *spots* com variação significativa entre tratamentos (proteínas com acúmulo diferencial estatisticamente significativo) foram excisados manualmente de uma das réplicas técnicas (géis) com auxílio de bisturi e incubados em solução descolorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% durante 18 h, em temperatura ambiente, para remoção do corante. Após desidratação em acetonitrila 100%, as proteínas (*spots*) sofreram redução e em seguida aquilação. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min a 60°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por 30  $\mu$ L de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida, os fragmentos foram mantidos no escuro por 30 min, a temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio e novamente

desidratados com acetonitrila 100%. Posteriormente a essas etapas, foram adicionados 30-50  $\mu\text{L}$  (até cobrir o fragmento de gel) de solução com 20 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina para digestão da proteína, e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados à solução anterior 30-50  $\mu\text{L}$  (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila], incubada por 1 h em gelo e centrifugada até 10.000xg para coleta e transferência do sobrenadante para outro tubo. A extração foi efetuada duas vezes. O sobrenadante de cada *spot* foi concentrado em concentrador a vácuo (*Speed-vac*, Eppendorf) e armazenado a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

### **Espectrometria de massas**

Os espectros MS e MS/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  $\alpha$ -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) e busca de íons (*ion search*, método LIFT). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

## **Análises de bioinformática**

### *Identificação presumível*

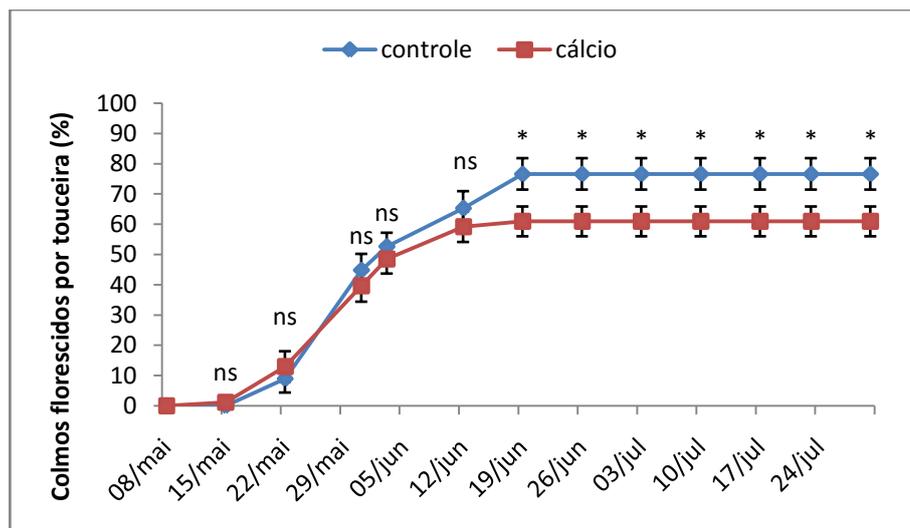
Para MS, os espectros foram identificados através da análise dos arquivos *peaklist.xml* no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (Saccharum\_7061), e Milho (Zea\_mays mays) disponibilizados em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton (<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo; e ii) Viridiplantae disponível na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de dados: Swissprot, Saccharum\_7061 ou Milho; taxonomia: Viridiplantae; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância 200 ppm. Para a análise de dados MS/MS, realizada 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 da 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.*, 2014), (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>) ajustado para base de dados de *A. 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 na comparação entre o controle e plantas tratadas com cálcio.

## **Resultados**

O início da emissão das panículas da cana-de-açúcar ocorreu no mês de maio de 2013, coincidindo com o aumento da umidade e diminuição do fotoperíodo, os quais são fatores comumente indutivos de florescimento em cana (Figura 1). Neste período foi observado um aumento significativo na taxa de floração, seguida por uma estabilização no número de inflorescências no mês de junho (Figura 4). As plantas tratadas com  $\text{CaSO}_4$  apresentaram taxa de florescimento 20% menor em relação ao controle (Figura 3).



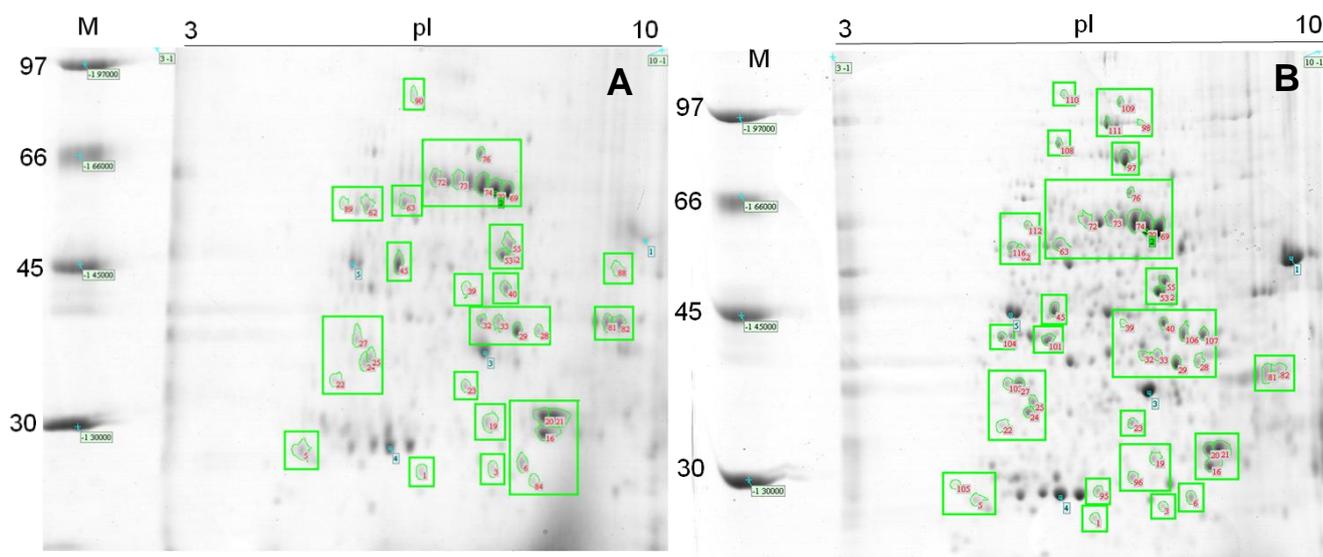
**Figura 4.** Percentagem de florescimento de colmos da variedade de cana-de-açúcar RB867515 nos meses de abril, maio e junho de 2014, submetidas à aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) aos 135, 165, e 195 dias após o corte, cultivadas na Estação de Floração e Cruzamento de cana-de-açúcar Serra do Ouro, no município de Murici - Alagoas. Médias no mesmo tempo representadas por \* a 5% de probabilidade pelo *t* de Student. ns - não significativo.

### Extração de proteínas

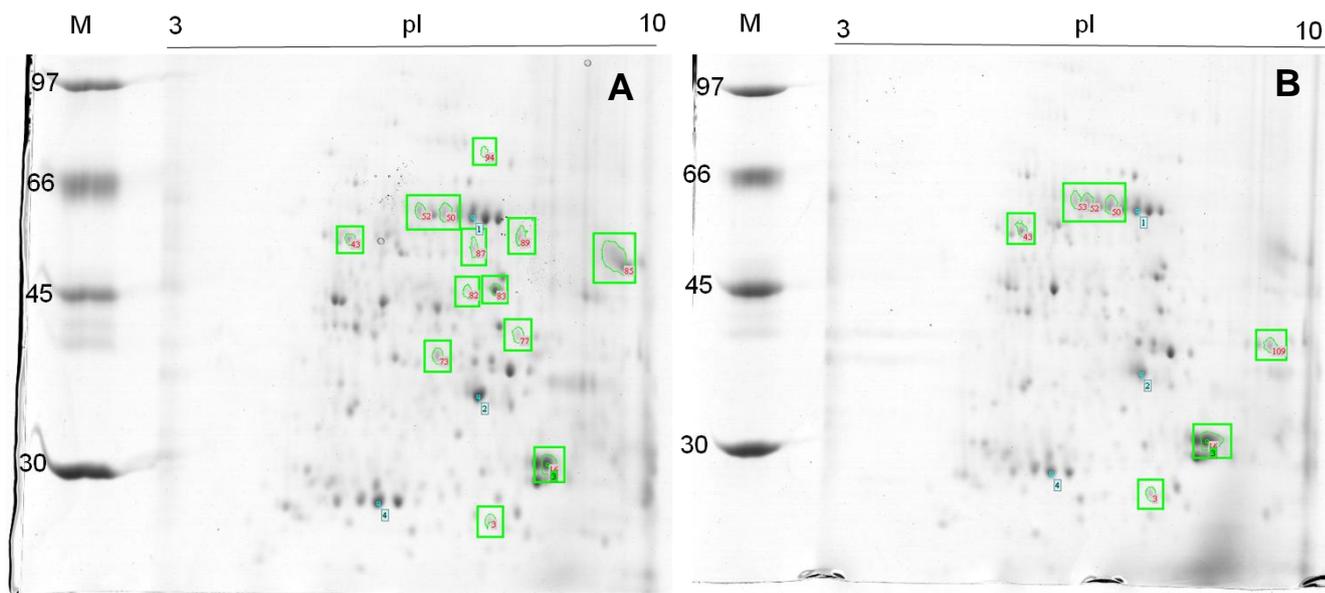
O protocolo descrito por Wang *et al.* (2003), com modificações de Pirovani *et al.* (2008), permitiu a recuperação e solubilização da maior parte das proteínas totais do ápice meristemático em grande amplitude de massa molecular, apontando para maior integridade e baixa concentração de interferentes. Foi preparado *pool* com 20 meristemas para cada tratamento, correspondendo a cada réplica biológica. O agrupamento das amostras visou obtenção de material suficiente para extração de proteínas, apesar da redução da variabilidade biológica (Karp *et al.*, 2005; Diz *et al.*, 2009). Uma vantagem dessa metodologia é a obtenção de amostra média da população biológica (tratamento), a qual permite análise em menor tempo e com menor consumo de material. No teste de quantificação proteica foi usado o kit 2D Quant (GE Life Sciences), obtendo-se  $4,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de extrato proteico para Pré- controle,  $4,23 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para Pré-Ca,  $4,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para Pós-Co e  $4,19 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para Pós-Ca.

### 6.2.2 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) para cada réplica biológica de cada tratamento, analisado para meristemas do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515, no período pré e pós-indução do florescimento, ambos com cálcio e sem cálcio (Figuras 5 e 7).



**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *matches* (*spots*) com variação significativa na % vol ou (ANOVA  $\leq 0,05$ ), utilizando extrato de proteínas totais do meristema do ápice caulinar da variedade RB867515 no período de pré-indução do florescimento. (A) Gel obtido de meristemas sem cálcio (Controle), (B) Gel obtido de meristemas com cálcio.



**Figura 6.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização dos *matches* (*spots*) com variação significativa na % vol ou (ANOVA  $\leq 0,05$ ), utilizando extrato de proteínas totais do meristema do ápice caulinar da variedade RB867515 no período de pós-indução do florescimento. (A) Gel obtido de meristemas sem cálcio (Controle), (B) Gel obtido de meristemas com cálcio.

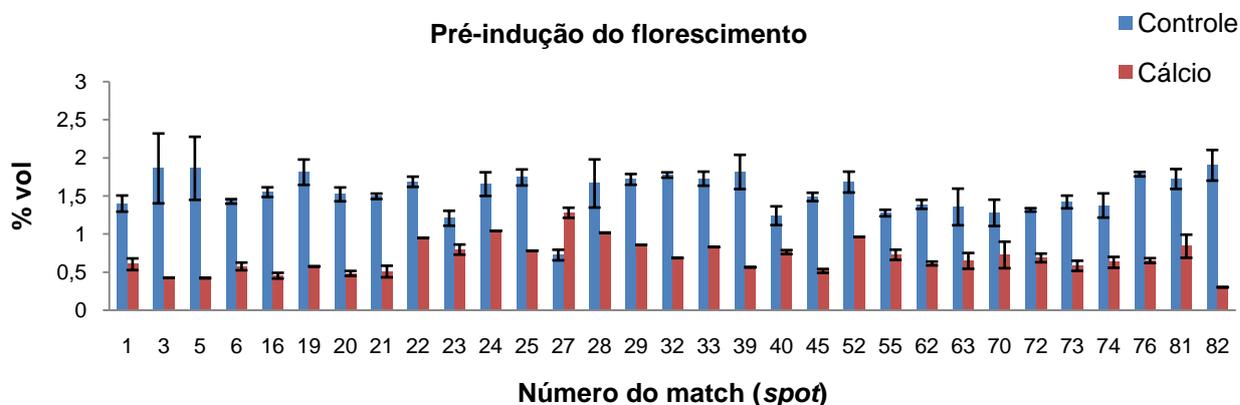
### Digitalização e análise de imagens

Os arquivos de imagem digitalizados e analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. demonstraram que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,959 no tratamento sem cálcio e 0,816 no tratamento com cálcio.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 927 *spots* nas amostras de réplicas técnicas na pré-indução do florescimento, distribuídos em média a 85 *spots*/gel (variando de 76 a 101) em meristemas sem cálcio (controle) e 223 *spots*/gel (variando de 215 a 233) em meristemas com cálcio. Já na pós-indução do florescimento, foram detectados 536 *spots* nas amostras de réplicas técnicas, onde o tratamento sem cálcio (controle) apresentou em média 106 *spots*/gel (variando de 62 a 159) enquanto que tratamento com cálcio teve uma média de 72 *spots*/gel (variando de 50 a 94).

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas na pré-indução do florescimento (Figura 5), foram detectados 117 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 23 foram detectados apenas em meristemas com cálcio e 12 foram detectados apenas em meristemas sem cálcio, já outros 81 foram comuns entre os tratamentos (Tabela 2). Dos *spots* denominados como comuns por terem sido detectados via 2D-PAGE em ambos os tratamentos, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na % vol ou (ANOVA  $\leq 0,05$ ).

Entre os 31 *matches* (*spots*) comuns na pré-indução que apresentaram variação significativa na % vol e (ANOVA  $\leq 0,05$ ), 30 tiveram maior acúmulo no tratamento controle, enquanto que apenas um teve maior acúmulo em meristemas com cálcio (Figura 6).



**Figura 7.** Variação em volume (%) dos *matches* (*spots*) comuns na pré-indução do florescimento em ápices meristemáticos da variedade de cana-de-açúcar RB867515, nos tratamentos sem cálcio (controle) e com cálcio com % vol  $\geq 1,5$  e (ANOVA  $\leq 0,05$ ).

