

CAMILO ELBER VITAL

**ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES EM
CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES QUANTO À
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Vital, Camilo Elber, 1983-
V836e Estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares em
2014 cultivares de cana-de-açúcar contrastantes quanto à resposta
 ao déficit hídrico / Camilo Elber Vital. – Viçosa, MG, 2014.
 x, 120f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Déficit hídrico. 3. Proteômica.
4. Fosfoproteômica. 5. Metabolômica. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.61

CAMILO ELBER VITAL

**ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES EM
CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES QUANTO À
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae

APROVADA: 20 de agosto de 2014.

Prof. Marcelo Rogalski

Prof. Joaquim Albenísio Gomes Silveira

Prof. Wagner L. Araújo

Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)

Prof.^ª Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador Marcelo Ehlers Loureiro e meu co-orientador Humberto Josué de Oliveira Ramos pela orientação, dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro que me deram suporte na realização do curso.

Ao Dr. Thomas Christopher Rhys Williams pela colaboração e amizade na realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Rosilene Mesquita e Carla Bastos pelo auxílio e suporte na realização dos trabalhos.

A todos os professores do Programa de Fisiologia Vegetal e funcionários do laboratório.

A todos do Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL), Edvaldo, Nívea e Larissa pelo suporte oferecido e amizade.

Aos meus grandes amigos de sempre: Pablo, Rômulo, Fernanda, Adolfo, Jorge Condori.

Ao meu grande amigo e colega de república Marcos pelas dicas e discussões sobre o trabalho.

Ao grande companheiro de experimentos, Eduardo de Almeida Soares pela dedicação e paciência nas longas jornadas de análises e pela grande amizade.

Aos meus amigos de Viçosa: Aguinaldo, Antônio, Jacinto pelo companheirismo.

À minha família e a minha namorada Daniela pela paciência, pelo apoio e forças incondicionais fornecidas durante esta minha caminhada.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

CAMILO ELBER VITAL, filho de Antônio Carlos Vital e Neuza Lúcia da Cruz Vital, nasceu em Juiz de Fora, MG, no dia 13 de março de 1983. Em 2001 concluiu o ensino médio na escola Estadual Marina de Paiva na cidade de Guidoal, MG. Em março de 2002 iniciou o curso de Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em março de 2007. Obteve o título de Magister Scientiae em Fisiologia Vegetal (2008-2010) na mesma instituição. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV, submetendo-se a defesa de tese no dia 20 de agosto de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3- MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1- Cultivo e aplicação dos tratamentos	12
3.2- Teor relativo de água (TRA)	13
3.3- Caracterização das variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	13
3.4- Coleta e armazenamento das amostras foliares	14
3.5- Morfometria radicular	14
3.6- Discriminação isotópica do ¹³ C	15
3.7- Teores de pigmentos	16
3.8- Avaliação de danos celulares	16
3.9- Caracterização do sistema antioxidativo	18
3.10- Determinação de açúcares, malato, amido, proteínas solúveis e aminoácidos livres	18
3.11- Quantificação de ácido abscísico	19
3.12- Caracterização do proteoma e fosfoproteoma	20
3.13- Redoxproteoma	24
3.14- Análise dos resultados de proteômica	25
3.15- Perfil metabólico	26
3.16- Análise estatística	27
4- RESULTADOS	28
4.1- Efeito do déficit hídrico no teor relativo de água (TRA)	28
4.2- Parâmetros de crescimento	28
4.3- Enrolamento Foliar	35
4.4- Trocas gasosas e discriminação isotópica do ¹³ C	37
4.5- Fluorescência da Clorofila <i>a</i> e teores de pigmentos	38
4.6- Danos celulares	42
4.7- Quantificação de Metabólitos (glicose, frutose, sacarose, malato, aminoácidos, proteínas e amido).	44
4.8- Ácido Abscísico (ABA)	46

4.9-	Proteoma Diferencial	47
4.10-	Fosfoproteoma	59
4.11-	Redoxproteoma	67
4.12-