Já na pós-indução do florescimento, foram detectados 120 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 49 foram detectados apenas em meristemas sem cálcio, enquanto 12 foram detectados exclusivamente em meristemas com cálcio e 59 foram comuns entre os tratamentos (Tabela 2). Com

base nas análises, foram selecionados para serem excisados do gel 66 *spots* considerados DEPs para identificação via MS.

**Tabela 1.** Total de *spots* selecionados com razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento sem cálcio (controle) e 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) nos períodos de Pré e Pós-indução do florescimento.

Descrição	Pré-indução		Pós-indução	
	sem cálcio	com cálcio	sem cálcio	com cálcio
Spots analisados	93	104	108	71
Média/réplica	85	223	106	72
Comuns	81	81	59	59
Maior acúmulo	67	14	13	46
	ANOVA $\leq 0,05$	32	1	0
	e Ratio $\geq 1,5$	30	1	3
Exclusivos <sup>1</sup>	12	23	49	12
	ANOVA $\leq 0,05$	4	16	8
DEPs <sup>2</sup>	34	17	8	7

<sup>1</sup> Detectados apenas em um dos tratamentos por 2D-PAGE.

<sup>2</sup> Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa  $\leq 0,05$  e Ratio  $\geq 1,5$  + exclusivos com ANOVA significativa  $\leq 0,05$ ).

### Espectrometria de massas (PMF, MS/MS)

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. Foram obtidos espectros de massa conforme descrito na Tabela 2. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, apenas seis 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 sequenciamento *de novo* das seis DEPs não identificadas resultou na identificação de uma proteína, totalizando 60 proteínas anotadas.

**Tabela 2.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação.

<b>Descrição</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
DEPs coletados	66	100
Analizados PMF	66	100
Analisáveis	60	90,9
Identificados <sup>1</sup>	59	89,3
Não identificados <sup>2</sup>	1	1,51
Analizados MS/MS		
Analisáveis	14	21,2
Identificados <sup>1</sup>	1	1,51
Não identificados <sup>2</sup>	13	19,7
Anotados	60	91
Não identificados	6	9

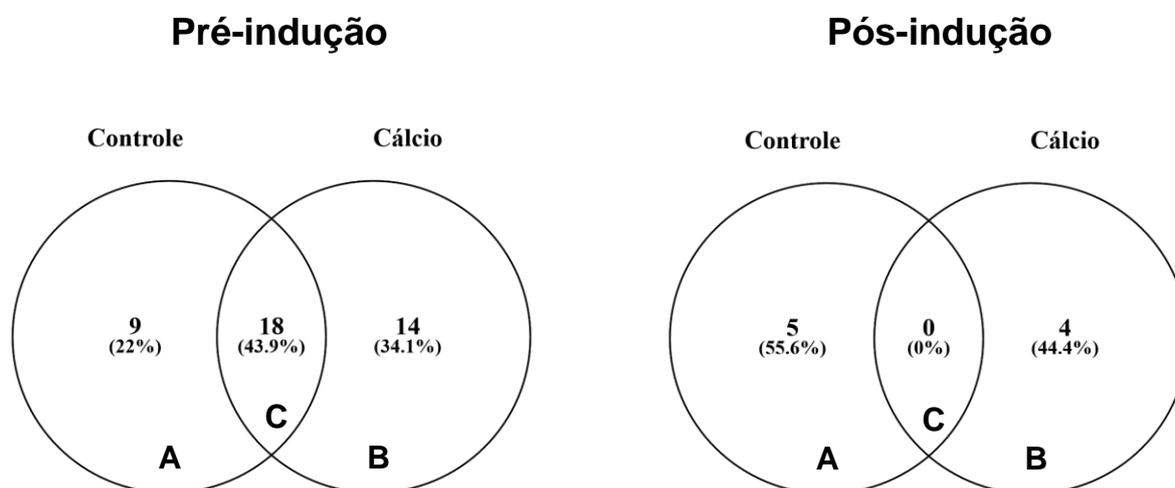
<sup>1</sup> Com score Mascot significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>2</sup> Sem score Mascot significativo ( $p > 0,05$ )

### **Análises de bioinformática**

Conforme descrito anteriormente (Tabela 2), *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 (*in silico*) e anotação em bancos de dados, para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos. A distribuição das anotações obtidas (Figura 8) demonstrou uma quantidade menor de DEPs em ambos os tratamentos na pré-indução e pós-indução do florescimento. Ao contrário do esperado para um diagrama de Venn com dados desse tipo, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados, não houve contabilização de proteínas com a mesma anotação entre os DEPs na pré-indução: oito anotações foram iguais para *spots* diferentes oriundos do controle (proteínas O49960, B6SKP5) enquanto que o mesmo ocorreu em quatro anotações para o tratamento com cálcio (proteínas S4UAT5, P08440). Já na pós-

indução, três proteínas tiveram a mesma anotação no tratamento com cálcio (proteína O49960).



**Figura 8.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos no meristema do ápice caulinar da variedade de cana-de-açúcar RB867515 nos tratamentos sem cálcio (controle) (A) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.

### Identificação presumível e anotação de DEPs

A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada nas Tabelas 4, 5 e 6, obtida através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF e/ou MS/MS no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ( $p \leq 0,05$ ). As proteínas foram presumivelmente discriminadas por taxonomia: Viridiplantae e organismos de origem: cana-de-açúcar e milho, de acordo com a maior similaridade estatística obtida com o programa Mascot.

**Tabela 3.** Distribuição da identificação obtida para DEPs selecionados, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.

<b>Descrição</b>	<b>Total</b>	<b>DEPs</b> %
Com identificação	60	100
Viridiplantae	19	31,6
Poaceae	45	75
<i>Saccharum</i>	21	36
Milho	20	33,3
Sem identificação	6	10

**Tabela 4.** Anotação presumível das DEPs comuns entre os tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pré-indução do florescimento, 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 sem cálcio (C) e no tratamento com cálcio (Ca<sup>2+</sup>). 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.

Match ID	Ratio Ca <sup>2+</sup> /C	ANOVA	Acesso	Proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Calc	Obs	Calc	Obs
1	0,430846	0,003663	C7E3V5	Superóxido dismutase	73/51	<i>Saccharum officinarum</i>	7,1	6,6	25.327	27.392
3	0,228433	0,023140	Q9LI74	Proteína CHUP1, cloroplástica	59/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,4	7,6	111.957	27.935
5	0,225598	0,016966	O49960	Polifenol oxidase	167/47	<i>Saccharum hybrid</i>	8,4	5	67.709	28.594
16	0,292254	0,000118	Q0WSY2	Filamento de proteína de planta 4	64/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,2	8,3	110.827	30.571
19	0,317191	0,003098	-	Proteína de desenvolvimento 1	98/51	<i>Saccharum hybrid</i>	6,6	7,5	30.709	31.365
20	0,317141	0,000426	B6SKP5	Proteína osmotina	88/62	<i>Zea mays</i>	7,5	8,3	27.198	31.880
21	0,339231	0,000297	B6SKP5	Proteína osmotina	87/62	<i>Zea mays</i>	7,5	8,5	27.198	31.842
22	0,563430	0,013364	-	Proteína de desenvolvimento 2	58/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6	5,5	63.483	34.261
23	0,659162	0,025473	-	Proteína de ubiquitinação 1	67/62	<i>Zea mays</i>	6,4	7,2	32.305	34.249
24	0,629501	0,026341	W0F9T0	Lactoglutationa liase	75/51	<i>Saccharum hybrid</i>	5,4	5,9	33.005	35.697
25	0,448141	0,006175	Q96542	Subunidade menor da ribulose bifosfato carboxilase	60/57	<i>Betula verrucosa</i>	8,9	5,9	20.776	36.270
27	1,767032	0,004455	D8L858	Provável proteína não caracterizada	52/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,6	5,4	66.619	33.047
28	0,611825	0,046049	K7UBU0	Desidrogenase da gliceraldeído-3 -fosfato, citosólica	81/62	<i>Zea mays</i>	6,5	8,2	32.029	39.400
29	0,498524	0,008215	P26517	Desidrogenase da gliceraldeído-3 -fosfato, citosólica 1	69/57	<i>Hordeum vulgare</i>	6,7	7,9	36.605	39.158
32	0,385274	0,002567	A0A096QV20	Proteína não caracterizada	65/62	<i>Zea mays</i>	6,2	7,4	34.543	40.163
33	0,479529	0,007569	-	Fator de transcrição 1	58/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,8	7,7	40.567	40.267
39	0,310122	0,005126	P85814	Triosefosfato isomerase (Fragmentos)	64/57	<i>Platanus orientalis</i>	8	7,2	8.987	43.866
40	0,614801	0,019172	Q9ZTP4	Zeta-caroteno desaturase, cloroplástica/cromoplástica	61/57	<i>Zea mays</i>	8,6	7,8	63.487	43.489
45	0,346771	0,000087	P12783	Fosfoglicerato quinase, citosólica	89/57	<i>Triticum aestivum</i>	5,6	6,5	42.153	45.655
52	0,572593	0,017557	O49960	Polifenol oxidase	161/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,4	7,8	67.709	48.182
55	0,570318	0,001045	Q75IP6	DNA-helicase 2 dependente de ATP subunidade KU80	64/57	<i>Oryza sativa</i>	7,5	7,8	77.964	50.093
62	0,441096	0,041230	P19023	ATP sintase subunidade beta, mitocondrial	136/57	<i>Zea mays</i>	6	5,8	59.181	56.340
63	0,477448	0,044724	K7VKM2	Peptidase subunidade beta	97/62	<i>Zea mays</i>	5,9	6,4	58.400	57.417
70	0,567522	0,006687	O49960	Polifenol oxidase	237/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,4	7,6	67.709	60.135
72	0,521120	0,022250	O49960	Polifenol oxidase	106/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,4	6,7	67.709	62.718
73	0,409720	0,000042	O49960	Polifenol oxidase	156/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,4	7,1	67.709	62.021

74	0,456818	0,020359	O49960	Polifenol oxidase	203/51	Saccharum hybrid	8,4	7,4	67.709	61.230
76	0,364504	0,006071	P46646	Aspartato aminotransferase, citoplasmática isoenzima 2	60/57	Arabidopsis thaliana	6,1	7,4	44.615	68.778
82	0,158075	0,000562	-	Proteína de transdução de sinal	59/57	Arabidopsis thaliana	6,2	9,4	44.306	40.227

Excl./C, exclusivo ou detectado apenas no tratamento sem cálcio (controle). Excl./Ca<sup>2+</sup>, exclusivo ou detectado apenas no tratamento com cálcio.

**Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs exclusivos nos tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pré-indução do florescimento, 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 sem cálcio (C) e no tratamento com cálcio (Ca<sup>2+</sup>). 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

Match ID	Ratio Ca <sup>2+</sup> /C	ANOVA	Acesso	Proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Calc	Obs	Calc	Obs
84	excl./C	0,017720	O80970	Proteína NPY2 contendo o domínio BTB/POZ	64/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,6	8,2	71.004	27.194
88	excl./C	0,004837	B8A063	Proteína não caracterizada	114/62	<i>Zea mays</i>	8,8	9,3	47.271	46.828
89	excl./C	0,002672	Q9SF38	Proteína contendo repetição pentatricopeptídeo At3g09650, cloroplástica	67/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,6	5,5	87.704	56.938
90	excl./C	0,000211	Q2QLY5	5-metiltetrahydropteroltriglutamato--homocisteína metiltransferase 1	61/57	<i>Oryza sativa</i>	5,9	6,4	84.874	87172
95	excl./Ca2+	0,000173	S4WDN5	Ascorbato peroxidase	110/51	<i>Saccharum hybrid</i>	5,7	6,6	27.556	27.916
96	excl./Ca2+	0,000013	-	Proteína de ubiquitinação 2	73/62	<i>Zea mays</i>	6,6	7	27.164	29.175
97	excl./Ca2+	0,017260	A0A059Q1B2	Fenilalanina amônia liase	229/51	<i>Saccharum hybrid</i>	6,2	7,1	76.374	70.972
98	excl./Ca2+	0,014225	S4UAT5	Sacarose sintase 1	63/51	<i>Saccharum officinarum</i>	6	7,2	93.492	95.731
101	excl./Ca2+	0,000663	P80607	Proteína alfa-1,4-glucano sintase [formando UDP]	62/57	<i>Zea mays</i>	5,8	5,9	41.691	41.810
103	excl./Ca2+	0,005507	Q9SM49	Piruvato descarboxilase (Fragmento)	52/51	<i>Saccharum officinarum</i>	5	5,4	23.811	36.247
104	excl./Ca2+	0,001739	Q9XGC6	Adenosina quinase (Fragmento)	105/62	<i>Zea mays</i>	5,2	5,3	36.465	42.912
105	excl./Ca2+	0,026152	Q9FHF9	Proteína contendo repetição pentatricopeptídeo At5g46460, mitocondrial	58/58	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,9	4,7	80.137	28.846
106	excl./Ca2+	0,000055	P08440	Isoenzima frutose-bisfosfato aldolase, citoplasmática	128/62	<i>Zea mays</i>	7,5	7,8	39.036	40.749
107	excl./Ca2+	0,000023	P08440	Isoenzima frutose-bisfosfato aldolase, citoplasmática	64/52	<i>Zea mays</i>	7,5	8	39.036	40.562
108	excl./Ca2+	0,008821	Q9SEH3	Proteína Ras RABD2c	60/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,3	6,2	22.532	79.390
109	excl./Ca2+	0,000221	K7VQ65	Provável proteína da família do fator de alongação da tradução	70/62	<i>Zea mays</i>	6	6,3	94.872	101.516
110	excl./Ca2+	0,012169	A0A059Q2L7	Quinase associada à parede	52/51	<i>Saccharum hybrid</i>	5,7	5,7	56.733	59.223
111	excl./Ca2+	0,000215	S4UAT5	Sacarose sintase 1	164/51	<i>Saccharum officinarum</i>	6	8,5	93.492	31.948
112	excl./Ca2+	0,000420	O04616	Proteína não caracterizada At4g01150, cloroplástica	58/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,2	8,6	17.743	30.427
116	excl./Ca2+	0,004477	A0A075E2Q1	UDP-glicose-pirofosforilase	82/51	<i>Saccharum hybrid</i>	5,2	6,4	52.431	37.105

Excl./C, exclusivo ou detectado apenas no tratamento sem cálcio (controle). Excl./Ca<sup>2+</sup>, exclusivo ou detectado apenas no tratamento com cálcio.

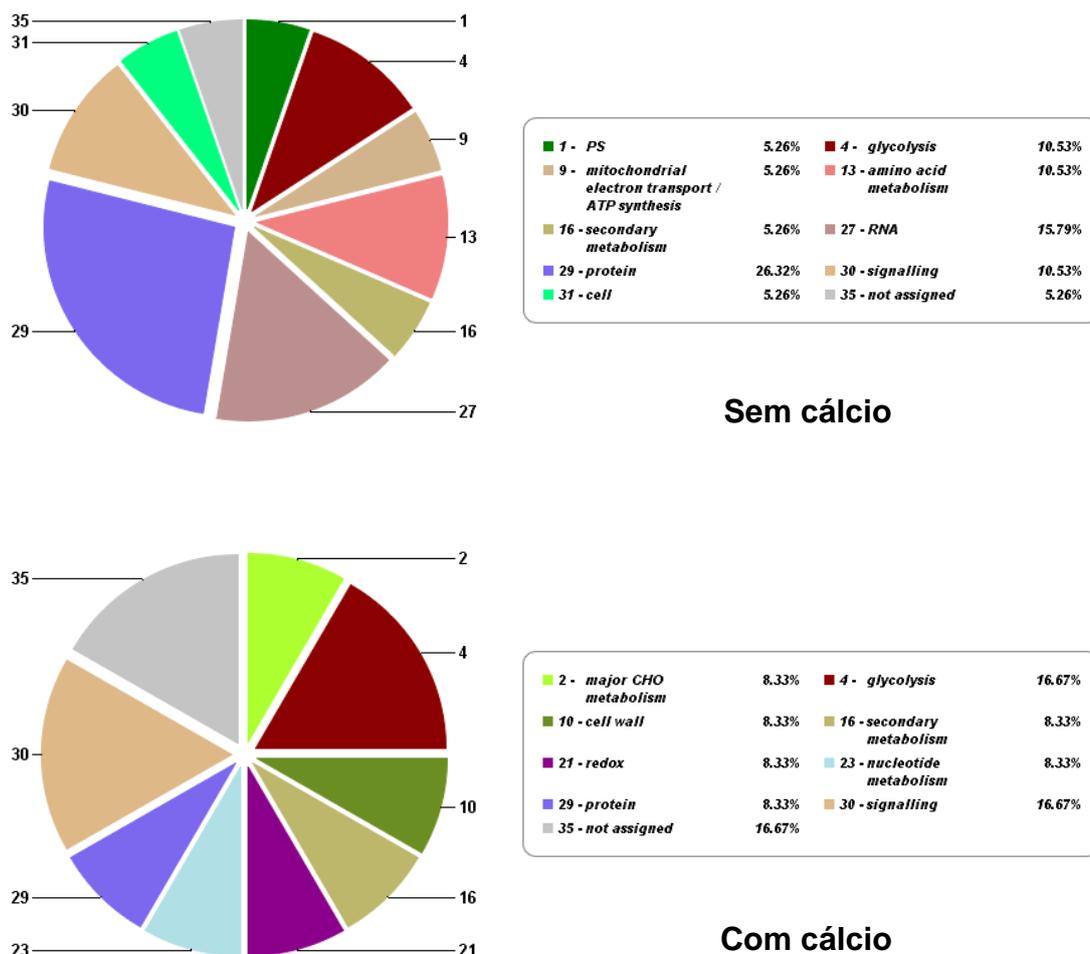
**Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs comuns e exclusivos nos tratamentos sem cálcio (controle) e com aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>), obtidos de meristemas do ápice caulinar da cana-de-açúcar na pós-indução do florescimento, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento sem cálcio (C) e no tratamento com cálcio (Ca<sup>2+</sup>). 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

Match ID	Ratio Ca <sup>2+</sup> /C	ANOVA	Acesso	Proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Calc	Obs	Calc	Obs
73	excl./C	0,007886	B4FZU8	Malato desidrogenase	64/62	<i>Zea mays</i>	8,23	6,7	35.492	39.681
77	excl./C	0,012661	P08440	Isoenzima frutose-bisfosfato aldolase, citoplasmática	78/62	<i>Zea mays</i>	7,52	7,9	39.036	41.099
83	excl./C	0,012555	Q1KVT6	Proteína ribossômica 50S L23, cloroplástica	59/58	<i>Acutodesmus obliquus</i>	10,2	7,6	10.496	46.062
85	excl./C	0,004461	B6UJH4	Fator de alongação alfa 1	67/62	<i>Zea mays</i>	9,14	9,4	49.616	50.375
89	excl./C	0,007755	A0A059Q0P7	Serina hidroximetiltransferase	115/51	<i>Saccharum hybrid</i>	7,13	8	52.087	55.138
3	2,660081	0,023329	Q9LI74	Proteína CHUP1, cloroplástica	59/57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,43	7,5	111.957	26.484
16	1,686417	0,032194	B6SKP5	Proteína osmotina	87/62	<i>Zea mays</i>	7,51	8,2	27.198	30.376
43	1,733903	0,045914	P19023	ATP sintase subunidade beta, mitocondrial	123/58	<i>Zea mays</i>	6,01	5,5	59.181	55.472
50	2,178634	0,014904	O49960	Polifenol oxidase	206/57	<i>Saccharum hybrid</i>	8,41	6,9	67.709	61.088
52	2,047437	0,006245	O49960	Polifenol oxidase	114/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,41	6,5	67.709	62.241
53	2,336990	0,009240	O49960	Polifenol oxidase	115/51	<i>Saccharum hybrid</i>	8,41	6,3	67.709	63.497

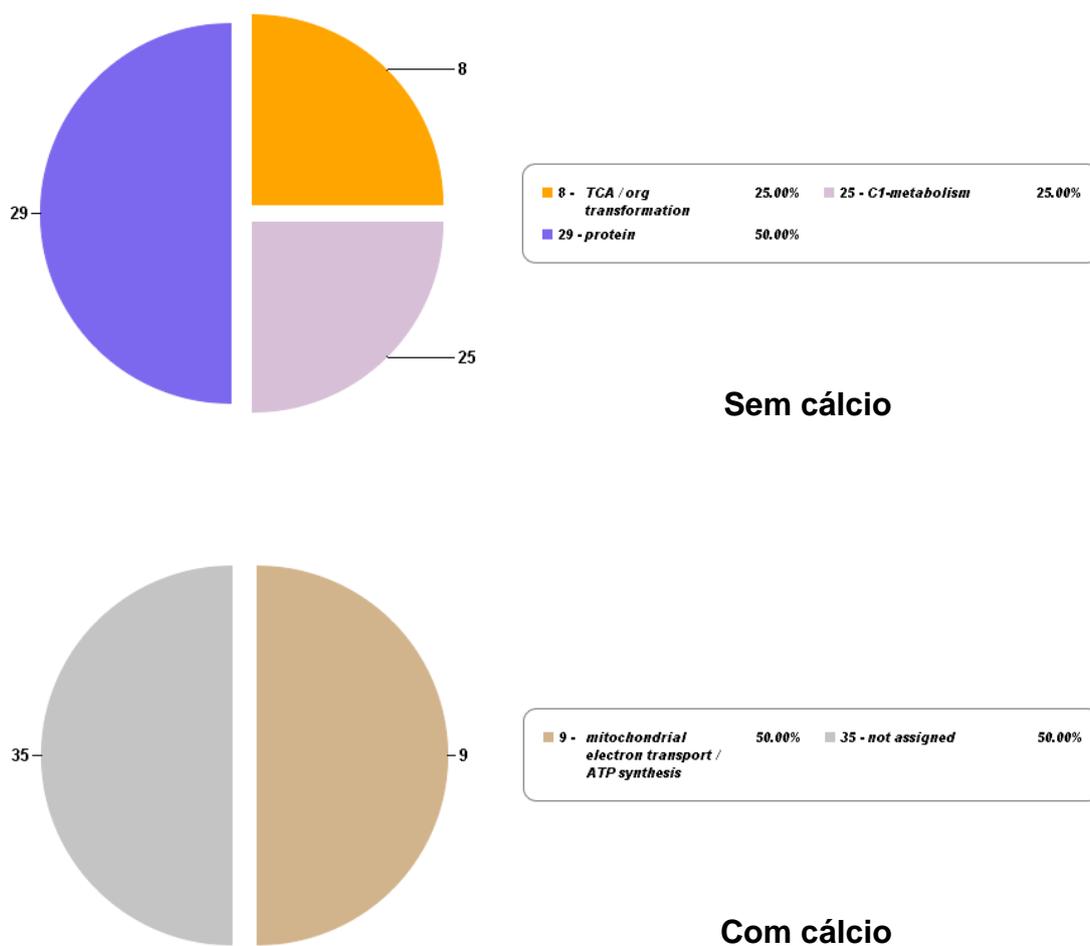
Excl./C, exclusivo ou detectado apenas no tratamento sem cálcio (controle). Excl./Ca<sup>2+</sup>, exclusivo ou detectado apenas no tratamento com cálcio.

### **Ontologia gênica (GO)**

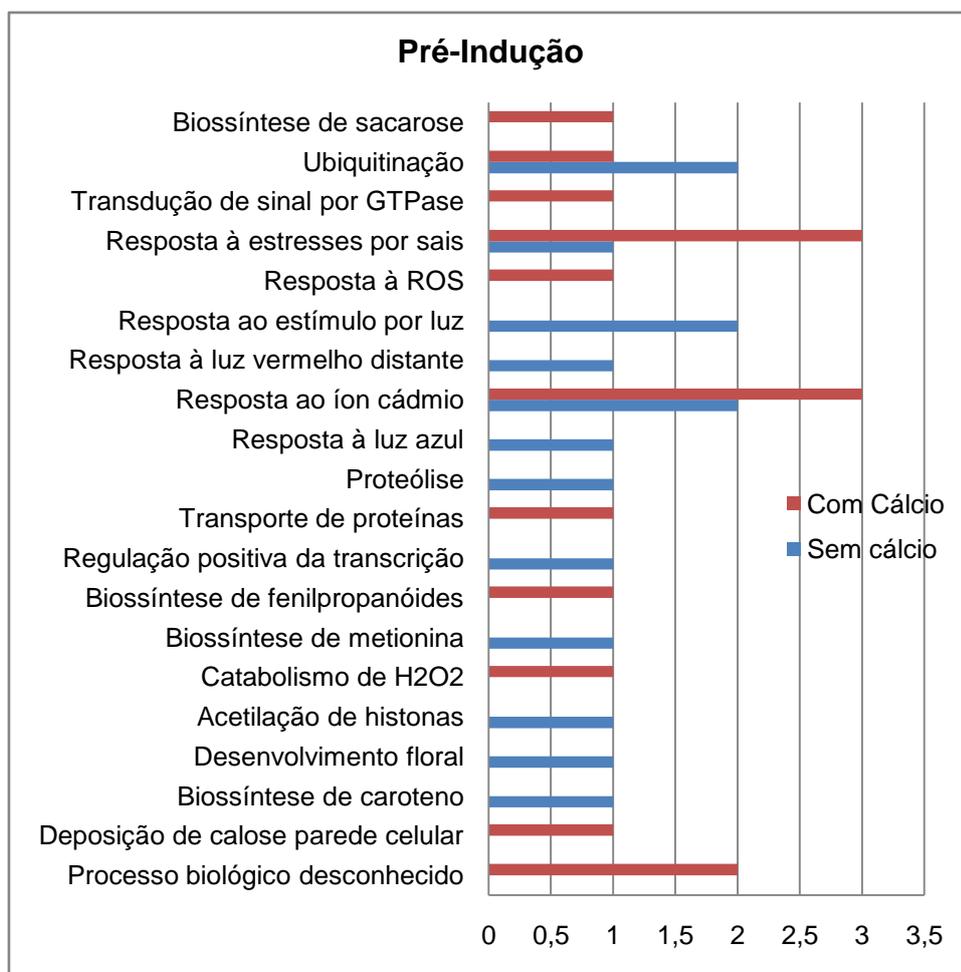
No mapeamento dos acessos UniProt identificadores das proteínas similares às DEPs anotadas (Tabelas 4 e 5) junto ao banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, para viabilizar a análise de ontologia gênica no programa Mercator, foi verificada associação significativa para 19 das 32 (59,3%) DEPs mais acumuladas durante a Pré-indução em meristemas sem cálcio (controle), e para 12 das 17 (70,5%) DEPs mais acumuladas no tratamento com cálcio. Já na Pós-indução, foi observada associação significativa para 4 das 5 (80%) DEPs mais acumuladas no controle, e para 2 das 6 (33%) mais acumuladas em meristemas com cálcio.



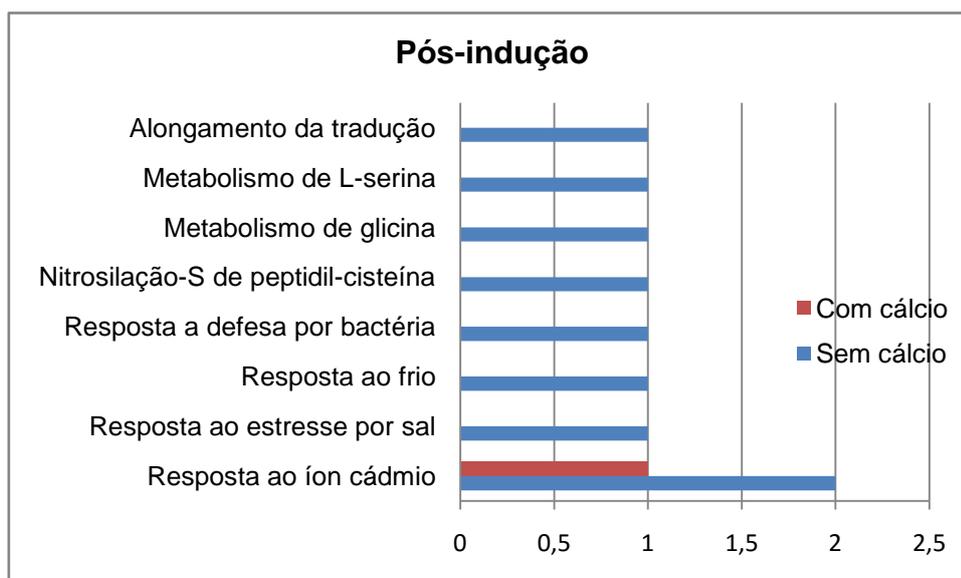
**Figura 9.** Categorização da ontologia gênica dos DEPs de meristemas do ápice da cana-de-açúcar expressa durante a pré-indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). Os números ligados aos setores do 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, encontrado para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento.



**Figura 10.** Categorização da ontologia gênica dos *DEPs* de meristemas do ápice da cana-de-açúcar na pós-indução do florescimento expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ). 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, encontrado para cada conjunto de *DEPs*, de cada tratamento.



**Figura 11.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais em meristemas do ápice da cana-de-açúcar durante a Pré- indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>).



**Figura 12.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais em meristemas do ápice da cana-de-açúcar durante a Pós-indução do florescimento, expressos nos tratamentos sem cálcio (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>).

## Discussão

Do total representando proteínas distintas na pré-indução, 49 *spots* ou 24,8% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS. Na pós-indução, apenas 15 *spots* ou 8,3% foram considerados DEPs. Em ambos os períodos, menos da metade do conjunto de proteínas analisadas mostrou-se diferencial entre os tratamentos com ou sem cálcio, através da metodologia 2D-PAGE, favorecendo muito pouco a detecção de proteínas mais abundantes na amostra biológica.

Apenas seis das 66 DEPs não resultaram em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi 90,9%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos.

### Identificação presumível e anotação das DEPs

Quase 1/3 das DEPs foi anotada especificamente como proteína do complexo *Saccharum*, reforçando a identificação apesar de o banco de dados de cana-de-açúcar utilizado, possuir apenas 7.062 sequências de proteínas e o banco de dados Viridiplantae ter 547.357 sequências de proteínas. As demais DEPs de cana-de-açúcar mostraram-se similares à proteínas de outras espécies vegetais, notadamente gramíneas (mais de 75% do total de DEPs) dentre as quais, as 20 identificadas no banco de milho *Zea\_Mays* *Mays*.

As proteínas identificadas foram organizadas por período (pré e pós-indução) e categorizadas em proteínas relacionadas à ubiquitinação, metabolismo (antioxidante, energético, secundário), fatores de transcrição, transdução de sinais, desenvolvimento e proteínas associadas à parede celular.

## DEPs na pré-indução

### *Ubiquitinação*

A ubiquitinação de proteínas é um mecanismo crítico de pós-tradução que regula diversos processos celulares e vias de transdução de sinal em eucariotos (Vierstra, 2003). A proteína de ubiquitinação 1 foi identificada no tratamento controle. Essa proteína atua como reguladora chave no processo de indução do florescimento. Em *A. thaliana*, por exemplo, já foi demonstrado que a degradação de proteínas mediada por ubiquitina regula a estabilidade dos componentes-chave do relógio circadiano e da via de floração fotoperiódica, provavelmente através da ação dependente de *CONSTANS (CO)* (Cui *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2011) mostraram que essa proteína age em conjunto com outros genes e proteínas para manter a inflorescência e funções do meristema floral. A proteína de ubiquitinação 1 teve maior acúmulo no controle e a aplicação foliar de cálcio diminuiu sua abundância no meristema. Por outro lado, identificamos a proteína de ubiquitinação 2 exclusivamente em meristemas com cálcio, sugerindo que a aplicação deste nutriente altera a forma de ubiquitinação no meristema, podendo alterar a regulação de proteínas envolvidas com o florescimento. Também foi detectado exclusivamente em meristemas sem cálcio (controle) a proteína NPY2 contendo o domínio BTB/POZ (O80970). Os genes que codificam essa proteína foram inicialmente associados à regulação de auxina (Cheng *et al.*, 2008), constataram que genes *npv* mutantes apresentavam falhas em primórdios foliares, e identificaram o gene *NPY2* apenas em meristemas radiculares. Entretanto, proteínas contendo o domínio BTB/POZ parecem estar relacionadas ao direcionamento para ubiquitinação (Sadanandom *et al.*, 2012), o que parece corroborar com a atividade proteolítica no tratamento controle o qual

demonstrou aumento na expressão da proteína de ubiquitinação 1 e na proteína peptidase beta (K7VKM2).

#### *Metabolismo antioxidativo*

A proteína superóxido dismutase, SOD (C7E3V5), foi identificada com maior acúmulo no controle, essa enzima constitui a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, ROS (Fridovich, 1986). Sua atividade tem sido relatada como termoestabilizadora em tecidos florais (Carter e Tornburg, 2000; Sundaram *et al.*, 2009). Por outro lado, a proteína ascorbato peroxidase, APX (S4WDN5) foi detectada exclusivamente em meristemas com cálcio. Ela é considerada a principal enzima antioxidante envolvida na limpeza de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando as plantas estão sob estresse (Apel e Hirt 2004). A função antioxidante da APX na homeostase pode desempenhar um papel crítico na indução floral associados ao estresse ambiental (Considine e Foyer, 2014), muito comum em condições de campo. Além disso, já foi relatado que o cálcio alivia o dano oxidativo (Wang *et al.*, 2009). Em um experimento envolvendo a aplicação foliar de 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) em duas gamíneas C<sub>3</sub> submetidas a estresse térmico, (Jiang e Huang, 2001) notaram que plantas tratadas com cálcio apresentaram maior atividade da APX que as plantas não tratadas, enquanto que não foi observada alteração na atividade da SOD. Ambas as enzimas foram detectadas em meristemas tratados com cálcio. Apesar da SOD ter sido menos abundante com o cálcio, a atividade da APX pode ter sido estimulada por este nutriente, sugerindo que o cálcio parece melhorar o sistema de detoxificação por ROS no meristema apical da cana durante o período de indução floral.

### *Metabolismo/Energia*

A enzima gliceraldeído-3-P desidrogenase, citosólica (G3PDH) (K7UBU0, P26517), foi detectada duas vezes em meristemas sem cálcio. Ambas realizam a conversão de gliceraldeído-3-P para 1,3-bisfosfoglicerato, tal reação é essencial na glicólise e para manutenção dos níveis de ATP e metabolismo de carboidratos na célula (Guo *et al.*, 2014). Duas outras enzimas da via glicolítica, a triose fosfato isomerase (P85814) e fosfoglicerato quinase, citosólica (P12783), também foram mais abundantes em meristemas sem cálcio, o que sugere elevada taxa de atividade metabólica, podendo estar associada a diferenciação do meristema vegetativo para floral.

A identificação da proteína ATP sintase subunidade beta, mitocondrial (P19023), mais acumulada em plantas sem cálcio, reforça a hipótese de que o maior gasto metabólico e energético no controle é uma consequência do processo de transição floral nesse tratamento, concordando com o observado por (Kaur *et al.*, 2015) em meristemas de bambu. Por outro lado, a aplicação de cálcio pareceu diminuir a atividade de enzimas da glicólise no período de indução do florescimento, coincidência ou não, as proteínas comuns anotadas como envolvidas na via glicolítica, apresentaram menor acúmulo em meristemas com cálcio. Por outro lado a aplicação de cálcio parece ampliar as vias de produção de energia na célula, nesse tratamento a proteína piruvato descarboxilase (Q9SM49), e frutose bisfosfato aldolase, citoplasmática (P08440) foram detectadas exclusivamente. Ambas são enzimas chaves para a produção de energia em condições de anaerobiose (Andrews *et al.*, 1994; Gass *et al.*, 2005).

### *Metabolismo/Parede celular*

A sacarose sintase, SuSy (S4UAT5), foi duas vezes identificada exclusivamente em meristemas tratados com cálcio, é uma enzima que catalisa a formação de UDP-glicose e frutose a partir de sacarose. A via de formação de frutose a partir da SuSy, atua na sinalização para ativação de invertases (Koch, 2004), porém também é um fator chave na formação de UDP-glicose para biossíntese de parede celular (Fleming, 2006). Além dessa enzima, a  $\alpha$ -1,4-glucano sintase (P80607), que catalisa glicose a partir de UDP-glicose, também foi verificada apenas quando o cálcio foi aplicado, acompanhado de uma UDP-glicose-pirofosforilase, UDPase, (A0A075E2Q1), enzima que catalisa a produção UDP-glicose, e necessária para a síntese de sacarose, celulose e formação de calose (Kleczkowski *et al.*, 2010). Esse conjunto de proteínas exclusivas no tratamento com cálcio, sugere que SuSy, UDPase e Alfa-1,4-glucano sintase estejam atuando na síntese de UDP-glicose para a formação de parede celular em meristemas com cálcio. Estudos demonstram que a adição de cálcio aumenta a síntese de celulose ou calose (Amor *et al.*, 1995), e que este nutriente também está envolvido na fosforilação de sítios específicos da sacarose sintase através de proteínas quinases dependentes de cálcio, CDPKs (Hardin *et al.*, 2003; Hardin *et al.*, 2004) podendo ativar ou inativar a atividade dessa enzima. A quinase associada à parede (A0A059Q2L7), identificada exclusivamente em meristemas com cálcio, muito provavelmente está envolvida na sinalização desse processo.

### *Metabolismo secundário*

Em meristemas sem cálcio, foram identificadas oito proteínas como envolvidas com o metabolismo secundário. Seis dessas proteínas foram anotadas

como polifenol oxidases, PPO, (O49960), essas enzimas catalisam uma série respostas fisiológicas das plantas, dentre as quais, senescência, dano por ferimentos (Araji *et al.*, 2014) e coloração de flores. Foi relatado que uma de suas funções na coloração de flores é a síntese de aureusidina, uma polifenol oxidase precursora da biossíntese de auroa, responsável por conferir cor escura aos tecidos de plantas quando expostas ao ar (Nakayama *et al.*, 2000). Além disso, demonstrou-se que o gene TobP1 codifica uma proteína homóloga PPO, que é regulada durante o desenvolvimento de pistilos e estames de tabaco (Goldman *et al.*, 1998). Além das PPOs, uma zeta-caroteno desaturase, cloroplástica/cromoplástica, ZDS, (Q9ZTP4), mostrou-se mais abundante no controle. Essa enzima realiza a dessaturação de caroteno uma via essencial na biossíntese de carotenoides, os quais atuam na formação de pigmentos acessórios na fotossíntese, fotoprotetores contra danos foto-oxidativos (Matthews *et al.*, 2003), e na coloração de flores (Tanaka *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015). O acúmulo de ambas proteínas, PPO e ZDS, diminuíram no meristema após a aplicação de cálcio, sob condições indutivas de florescimento, enquanto que no controle a atividade de tais enzimas parece seguir o caminho normal para síntese de carotenoides.

A lactoilglutathione liase (W0F9T0) também foi detectada no tratamento sem cálcio, tem sido associada principalmente à detoxificação baseada em glutathione de metilglioxal, um produto tóxico produzido durante o metabolismo de carboidratos e aminoácidos e também acumulado durante estresses abióticos (Yadav *et al.*, 2005; Witzel *et al.*, 2009).

A proteína fenilalanina amônia-liase, PAL (A0A059Q1B2) foi detectada exclusivamente em meristemas tratados com cálcio, é uma enzima chave que

inicia a via de fenilpropanoides, desempenhando papéis fundamentais no desenvolvimento das plantas e na proteção contra estresses ambientais (Zhang e Liu, 2015). Dentre as suas funções, estão a regulação da via de compostos fenólicos e flavonóides (Ohl *et al.*, 1990), em especial, a síntese de lignina, um componente estrutural depositado nas paredes de células mais espessas (secundária), tornando-a rígida e impermeável, conferindo suporte mecânico e gerando um ambiente hidrofóbico, fundamental para a condução de água e nutrientes (Vanholme *et al.*, 2010). Além disso, a sua biossíntese é estimulada sob condições de estresses bióticos e abióticos, tais como ferimentos, infecção por patógeno, estresse metabólico, e perturbações na estrutura da parede celular (Boerjan *et al.*, 2003).

Quanto ao desenvolvimento reprodutivo, foi sugerido inicialmente que a PAL induz a produção de fenilpropanóides, estimulando a floração de *Pharbitis nil* sob condições fotoperiódicas não indutivas (Hirai *et al.*, 1994), anos mais tarde foi descoberto que a indução de *P. nil* em condições de estresse, é regulada por ácido salicílico, o qual é promovido pela PAL (Wada *et al.*, 2014), mas também são necessários para o desenvolvimento do pólen e correto crescimento do tubo polínico, na proteção de tecidos sensíveis à radiação ultravioleta, e atuam como antioxidantes e quelantes de metais. Dentro da flor o seu papel principal é a síntese de pigmentos com diferentes classes de flavonoides contribuindo para diferentes cores (Glover, 2007).

Em relação ao cálcio, tem sido relatado que esse nutriente altera a atividade da PAL, e em consequência compostos fenólicos e lignina radicular (Teixeira *et al.*, 2006), segundo estes pesquisadores o incremento de cálcio diminuiu a atividade da PAL, reduzindo o conteúdo de lignina em raízes de soja.

Por outro lado, foi constatado que a deficiência de cálcio diminuiu o conteúdo de compostos fenólicos de raízes de trigo em 10%, reduzindo a lignificação desses tecidos, enquanto que nos meristemas apicais, foi notado aumento de 20% na composição de tais compostos influenciados pela atividade da PAL através da via chiquimato (Meravý, 1979).

Apesar do papel da PAL está bem documentado na literatura, estudos correlacionando sua atividade no meristema apical e conseqüente efeito no florescimento, ainda escassos, entretanto, sua atividade parece estar relacionada com as proteínas associadas à parede celular, detectadas exclusivamente em meristemas tratados com cálcio. Dessa forma, é provável que a ação da PAL esteja sendo direcionada para a síntese de lignina em primórdios foliares ou colmos imaturos produzidos pelo meristema apical.

#### *Fatores de transcrição*

O fator de transcrição 1 foi mais abundante no controle. Tais fatores de transcrição constituem um dos maiores grupos de fatores de transcrição em plantas. O fator de transcrição 1, regula diversas respostas das plantas, incluindo a resistência à doenças (Gutterson e Reuber, 2004), resposta ao desenvolvimento, como a abscisão do pedicelo da flor (Nakano, *et al.*, 2014), estresses bióticos e abióticos (Mizoi *et al.*, 2012; Dey e Vlot, 2015).

Além disso, é um importante fator de regulação da transição da fase vegetativa para a reprodutiva (Ogawara, *et al.*, 2003). Em arroz por exemplo, foi constatado que a superexpressão do fator de resposta ao etileno (*ERT2*) em plantas, diminuiu a sensibilidade de plantas transgênicas ao hormônio etileno, atrasando a floração. Por outro lado, mencionaram que um mutante *etr2*, revelou maior

sensibilidade ao etileno, apresentando floração precoce (Wuriyangan *et al.*, 2009). Essa resposta do arroz, geralmente ocorre durante estresse abiótico, na qual a planta inibe a iniciação floral como uma estratégia de sobrevivência quando em quiescência (Peña-Castro *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento com etileno, frequentemente aplicados na forma de ethephon, é usado para regular a maturação e a floração de plantas, a exemplo da cana-de-açúcar (Li e Solomon, 2003). Já outro domínio do fator de transcrição 1, desempenha um papel central no estabelecimento do meristema floral, na especificação da identidade de órgão floral, e na regulação da expressão gênica homeótica floral (Jofuku *et al.*, 1994; Pelaz *et al.*, 2000). Em *A. thaliana*, a regulação desse fator de transcrição pelo microRNA, miR172, é crucial para o normal desenvolvimento da flor de *Arabidopsis*, sendo provável sua conservação entre as espécies de plantas (Mlotshwa *et al.*, 2006). Também foi observado que a sobre expressão de miR172 causa floração precoce e interrompe a especificação de identidade de órgãos florais (Aukerman e Sakai, 2003). O fator de transcrição 1 foi inversamente correlacionado com a disponibilidade de carboidratos e estresse, além disso, foi sugerido que esteja envolvido na mediação de sinais hormonais e nutrição de folhas de *A. thaliana* (Vogel *et al.*, 2012). No presente trabalho, a aplicação foliar de cálcio reduziu o acúmulo do fator de transcrição 1 em 52% no meristema, tal diminuição certamente foi preponderante para o fenótipo de menor florescimento constatado nesse tratamento. Além disso, a relação do fator de transcrição 1 /carboidratos constatada por (Vogel *et al.*, 2012), corrobora com a detecção exclusiva da sacarose sintase observada em meristemas com cálcio em nosso estudo.

### *Transdução de sinais*

A proteína de transdução de sinal foi mais acumulada em meristemas sem cálcio, essa proteína interage com a via de degradação proteica mediada pelo proteassomo 26S (Wang *et al.*, 2002). Várias proteínas da família de transdução de sinal, foram identificadas em *Arabidopsis* e *Antirrhinum* mostraram desempenhar papéis importantes na transdução de sinais de auxina, formação de órgãos florais, senescência foliar e florescimento (Wang *et al.*, 2002), concordando com o maior acúmulo da proteína de ubiquitinação 1 no controle. Também foi demonstrado que A proteína de transdução de sinal pode regular a sinalização pelo etileno através de fatores de resposta ao etileno *ERF* (Wang *et al.*, 2009), reforçando o que foi discutido anteriormente, quando observamos no controle maior expressão do fator de transcrição 1. Sua atividade envolve também, a sinalização para a ativação do gene integrador de sinais *LEAFY (LFY)*, o qual é dependente de *APETALA3 (AP3)*, que por sua vez requer *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, um componente ligado A proteína de transdução de sinal (Chae *et al.*, 2008).

Por outro lado, em meristemas com cálcio constatamos que a abundância dessa proteína foi 84,2% menor comparada ao controle, esse comportamento pode ter regulado para baixo a interação da A proteína de transdução de sinal com proteínas-chave, reguladoras de genes das vias de indução do florescimento, em plantas tratadas com cálcio, contribuindo para a redução na floração observada nesse tratamento.

Envolvida em vários processos fisiológicos, a proteína adenosina quinase, ADK (Q9XGC6) foi detectada exclusivamente em meristemas de plantas tratados com cálcio, o aumento na atividade dessa enzima tem sido acompanhado pela

proliferação celular rápida e regulada por citocininas, como a embriogênese, germinação e crescimento de plântulas (Kwade *et al.*, 2005). A ADK catalisa a fosforilação da adenosina em adenosina monofosfato (AMP) um componente essencial para a manutenção de conjuntos de nucleotídeos de purina em *Arabidopsis* (Moffat *et al.*, 2000; Schoor *et al.*, 2011), e uma das vias metabólicas que as plantas utilizam para preservar os níveis equilibrados de citocininas ativas, essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais. O mecanismo pelo qual as plantas modulam a quantidade de várias formas de citocininas, envolve, provavelmente, a adenosina-quinase (Kwade *et al.*, 2005).

A proteína Ras-relacionada a RABD2c (Q9SEH3), foi identificada apenas em meristemas tratados com cálcio, atuam na regulação do tráfego de vesículas, a partir da regulação da formação de vesículas em membranas doadoras e dirigindo a especificidade de tráfego para facilitar ancoragem de vesículas em membranas-alvo (Nielsen *et al.*, 2008). Essa pequena GTPase é um importante interruptor molecular na sinalização em plantas (Yang, 2002). Tem sido demonstrado que o cálcio regula a intensidade de ativação de GTPases Ras-like por mecanismos dependentes de cálcio, atuando também com proteínas que facilitam a ativação ou inativação de pequenas GTPases. Além disso, várias pequenas GTPases colaboram com a sinalização de cálcio na regulação de processos celulares, tais como a adesão celular, migração celular e exocitose (Aspenström, 2004). É provável que a aplicação foliar de cálcio tenha sido preponderante para a expressão exclusiva das proteínas ADK e Ras em meristemas tratados com cálcio.

### *Fotossíntese/fotorreceptores*

A proteína de posicionamento incomum do cloroplasto 1, CHUP1, cloroplástica (Q9LI74), mais acumulada no controle, atua na mudança de posição dos cloroplastos de acordo com a intensidade da luz ambiente. Quando sob condições de luz fraca, os cloroplastos se reúnem na membrana plasmática ao longo da parede celular para receber radiação solar ideal para a fotossíntese. Em contraste, sob condições de luz forte, os cloroplastos se posicionam na membrana plasmática ao longo das paredes celulares anticlinal para evitar danos ao aparelho fotossintético (Oikawa *et al.*, 2008) Por outro lado, abordagens genéticas usando *Arabidopsis* mutantes mostraram que CHUP1 também responde a fotorreceptores sensíveis à luz azul através da interação com a proteína profilina, que por sua vez é um alvo de sinalização por fototropina (Banaś *et al.*, 2012). A subunidade menor da proteína ribulose bisfosfato carboxilase, RBCS (Q96542) também revelou maior abundância no controle, foi sugerido o seu envolvimento na sinalização e regulação da transcrição de genes nucleares específicos em resposta à luz azul e ao vermelho distante (Buzby *et al.*, 1990; Martínez-Hernández *et al.*, 2002). Ambas as proteínas podem estar atuando em cooperação para sinalização quanto à qualidade da luz. Por outro lado, em meristemas tratados com cálcio a expressão das duas proteínas foi reduzida. Tal resultado pode influenciar negativamente a sinalização de fatores ambientais indutivos do florescimento como a resposta à luz vermelho distante e luz azul, os quais são envolvidos com a indução do florescimento.

### *Desenvolvimento*

A proteína de desenvolvimento 1, constitui uma família de proteínas notavelmente conservada em células eucarióticas, com diversas localizações celulares e funções (Ahn *et al.*, 2006). Dentre essas funções foi observado que a diminuição na expressão dessa proteína utilizando um sistema de silenciamento de genes induzida por vírus, gerou um fenótipo com folhas e flores pequenas e distorcidas, redução no número de divisões celulares e redução do florescimento, sugerindo que a a proteína de desenvolvimento 1 desempenha um papel chave no desenvolvimento da planta e senescência (Chen *et al.*, 2005). Além disso foi sugerido que a proteína de desenvolvimento 1 desempenha um papel crucial na biogênese mitocondrial e na proteção contra estresses e senescência em células vegetais (Ahn *et al.*, 2006).

Já a proteína de desenvolvimento 2, são capazes de acetilar proteínas histonas e não histonas, está envolvida na regulação da expressão do gene em todo o genoma, desempenhando papéis importantes, tais como modificações pós-traducionais correlacionados com a ativação de genes (Gu *et al.*, 2013). A proteína de desenvolvimento 2 é necessária para regular a atividade de meristema floral através da via *WUSCHEL/AGAMOUS* (Bertrand *et al.*, 2003), resposta a estresse térmico (Hu *et al.*, 2015), e regulação da atividade do gene de identidade de meristemas *LEAFY* (Cohen *et al.*, 2009). Foi demonstrado que a proteína de desenvolvimento 2 também está diretamente relacionado com os promotores responsivos à luz, dentre aos quais a proteína RBCS (Benhamed *et al.*, 2006), indentificado também neste trabalho. Nesse estudo foi notado que ambas as proteínas apresentaram maior acúmulo no controle, porém a aplicação de cálcio reduziu a abundância dessas mesmas proteínas em 68,3 e 44%

respectivamente. Isso pode ter influenciado diretamente na queda no florescimento observada após a aplicação foliar desse nutriente já que ambas são reguladoras do desenvolvimento de plantas como descrito anteriormente. Por outro lado, o maior acúmulo de proteínas envolvidas com a indução do florescimento no controle, sugere maior regulação para a transição floral, conseqüentemente a taxa de florescimento observada nesse tratamento foi 20% maior do que nas plantas tratadas com cálcio.

#### *Proteínas de função desconhecida*

Foram identificadas duas proteínas diferenciais entre os tratamentos, uma com maior acúmulo no tratamento com cálcio (D8L858), específica de *Saccharum*, e uma com maior abundância no controle (A0A096QV20) descrita para milho. Entretanto, não possuem função ou ontologia associada. Duas proteínas exclusivas para cada tratamento também foram detectadas, a (B8A063) no controle, associada à atividade hidrolase, conforme ontologia observada no UNIPROT e (O04616) no tratamento com cálcio, ainda sem função ou ontologia descrita.

#### *DEPs na pós-indução*

Na pós-indução, foi detectada exclusivamente no controle a proteína malato desidrogenase, MDH (B4FZU8), essa enzima geralmente é encontrada em duas formas nas plantas: MDH mitocondrial e MDH citoplasmática. Na mitocôndria, participa do ciclo de Krebs, enquanto no citoplasma, é envolvida no metabolismo de carboidratos, na fixação de CO<sub>2</sub> e em outras vias metabólicas. A forma microcorpo de MDH está envolvida em fotorespiração e no ciclo glioxilato

(Yudina, 2012). A enzima frutose bisfosfato aldolase, citoplasmática (P08440) é um componente importante da glicólise/gluconeogênese e no ciclo da pentose fosfato em plantas, também foi anotada apenas no controle. Foi observado que alterações na sua atividade geram consequências na fotossíntese, partição de carbono e crescimento (Konishi *et al.*, 2004).

Além dessas proteínas ainda foram identificadas a proteína ribossômica L23 50S, cloroplástica (Q1KVT6) uma proteína estrutural do ribossomo, e o fator de alongação  $\alpha$  1 (B6UJH4), ambas são fundamentais na tradução, sugerindo a manutenção na tradução dos componentes envolvidos na diferenciação do meristema apical. Uma serina hidroximetiltransferase (A0A059Q0P7) fundamental na fotorrespiração e para a fixação de carbono e fornecimento de energia para o crescimento, reforça a hipótese de que, é provável que sua atividade esteja atuando em conjunto com as proteínas já descritas, para a manutenção do desenvolvimento floral no controle.

Alguns DEPs mais expressos sem cálcio na pré-indução foram DEPs mais abundantes na pós-indução no tratamento com cálcio. Sugerindo que o proteoma pós-indução em meristemas com cálcio é semelhante ao proteoma pré-indução de meristemas sem cálcio.

As proteínas: CHUP1, cloroplástica (Q9LI74), proteína osmotina (B6SKP5), subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial (P19023) e três polifenol oxidases (O49960), tiveram maior acúmulo em meristemas tratados com cálcio na pós-indução. Comportamento contrário ao notado na pré-indução, quando tais proteínas exibiram redução no acúmulo após a aplicação de cálcio, indicando que provavelmente o efeito do cálcio foi atenuado pelo tempo.

### **Ontologia Gênica (GO)**

A categorização associada a processo biológico permitiu observar na pré-indução, que a aplicação foliar de cálcio reduziu a frequência de ontologias relacionadas à tradução de 26 para 8%, na transcrição foi observada uma frequência de (15,7%) exclusivamente no controle, bem como no metabolismo de aminoácidos (10,5%), indicando que a transcrição e tradução foram maiores no controle o que é comum no período de indução do florescimento (Figura 9). Já em meristemas com cálcio as frequências de sinalização aumentaram de 10,5 para 16,6%, sugerindo que a presença de cálcio, parece estimular várias outras respostas nesse tratamento, por exemplo, ontologias relacionadas metabolismo de carboidratos, (8,3%), parede celular (8,3%) e atividade antioxidante (8,3%) foram exclusivamente observados nesse tratamento. Foi notado ainda que o cálcio aumentou a frequência de enzimas da glicólise (10,3 para 16,6%), a qual parece estar associada ao maior metabolismo de carboidratos, provavelmente para a formação de parede celular ou calose (Figura 10).

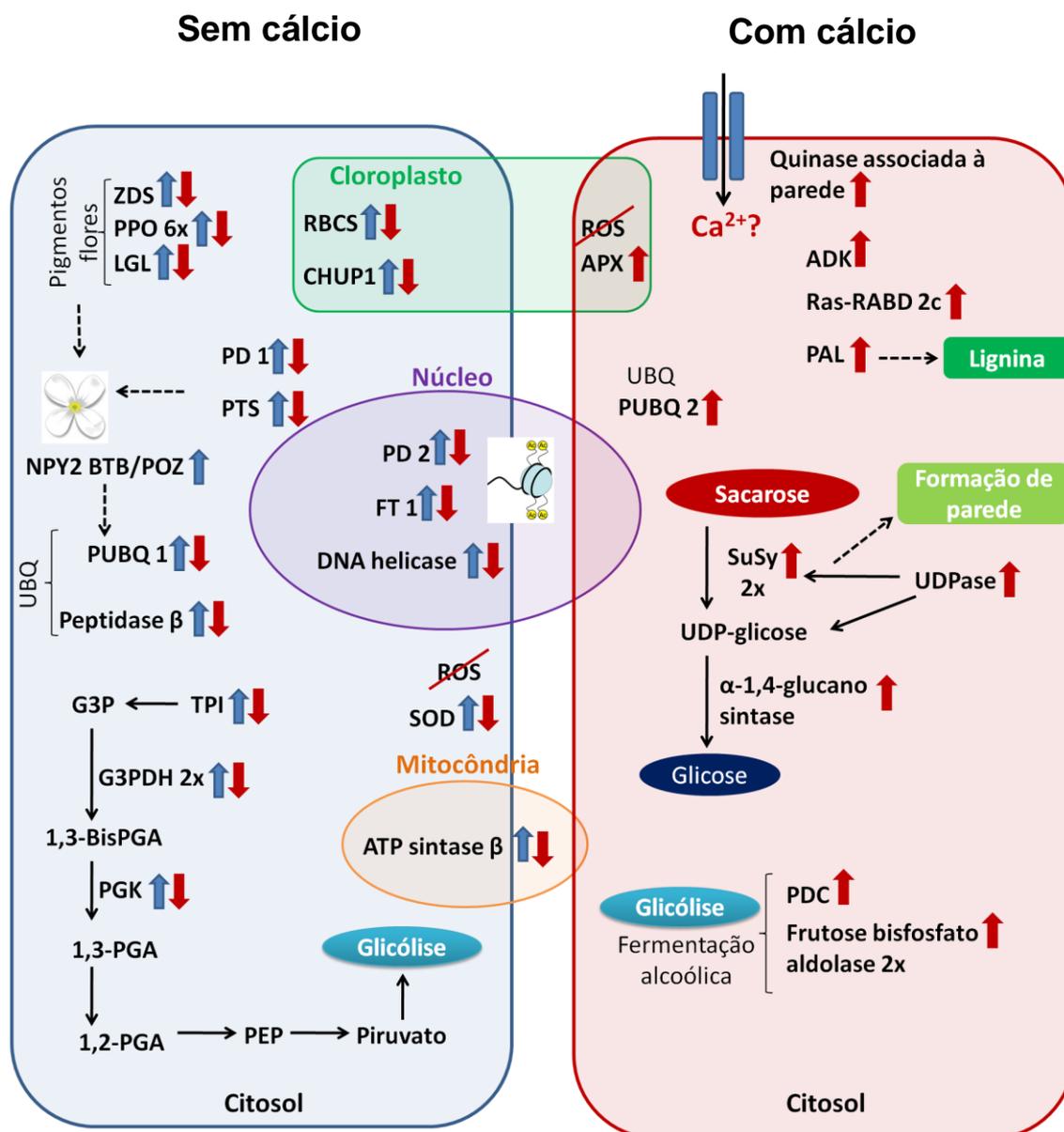
Na pós-indução, devido à menor quantidade de DEPs associadas ao proteoma de *Arabidopsis*, observou-se pouca frequência de ontologias, mas não obstante, ainda foi possível notar em meristemas sem cálcio, maior frequência de ontologias para TCA (25%), metabolismo (25%) e tradução (50%), enquanto que em meristemas com cálcio foi observada ontologia apenas para síntese de ATP (50%), outros 50% apresentaram ontologia não anotada.

Com a análise quantitativa na pré-indução (não estatística) apresentada na (Figura 11) foi possível verificar objetivamente, conforme nomenclatura padronizada de GO que em meristemas sem cálcio houve aumento de ontologias relacionadas à ubiquitinação, transcrição, proteólise, resposta ao estímulo por luz

(luz azul e vermelho distante), acetilação de histonas, desenvolvimento floral e biossíntese de caroteno. Ou seja, foi verificado aumento nas ontologias associadas ao florescimento. Por outro lado, a aplicação de cálcio aumentou a biossíntese de sacarose e fenilpropanóides, transdução de sinal por GTPase, aumentando também a resposta a estresses bióticos e abióticos, transporte de proteínas e deposição de calose na parede celular. Este quadro indica alteração no proteoma e, por consequência, na fisiologia da planta após a aplicação de cálcio, resultando na redução do número inflorescências. Já na pós-indução (Figura 12), constataram-se ontologias associadas à senescência de flores como a L-serina, e resposta a estresses principalmente no controle.

**Tabela 7.** Tabela comparativa de proteínas por processo biológico durante a pré-indução do florescimento da variedade de cana-de-açúcar RB867515. Proteínas mais abundantes no controle (- Cálcio) e proteínas mais abundantes sob aplicação foliar de 58 mM de sulfato de cálcio (+ Cálcio).

<b>- Cálcio</b>	<b>Processo</b>	<b>+ cálcio</b>
Proteína de ubiquitinação 1	Ubiquitinação	Proteína de ubiquitinação 2
Superóxido dismutase	Metabolismo antioxidante	Ascorbato peroxidase
-	Parede celular	$\alpha$ -1,4-glucano sintase [Formando-UDP] Wall-associated kinase UDP-glicose-pirofosforilase
Subunidade menor da ribulose bifosfato carboxilase	Sinalização por fotorreceptores	-
Fator de transcrição 1	Fatores de transcrição	-
Proteína de transdução de sinal	Transdução de sinal	Adenosina quinase Ras-relacionada a RABD2c
Zeta-caroteno desaturase, cloroplástica/cromoplástica Polifenol oxidase	Metabolismo secundário	Fenilalanina amônia liase
Proteína de desenvolvimento 1 Proteína de desenvolvimento 2	Desenvolvimento	-



**Figura 13.** Modelo esquemático dos processos de regulação proteica em meristemas de cana-de-açúcar durante a pré-indução do florescimento em condições normais de cultivo (controle) e sob aplicação foliar de 58 mM de  $\text{CaSO}_4$ . ↑↓ *UP-regulated* ou *DOWN-regulated*, sem cálcio (em azul) e com cálcio (em vermelho). ZDS (zeta caroteno dessaturase), PPO (polifenol oxidase), LGL (lactoilglutaciona liase), RBCS (subunidade menor da ribulose bisfosfato carboxilase), PTS (proteína de transdução de sinal), FT1 (fator de transcrição 1), UBQ (ubiquitinação), PUBQ 1 (proteína de ubiquitinação 1, UBQ 2 (proteína de ubiquitinação 2), PD 1 (proteína de desenvolvimento 1), PD 2 (proteína de desenvolvimento 2), TPI (triose fosfato isomerase), G3PDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), PGK (fosfoglicerato quinase), SOD (superóxido dismutase), ROS (espécie reativa de oxigênio), ADK (adenosina quinase), PAL (fenilalanina amônia liase), SuSy (sacarose sintase), UDPase (UDP-glicose pirofosforilase), APX (ascorbato peroxidase) e PDC (piruvato descarboxilase).

## Conclusão

A aplicação foliar de cálcio alterou significativamente o proteoma da cana reduzindo o acúmulo de proteínas importantes como as proteínas de ubiquitinação 1 e 2, fator de transcrição 1, além disso, o cálcio parece melhorar a sinalização celular e a atividade antioxidante em meristemas. Foi observado ainda que o efeito do cálcio no proteoma é atenuado pelo tempo. As proteínas identificadas neste estudo são fortes candidatas a estudos futuros visando sua aplicação como marcador molecular funcional envolvendo a regulação do florescimento da cana-de-açúcar associados ao uso do cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético desta cultura.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar PMGCA/UFAL pela disponibilização do material vegetal e área experimental. Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilização da plataforma analítica em espectrometria de massas, e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo (Instituto de Química, Unicamp) pelo acesso ao programa Mascot com banco de dados proteicos de *Saccharum*.

## Referências Bibliográficas

- Ahn C S, Lee J H, Reum Hwang A, Kim W T, and Pai H S (2006) Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *The Plant Journal* 46:4, 658-667.
- Almeida R R (2015) Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 235pp.
- Amor Y, Haigler C H, Johnson S, Wainscott M and Delmer D P (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:20, 9353-9357.
- Andrews D L, MacAlpine D M, Johnson J R, Kelley P M, Cobb B G and Drew M C (1994) Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiology* 106:4, 1575-1582.
- Apel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Araji S, Grammer T A, Gertzen R, Anderson S D, Mikulic-Petkovsek M, Veberic R and Escobar M A (2014) Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiology* 164:3, 1191-1203.
- Aspenström P (2004) Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1742:1, 51-58.
- Aukerman M J and Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* 15:11, 2730-2741.
- Banaś A K, Aggarwal C, Łabuz J, Sztatelman O and Gabryś H (2012) Blue light signalling in chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* 63:4, 1559-1574.
- Benhamed M, Bertrand C, Servet C and Zhou D X (2006) Arabidopsis GCN5 HD1 and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18:11, 2893-2903.
- Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M and Zhou D X (2003) Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *Journal of Biological Chemistry* 278:30, 28246-28251.
- Boerjan W, Ralph J and Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54:1, 519-546.
- Buzby J S, Yamada T and Tobin E M (1990) A light-regulated DNA-binding activity interacts with a conserved region of a *Lemna gibba* rbcS promoter. *The Plant Cell* 2:8, 805-814.
- Carter C and Thornburg R W (2000) Tobacco nectarin I purification and characterization as a germin-like manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. *Journal of Biological Chemistry* 275:47, 36726-36733.
- Chae E, Tan Q K G, Hill T A and Irish V F (2008) An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development* 135:7, 1235-1245.

- Chen J C, Jiang C Z and Reid M S (2005) Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *The Plant Journal* 44:1, 16-24.
- Cheng Y, Qin G, Dai X and Zhao Y (2008) NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:52, 21017-21022.
- Ciaffi M, Paolacci A R, Tanzarella O A and Porceddu E (2011) Molecular aspects of flower development in grasses. *Sexual plant reproduction* 24:4, 247-282.
- Coelho C P, Costa Netto A P, Colasanti J and Chalfun-Junior A (2013) A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. *Genetics and Molecular Research* 12:1347-1359.
- Coelho C P, Minow M A, Chalfun-Júnior A and Colasanti J (2014) Putative sugarcane FT/TFL1 genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 5:221-221.
- Cohen R, Schocken J, Kaldis A, Vlachonasios K E, Hark A T and McCain E R (2009) The histone acetyltransferase GCN5 affects the inflorescence meristem and stamen development in *Arabidopsis*. *Planta* 230:6, 1207-1221.
- Considine M J and Foyer C H (2014) Redox regulation of plant development. *Antioxidants and Redox Signaling* 21:9, 1305-1326.
- Cruz, S J S (2010) Efeito da aplicação de cálcio e silício visando a redução do florescimento da variedade de cana-de-açúcar RB867515. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 44pp.
- Cui X, Lu F, Li Y, Xue Y, Kang Y, Zhang S ... and Xu X (2013) Ubiquitin-specific proteases UBP12 and UBP13 act in circadian clock and photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162:2, 897-906.
- Cunha J P A R, Teixeira M M, Vieira R F and Fernandes H C (2005) Deposição e deriva de calda fungicida aplicada em feijoeiro em função de bico de pulverização e de volume de calda. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9:1, 133-138.
- Dey S and Vlot A C (2015) Ethylene responsive factors in the orchestration of stress responses in monocotyledonous plants. *Frontiers in Plant Science* 6:640, doi: 10.3389/fpls.2015.00640.
- Diz A P, Truebano M and Skibinski D O (2009) The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 30:17, 2967-2975.
- Dornelas M C and Rodriguez A P (2001) A genomic approach to elucidating grass flower development. *Genetics and Molecular Biology* 24:1-4, 69-76.
- Endres L, Cruz S J S, Vilela R D, Santos J M, Souza Barbosa G V and Silva J A C (2015) Foliar Applications of Calcium Reduce and Delay Sugarcane Flowering. *BioEnergy Research* 1-11.
- Figueiredo R C, Brito M S, Figueiredo L H M, Quiapin A C, Vitorelli P M, Silva L R ... and Goldman M H S (2001) Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: Unraveling flower-specific genes. *Genetics and Molecular Biology* 24:1-4, 77-84.
- Fleming A (2006) Metabolic aspects of organogenesis in the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany* 57:9, 1863-1870.
- Fridovich I (1986) Superoxide dismutases *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58:6, 61-97.
- Gass N, Glagotskaia T, Mellema S, Stuurman J, Barone M, Mandel T ... and Kuhlemeier C (2005) Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in petunia. *The Plant Cell* 17:8, 2355-2368.

- Glassop D, Rae A L and Bonnett G D (2014) Sugarcane flowering genes and pathways in relation to vegetative regression. *Sugar Tech* 16:3, 235-240.
- Glover B J (2007) Understanding flowers and flowering: an integrated approach V.277 Oxford UK: Oxford University Press, 239pp.
- Goldman M H S, Seurinck J, Marins M, Goldman G H and Mariani C (1998) A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 36:3, 479-485.
- Gu X, Wang Y and He Y (2013) Photoperiodic regulation of flowering time through periodic histone deacetylation of the florigen gene FT. *PLoS Biology* 11:9, e1001649.
- Guo L, Ma F, Wei F, Fanella B, Allen D K and Wang X (2014) Cytosolic phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases affect *Arabidopsis* cellular metabolism and promote seed oil accumulation. *The Plant Cell* 26:7, 3023-3035.
- Gutterson N and Reuber T L (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7:4, 465-471.
- Hardin S C, Tang G Q, Scholz A, Holtgraewe D, Winter H and Huber S C (2003) Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *The Plant Journal* 35:5, 588-603.
- Hardin S C, Winter H and Huber S C (2004) Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiology* 134:4, 1427-1438.
- Hirai N, Yamamuro M, Koshimizu K, Shinozaki M and Takimoto A (1994) Accumulation of phenylpropanoids in the cotyledons of morning glory (*Pharbitis nil*) seedlings during the induction of flowering by low temperature treatment and the effect of precedent exposure to high-intensity light. *Plant and Cell Physiology* 35:4, 691-695.
- Hu Y, Zhang L U, He S, Huang M I N, Tan J, Zhao L I N ... and Li L (2012) Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac. *Plant Cell and Environment* 35:12, 2130-2142.
- Humbert R P R P (1974) El cultivo de la caña de azúcar 633.61 H8C8:719pp.
- Jiang Y and Huang B (2001) Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool season grasses. *Journal of Experimental Botany* 52:355, 341-349.
- Jofuku K D, Den Boer B G, Van Montagu M and Okamoto J K (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell* 6:9, 1211-1225.
- Karp N A, Spencer M, Lindsay H, O'Dell K and Lilley K S (2005) Impact of replicate types on proteomic expression analysis. *Journal of Proteome Research* 4:5, 1867-1871.
- Kaur D, Dogra V, Thapa P, Bhattacharya A, Sood A and Sreenivasulu Y (2015) In vitro flowering associated protein changes in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Proteomics* 15:7, 1291-1306.
- Kleczkowski L A, Kunz S and Wilczynska M (2010) Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29:4, 191-203.
- Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7:3, 235-246.

- Konishi H, Yamane H, Maeshima M and Komatsu S (2004) Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. *Plant Molecular Biology* 56:6, 839-848.
- Kwade Z, Świaątek A, Azmi A, Goossens A, Inzé D, Van Onckelen H and Roef L (2005) Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 280:17, 17512-17519.
- Li Y and Solomon S (2003) Ethephon: a versatile growth regulator for sugar cane industry. *Sugar Tech* 5:4, 213-223.
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R ... and Usadel B (2014) Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell and Environment* 37:5, 1250-1258.
- Martínez-Hernández A López-Ochoa L Argüello-Astorga G and Herrera-Estrella L (2002) Functional properties and regulatory complexity of a minimal rbcS light-responsive unit activated by phytochrome, cryptochrome and plastid signals. *Plant Physiology* 128:4, 1223-1233.
- Matthews P D, Luo R and Wurtzel E T (2003) Maize phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany* 54:391, 2215-2230.
- Meravý L (1979) The effect of calcium deficiency on the activity of ammonia-lyases in the shikimic pathway. *Biologia Plantarum* 21:6, 427-433.
- Mizoi J, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819:2, 86-96.
- Mlotshwa S, Yang Z, Kim Y and Chen X (2006) Floral patterning defects induced by *Arabidopsis* APETALA2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* 61:4-5, 781-793.
- Moffatt B A, Wang L, Allen M S, Stevens Y Y, Qin W, Snider J and von Schwanberg K (2000). Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology* 124:4, 1775-1785.
- Moore P H and Berding N (2014) Flowering. *Sugarcane: Physiology Biochemistry and Functional Biology* 379-410.
- Moore P H and Osgood R V (1989) Prevention of flowering and increasing sugar yield of sugarcane by application of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid). *Journal of Plant Growth Regulation* 8:3, 205-210.
- Nakano T, Fujisawa M, Shima Y and Ito Y (2014) The AP2/ERF transcription factor SIERF52 functions in flower pedicel abscission in tomato. *Journal of Experimental Botany* eru154.
- Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Sato T, Kikuchi S, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M ... and Nishino T (2000) Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290:5494, 1163-1166.
- Nielsen E, Cheung A Y. and Ueda T (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147:4, 1516-1526.
- Ogawara T, Higashi K, Kamada H and Ezura H (2003) Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 160:11, 1335-1340.

- Ohl S, Hedrick S A, Chory J and Lamb C J (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *The plant cell* 2:9, 837-848.
- Oikawa K, Yamasato A, Kong S G, Kasahara M, Nakai M, Takahashi F ... and Wada M (2008) Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiology* 148:2, 829-842.
- Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E and Yanofsky M F (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405:6783, 200-203.
- Peña-Castro J M, van Zanten M, Lee S C, Patel M R, Voesenek L A, Fukao T and Bailey-Serres J (2011) Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67:3, 434-446.
- Pirovani C P, Carvalho H A S, Machado R C R, Gomes D S, Alvim F C, Pomella A W V ... and Micheli F (2008) Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems organs infected by *Moniliophthora perniciosa* the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis* 29:11, 2391-2401.
- Rizk T Y, Khalil H A and Nosaer H A (2007) Effect of two-photoperiod regimes on flower induction of five non flowering sugar cane varieties. In *African Crop Science Conference Proceedings* 8:155-159.
- Rodrigues J D (1995) *Fisiologia da cana-de-açúcar*. Botucatu: Unesp, 100pp.
- Sadanandom A, Bailey M, Ewan R, Lee J and Nelis S (2012) The ubiquitin–proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist* 196:1, 13-28.
- Schoor S, Farrow S, Blaschke H, Lee S, Perry G, von Schwartzberg K ... and Moffatt B (2011) Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157:2, 659-672.
- Souza A E R (2015) *Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e seca*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 234pp.
- Sundaram S, Khanna S and Khanna-Chopra R (2009) Purification and characterization of thermostable monomeric chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase from *Chenopodium murale*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15:3, 199-209.
- Tanaka Y, Sasaki N and Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:4, 733-749.
- Teixeira A F de Bastos Andrade A Ferrarese-Filho O and Ferrarese M D L L (2006) Role of calcium on phenolic compounds and enzymes related to lignification in soybean (*Glycine max* L.) root growth. *Plant Growth Regulation* 49:1, 69-76.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J and Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153:3, 895-905.
- Vettore A L, Silva F R, Kemper E L, Souza G M, Silva A M, Ferro M I T... and Nobrega M P (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research* 13:12, 2725-2735.

- Vogel M O, Gomez-Perez D, Probst N and Dietz K J (2012) Combinatorial signal integration by APETALA2/Ethylene Response Factor (ERF)-transcription factors and the involvement of AP2-2 in starvation response. *International Journal of Molecular Sciences* 13:5, 5933-5951.
- Wada K C, Mizuuchi K, Koshio A, Kaneko K, Mitsui T and Takeno K (2014) Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in *Pharbitis*. *Journal of Plant Physiology* 171:11, 895-902.
- Wang C Q and Song H (2009) Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Reports* 28:9, 1341-1349.
- Wang H, Huang J, Lai Z and Xue Y (2002) F-box proteins in flowering plants. *Chinese Science Bulletin* 47:18, 1497-1501.
- Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S and Cresti M (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24:14, 2369-2375.
- Wang X, Kong H and Ma H (2009) F-box proteins regulate ethylene signaling and more. *Genes and Development* 23:4, 391-396.
- White P J and Broadley M R (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:4, 487-511.
- Witzel K, Weidner A, Surabhi G K, Börner A and Mock H P (2009) Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany* 60:12, 3545-3557.
- Wuriyangan H, Zhang B, Cao W H, Ma B, Lei G, Liu Y F ... and Cao Y R (2009) The ethylene receptor ETR2 delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *The Plant Cell* 21:5, 1473-1494.
- Yadav S K, Singla-Pareek S L, Reddy M K and Sopory S K (2005) Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Letters* 579:27, 6265-6271.
- Yang J Y and Widmann C (2002) The RasGAP N-terminal fragment generated by caspase cleavage protects cells in a Ras/PI3K/Akt-dependent manner that does not rely on NFκB activation. *Journal of Biological Chemistry* 277:17, 14641-14646.
- Yudina R S (2012). Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3:370-377.
- Zhang X and Liu C J (2015) Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant* 8:1, 17-27.
- Zhang Z, Wang H, Luo D, Zeng M, Huang H and Cui X (2011) Convergence of the 26S proteasome and the REVOLUTA pathways in regulating inflorescence and floral meristem functions in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62:1, 359-369.
- Zhou Y, Wu X X, Zhang Z and Gao Z H (2015) Identification of differentially expressed genes associated with flower color in peach using genome-wide transcriptional analysis. *Genetics and Molecular Research: GMR* 14:2, 4724.

## 7. Discussão Geral

A aplicação foliar de cálcio reduziu o florescimento da cana-de-açúcar em 20% em 2013. Já em 2014, a redução observada após a aplicação de cálcio foi de 39%. As condições climáticas contrastantes ocorridas entre os anos de 2012/2013 e 2013/2014 foram cruciais para as diferenças observadas na taxa de floração entre os períodos analisado. O biênio 2012/2013, foi marcado por um período seco e de altas temperaturas, atrasando a indução do florescimento e consequentemente a emissão de flores. Já no biênio 2013/2014 o período foi marcado por boa disponibilidade hídrica e temperaturas amenas, as quais são condições indutivas para o florescimento, tais fatores anteciparam em um mês a emissão de flores da cana. Apesar da diferença constatada entre os períodos, observamos que o efeito da aplicação de cálcio na floração não foi anulado pelas condições ambientais contrastantes.

Foi verificado que plantas tratadas com cálcio tiveram maior comprimento médio de colmos no final da floração do que as não tratadas. Enquanto que o comprimento da folha +3 foi maior apenas no tratamento no período anterior a floração. Isso parece concordar com a expressão exclusiva de proteínas do metabolismo de carboidratos para a formação de UDP-glicose e parede celular em meristemas com cálcio podendo ser usadas para o crescimento da planta, considerando que o meristema é o órgão responsável pela fabricação de folhas e colmos na cana. Apesar da diferença observada no comprimento das plantas entre os tratamentos no final da floração, a maioria dos parâmetros morfológicos não diferiu nesse período, incluindo o comprimento da folha +3, como já discutido, inferindo que o maior crescimento no tratamento cálcio se deu no período de maior acúmulo de proteínas envolvidas com a formação de esqueleto carbônico

(colmos + folhas) na pré-indução, as quais não foram detectadas nesse mesmo tratamento após a indução do florescimento. Concordando com o observado na análise do proteoma, ao notar que o conjunto de proteínas no tratamento cálcio, assemelhou-se ao controle após a indução.

De forma geral a aplicação foliar de cálcio alterou a abundância de proteínas envolvidas com a regulação da indução floral da cana, evidenciado pela redução na expressão de proteínas envolvidas na transcrição, tradução e metabolismo de aminoácidos, principalmente as associadas à sinalização para a indução. Verificou-se que tal resposta atingiu principalmente proteínas relacionadas à ubiquitinação, transcrição, proteólise, resposta ao estímulo por luz azul e vermelho distante, acetilação de histonas, desenvolvimento floral e biossíntese de caroteno.

Por outro lado, o cálcio estimulou a biossíntese de sacarose e a atividade antioxidante, detectadas a nível 1D e 2D. Além disso, este nutriente demonstrou influenciar a transdução de sinal e deposição de calose na parede celular de meristemas de cana. Contudo, o efeito do cálcio parece ser temporário, evidenciado pela semelhança entre o proteoma pós-indução no tratamento cálcio e o proteoma pré-indução no controle.

Este estudo é pioneiro em demonstrar uma alteração no proteoma do meristema apical da cana-de-açúcar influenciada pela aplicação de cálcio, relatando principalmente mudanças no acúmulo de proteínas importantes no processo de indução floral desta espécie. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidação de tais eventos biológicos.

## **8. Conclusões Gerais**

A aplicação foliar de cálcio alterou significativamente o proteoma meristemático da cana-de-açúcar reduzindo o acúmulo de proteínas importantes associados à diferenciação e desenvolvimento reprodutivo em plantas. Tais alterações demonstraram relação com as mudanças observadas nos componentes morfofisiológicos e anatômicos, resultando na redução significativa do florescimento da cana.

As proteínas identificadas neste estudo são fortes candidatas a estudos futuros visando sua aplicação como marcador molecular funcional envolvendo o controle do florescimento da cana-de-açúcar associados ao uso do cálcio, podendo auxiliar os programas de melhoramento desta cultura.

## 9. Referências Bibliográficas

- Abbe E C, Phinney B O, Baer D F (1951) The growth of the shoot apex in maize – internal features. *American Journal of Botany* 38: 744–751.
- Aebersold R and Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:6928, 198-207.
- Almeida R R (2015) Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 235pp.
- Amalraj R S, Selvaraj N, Veluswamy G K, Ramanujan R P, Muthurajan R, Palaniyandi M... and Viswanathan R (2010) Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. *Electrophoresis* 31:12,1959-1974.
- Andrés F and Coupland G (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13:9, 627-639.
- Araldi R, Silva F M L, Ono E O and Rodrigues J D (2010) Flowering in sugarcane. *Ciência Rural*, 40:3, 694-702.
- Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei M A, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, Yalovsky S... and Baginsky S (2008) Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* 320:5878, 938-941.
- Balbuena T S, Dias L L, Martins, M L, Chiquieri T B, Santa-Catarina C, Floh E I, and Silveira V (2011) Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23:2, 91-104.
- Barbieri V and Silva F C D (2011) Efeito do florescimento na brotação e perfilhamento da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Bioenergia em Revista: Diálogos* (ISSN: 2236-9171) 1:1, 118-128.
- Barkla B J, Vera-Estrella R and Pantoja O (2013) Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics* 13:12-13, 1801-1815.
- Barnabas L, Ramadass A, Amalraj R S, Palaniyandi M and Rasappa V (2015) Sugarcane proteomics: An update on current status challenges and future prospects. *Proteomics* 15:10, 1658-1670.
- Batistič O and Kudla J (2012) Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820:8, 1283-1293.
- Berding N and Hurney A P (2005) Flowering and lodging physiological-based traits affecting cane and sugar yield: What do we know of their control mechanisms and how do we manage them?. *Field Crops Research* 92:2, 261-275.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A and Lejeune P (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* 5:10, 1147.
- Blázquez M A (2000) Flower development pathways. *Journal of Cell Science* 113:20, 3547-3548.
- Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz E M and Smyth D R (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development* 119:3, 721-743.
- Brunkhorst M J (2001) A preliminary investigation into the effect of plant nutrient levels on sugarcane flowering. In *Proc. Sug. Afr. Sugar. Technol. Ass.* 75:143-150.

- Buckler E S, Holland J B, Bradbury P J, Acharya C B, Brown P J, Browne C ... and Goodman M M (2009) The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325:5941, 714-718.
- Canovas F M, Dumas Gaudot E, Recorbet G, Jorin J, Mock H P and Rossignol M (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:2, 285-298.
- Cantú M D, Carrilho E, Wulff N A and Palma M S (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova* 31:3, 669-675.
- Cardozo N P and Sentelhas P C (2013) Climatic effects on sugarcane ripening under the influence of cultivars and crop age. *Scientia Agricola* 70:6, 449-456.
- Causier B, Schwarz-Sommer Z and Davies B (2010 February) Floral organ identity: 20 years of ABCs. In *Seminars in cell and developmental biology*, Academic Press 21:1, 73-79.
- Černý M, Novák J, Habánová H, Cerna H and Brzobohatý B (2015) Role of the proteome in phytohormonal signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*.
- Chen S, Liu H, Chen W, Xie D and Zheng S (2009) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in longan flowering reversion buds. *Scientia horticulturae* 122:2, 275-280.
- Cheng S H, Willmann M R, Chen H C and Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology* 129:2, 469-485.
- Chun-Ming Liu and Yuxin Hu (2010) Plant stem cells and their regulations in shoot apical. *Frontiers in Biology* 5:5, 417-413.
- Ciaffi M, Paolacci A R, Tanzarella O A and Porceddu E (2011) Molecular aspects of flower development in grasses. *Sexual Plant Reproduction* 24:4, 247-282.
- Clements H F and Awada M (1967) Experiments on the Artificial Induction of Flowering in Sugarcane. *International Society of Sugar Cane Technologists* 12, 795-812
- Cockram J, Jones H, Leigh F J, O'Sullivan D, Powell W, Laurie D A, and Greenland A J (2007) Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany* 58:6, 1231-1244.
- Colasanti J. and Coneva V. (2009) Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed something new. *Plant Physiology* 149:1, 56-62.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) (2016) Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2015/2016, Quarto levantamento, abril/2016. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento.
- Danilevskaya O N, Meng X and Ananiev E V (2010) Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of TFL1-like genes in maize. *Plant Physiology* 153:1, 238-251.
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Glaszmann J C, Rao S and Berding N (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* MGG 250:4, 405-413.
- Dodd A N, Kudla J and Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61:593-620.

- Donaldson R A and Sugar Association (1996) Effects of ethephon applied to two sugarcane varieties to prevent flowering. Proc. Sug. Afr. Sug. Technol. Ass. 70.
- Doorenbos J and Kassam A H (1979) Yield response to water. Irrigation and Drainage Paper 33, 257.
- Dornelas M C and Rodriguez A P (2001) A genomic approach to elucidating grass flower development. Genetics and Molecular Biology 24:1-4, 69-76.
- Duarte M A G (2009). Floração precoce em cana-de-açúcar-um estudo utilizando ferramentas de análise *in silico* e proteômica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 61pp.
- Endres L, Cruz S J S, Vilela R D, Santos J M, Souza Barbosa G V and Silva J A C (2015) Foliar Applications of Calcium Reduce and Delay Sugarcane Flowering. BioEnergy Research 1-11.
- Evans M M and Barton M K (1997) Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. Annual Review of Plant Biology 48:1, 673-701.
- Fajmut A, Brumen M and Schuster S (2005) Theoretical model of the interactions between Ca<sup>2+</sup> calmodulin and myosin light chain kinase. FEBS Letters 579:20, 4361-4366.
- Ferrario S, Immink R G, Shchennikova A, Busscher-Lange J and Angenent G C (2003) The MADS box gene FBP2 is required for SEPALLATA function in petunia. The Plant Cell 15:4, 914-925.
- Figueiredo R C, Brito M S, Figueiredo L H M, Quiapin A C, Vitorelli P M, Silva L R... and Goldman M H S (2001) Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: Unraveling flower-specific genes. Genetics and Molecular Biology 24:1-4, 77-84.
- Friedman H, Goldschmidt E E and Halevy A H (1989) Involvement of calcium in the photoperiodic flower induction process of *Pharbitis nil*. Plant Physiology 89:2, 530-534.
- Frohnmeier H, Bowler C, Zhu J K, Yamagata H, Schäfer E and Chua N H (1998) Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UV-regulated expression of chalcone synthase. The Plant Journal 13:6, 763-772.
- Ge L L, Tian H Q and Russell S D (2007) Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. American Journal of Botany 94:6, 1046-1060.
- Glassop D, Rae A L and Bonnett G D (2014) Sugarcane flowering genes and pathways in relation to vegetative regression. Sugar Tech 16:3, 235-240.
- Glover B J (2007) Understanding flowers and flowering: an integrated approach. Vol. 277, Oxford UK: Oxford University Press 239pp.
- Gosnell J M (1973). Some factors affecting flowering in sugarcane. Proc. Sug. Afr. Sug. Technol. Ass. 144-147.
- Graves P R and Haystead T A (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:1, 39-63.
- Grivet L, Glaszmann J C and Arruda P (2001) Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: a fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. Genetics and Molecular Biology 24:1-4, 161-167.
- Gururaja Rao P N and Naresh Kumar K (2003) Effect of flowering on juice quality and fibre content in sugarcane varieties. Indian Sugar 53:4, 261-266.
- Hayama R and Coupland G (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. Plant Physiology 135:2, 677-684.

- He L, Lu X, Tian J, Yang Y, Li B, Li J and Guo S (2012) Proteomic analysis of the effects of exogenous calcium on hypoxic-responsive proteins in cucumber roots. *Proteome Science* 10:1, 1.
- Hepler P K (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell* 17:8, 2142-2155.
- Hepler P K and Winship L J (2010) Calcium at the Cell Wall-Cytoplasm Interface. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:2, 147-160.
- Hua W, Zhang L, Liang S, Jones R L and Lu Y T (2004) A tobacco calcium/calmodulin-binding protein kinase functions as a negative regulator of flowering. *Journal of Biological Chemistry* 279:30, 31483-31494.
- Huber S C and Moreland D E (1981) Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* 67:1, 163-169.
- Jack T (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *The Plant Cell* 16:suppl 1, S1-S17.
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Lomthaisong K, Daduang S, Jaisil P and Thammasirirak S (2010) A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6:2, 89-102.
- Jannoo N, Grivet L, David J, D'Hont A and Glaszmann J C (2004) Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity* 93:5, 460-467.
- Jaworski K, Pawełek A, Kopcewicz J. and Szmidi-Jaworska A (2012) The calcium-dependent protein kinase (PnCDPK1) is involved in *Pharbitis nil* flowering. *Journal of Plant Physiology* 169:6, 1578-1585.
- Jha R (2006) Role of calcium in the physiology of plants-A review. *Agricultural Reviews* 27:4, 235-246.
- Jorrín-Novo J V, Pascual J, Sánchez-Lucas R, Romero-Rodríguez M C, Rodríguez-Ortega M J, Lenz C and Valledor L (2015) Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics* 15:5-6, 1089-1112.
- Jung C and Müller A E (2009) Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science* 14:10, 563-573.
- Kaur D, Dogra V, Thapa P, Bhattacharya A, Sood A and Sreenivasulu Y (2015) In vitro flowering associated protein changes in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Proteomics* 15:7, 1291-1306.
- Kaur N and Gupta A K (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Current Science* 88:11, 1771-1780.
- Khan M R G, Ai X Y and Zhang J Z (2014) Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5:3, 347-359.
- Knight H and Knight M R (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6:6, 262-267.
- Koornneef M, Hanhart C J and Van der Veen J H (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* 229:1, 57-66.
- Kumar S, Sharma V, Chaudhary S, Tyagi A, Mishra P, Priyadarshini A and Singh A (2012) Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and

- photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. *Journal of Genetics* 91:1, 33-47.
- Leite G H P and Crusciol C A C (2008). Reguladores vegetais no desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:8, 995-1001.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N,... and Faucher M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4:272, 2.
- Lodha T D, Hembram P and Nitile Tep J B (2013) Proteomics: a successful approach to understand the molecular mechanism of plant-pathogen interaction. *American Journal of Plant Sciences* 4:6, 1212-1226.
- Lohmann J U and Weigel D (2002) Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Developmental Cell* 2:2, 135-142.
- Matsoukas I G, Massiah A J, and Thomas B (2012) Florigenic and antiflorigenic signaling in plants *Plant and Cell Physiology* 53:11, 1827-1842.
- May C, Brosseron F, Pfeiffer K, Meyer H E and Marcus K (2012) Proteome analysis with classical 2D-PAGE. *Quantitative Methods in Proteomics* 37-46.
- Medzihradzky K F, Campbell J M, Baldwin M A, Falick A M, Juhasz P, Vestal M L and Burlingame A L (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 72:3, 552-558.
- Moore P H (1987 September) Physiological basis for varietal improvement in sugarcane. In *Proceedings of the International Symposium on Sugarcane Varietal Improvement*. Sugarcane Breeding Institute Coimbatore India (pp. 3-7).
- Moore P H and Berding N (2014) Flowering Sugarcane: Physiology Biochemistry and Functional Biology 379-410.
- Moore P H and Osgood R V (1989) Prevention of flowering and increasing sugar yield of sugarcane by application of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid). *Journal of Plant Growth Regulation* 8:3, 205-210.
- Neuhaus G, Bowler C, Hiratsuka K, Yamagata H and Chua N H (1997) Phytochrome regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *The EMBO Journal* 16:10, 2554-2564.
- Nuss K J, Berding N, Singh V and Kumar V (1999) Planned recombination in sugarcane breeding: artificial initiation of flowering in sugarcane in sub-tropical and tropical conditions. In *Proceedings of the XXIII ISSCT Congress New Delhi India 22-26 February, 1999*. V.2:504-508, Sugar Technologists' Association of India.
- Oh M, Komatsu S and Nanjo Y (2014) Gel-free proteomic analysis of soybean root proteins affected by calcium under flooding stress. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Ohto M A, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T and Nakamura K (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127:1, 252-261.
- Pacheco C M, Pestana-Calsa M C, Gozzo F C, Mansur Custodio Nogueira R J, Menossi M and Calsa Junior T (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *Journal of Proteome Research* 12:12, 5681-5695.
- Park O M K (2004) Proteomic studies in plants. *BMB Reports* 37:1, 133-138.

- Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E and Yanofsky M F (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405:6783, 200-203.
- Rabilloud T and Lelong C (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* 74:10, 1829-1841.
- Reddy V S and Reddy A S (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* 65:12, 1745-1776.
- Rodrigues J D (1995) *Fisiologia da cana-de-açúcar*. Botucatu:Unesp, 100pp.
- Santos M F, de Pádua V L M, de Matos Nogueira E, Hemerly A S and Domont G B (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *Journal of Proteomics* 73:5, 917-931.
- Shrestha R, Gómez-Ariza J, Brambilla V, and Fornara F (2014) Molecular control of seasonal flowering in rice, *Arabidopsis* and temperate cereals. *Annals of Botany*, mcu032.
- Silva M A, Silva J A G D, Enciso J, Sharma V and Jifon J (2008) Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Scientia Agricola* 65:6, 620-627.
- Simon R, Igeño M I and Coupland G (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384:6604, 59-62.
- Singh P N, Shukla S K and Bhatnagar V K (2007) Optimizing soil moisture regime to increase water use efficiency of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid complex) in subtropical India. *Agricultural Water Management* 90:1, 95-100.
- Snedden W A and Fromm H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* 151:1, 35-66.
- Souza A E R (2015) *Fisiologia e proteômica enriquecida de parede celular em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) sob estresse por radiação ultravioleta B e seca*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 234pp.
- Steinhorst L and Kudla J (2013) Calcium-a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833:7, 1573-1581.
- Tamaki S, Matsuo S, Wong H L, Yokoi S and Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316:5827, 1033-1036.
- Tretyn A (1999) Calcium-dependent signal transduction pathways in plants--phytochrome mechanism of action as an example. *Polish Journal of Pharmacology* 51:2, 145-151.
- van Mourik S, van Dijk A D, de Gee M, Immink R G, Kaufmann K, Angenent G C... and Molenaar J (2010) Continuous-time modeling of cell fate determination in *Arabidopsis* flowers. *BMC Systems Biology* 4:1, 1.
- van Wijk K J (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology* 126:2, 501-508.
- Vanderschuren H, Lentz E, Zainuddin I and Gruissem W (2013) Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal of Proteomics* 93:5-19.
- Vettore A L, Silva F R, Kemper E L, Souza G M, Silva A M, Ferro M I T... and Nobrega M P (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research* 13:12, 2725-2735.
- Webb A A (2013) Focus issue: calcium signaling. *Plant Physiology* 163:2, 457-458.

- Weigel D and Meyerowitz E M (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78:2, 203-209.
- White P J (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465:1, 171-189.
- White P J and Broadley M R (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:4, 487-511.
- Yates J R, Ruse C I and Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches advances and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11, 49-79.
- Yoshida H and Nagato Y (2011) Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany* 62:14, 4719-4730.
- Zhang L, Du L and Poovaiah B W (2014) Calcium signaling and biotic defense responses in plants. *Plant Signaling and Behavior* 9:11, e973818.
- Zhou Y, Sun X D and Ni M (2007) Timing of photoperiodic flowering: light perception and circadian clock. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:1, 28-34.
- Zienkiewicz K, Rejón J D, Suárez C, Castro A J, de Dios Alché J and García M I R (2011) Whole-Organ analysis of calcium behaviour in the developing pistil of olive (*Olea europaea* L.) as a tool for the determination of key events in sexual plant reproduction. *BMC Plant Biology* 11:1, 150.

## 10. Currículum vitae (*Lattes*)

### Romel Duarte Vilela

Curriculum Vitae

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7358887631756901>

### Produção

---

#### Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

1. ENDRES, L., DA CRUZ, SIHÉLIO JÚLIO SILVA, **VILELA, R. D.**, DOS SANTOS, JOÃO MESSIAS, BARBOSA, Geraldo Veríssimo de Souza, SILVA, JOÃO ANTÔNIO CARVALHO Foliar Applications of Calcium Reduce and Delay Sugarcane Flowering. *BioEnergy Research.* , v.1, p.1 - 11, 2015.
2. FERREIRA, Thaís Helena, GENTILE, Agustina, **VILELA, R. D.**, COSTA, G. G. L., DIAS, L. I., ENDRES, L., MENOSSI, Marcelo microRNAs Associated with Drought Response in the Bioenergy Crop Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plos One.* , v.7, p.1 - 14, 2012.

##### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **VILELA, R. D.**, SALDANHA FILHO, A. J. M., ENDRES, L., CALSA JR, T. Physiological and proteomic analysis of sugarcane floral meristem under calcium application In: 11th International Congress of Plant Molecular Biology - IPMB 2015, 2015, Foz do Iguaçu. **Annals of 11th International Congress of Plant Molecular Biology.** , 2015. v.1. p.1 - 2
2. **VILELA, R. D.**, ENDRES, L., CALSA JR, T. Sugarcane apical meristem proteomics under calcium application In: 11th International Congress of Plant Molecular Biology - IPMB 2015, 2015, Foz do Iguaçu. **Annals of 11th International Congress of Plant Molecular Biology.** , 2015. v.1. p.1 - 2
3. ENDRES, L., **VILELA, R. D.**, SANTOS, J. M., Barbosa, GVS. FOLIAR APPLICATION OF CALCIUM REDUCED SUGARCANE FLOWERING In: 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST), 2014, Campos do Jordão. **Annals of 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference.** , 2014. v.1. p.1 - 2
4. ENDRES, L., **VILELA, R. D.** Photochemical and biochemical response of sugarcane to progressive drought and recovery In: Plant Biology Europe FESP/EP/PSO, 2014, Dublin. **Plant Biology Europe FESP/EP/PSO.** , 2014. v.1. p.1 - 2
5. **VILELA, R. D.**, ENDRES, L., CALSA, T SUGARCANE APICAL MERISTEM PROTEOMICS UNDER CALCIUM APPLICATION In: 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference (BBEST), 2014, Campos do Jordão. **Annals of 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference.** ,

2014. v.1. p.1 - 2

6. **VILELA, R. D.**, ENDRES, L. Photochemical and biochemical response of sugarcane to progressive drought and recovery In: 16th International Congress on Photosynthesis Research, 2013, St. Louis, MO, USA: Washington.

**Abstract of 16th International Congress on Photosynthesis Research.** St. Louis, MO, USA: Washington:, 2013. v.1. p.1 - 2

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. MARAFON, A. C., ENDRES, L., ALMEIDA, B. F. A., CRUZ, S. C. S., **VILELA, R. D.**, SILVA JUNIOR, I. M., OLIVEIRA, N. G., FERREIRA, V. M.

Efeito da escória siderúrgica sobre o crescimento, qualidade industrial e a produtividade da cana-de-açúcar In: Fertbio 2012, 2012, Maceió.

**Anais do Fertbio 2012.** , 2012. p.1 - 4

2. CRUZ, S. C. S., ENDRES, L., Borges, D.H.A., SILVA JUNIOR, I. M., ALMEIDA, B. F. A., **VILELA, R. D.**, BEZERRA, B. K. L., ALENCAR, J. B.

Efeito do gesso de minério associado a silicato de cálcio e magnésio sobre a nutrição mineral da cana-de-açúcar In: Fertbio 2012, 2012, Maceió.

**Anais do Fertbio 2012.** , 2012. p.1 - 4

3. CAVALCANTE, P. G. S., OLIVEIRA, N. G., FERREIRA, V. M., **VILELA, R. D.**, SANTOS, L. N., BATISTA, K. D., PEREIRA, L. F. M., ENDRES, L.

Influência do estresse hídrico e de bioestimulantes na fisiologia da cana-de-açúcar In: Fertbio 2012, 2012, Maceió.

**Anais do Fertbio 2012.** , 2012. p.1 - 4

4. SANTOS, L. N., OLIVEIRA, N. G., FERREIRA, V. M., **VILELA, R. D.**, MELO, P. L. A., CAVALCANTE, P. G. S., ALENCAR, J. B., ENDRES, L.

Influência do estresse hídrico e do efeito fisiológico de neonicotinoides na morfologia da cana-de-açúcar In: Fertbio 2012, 2012, Maceió.

**Anais do Fertbio 2012.** , 2012. p.1 - 4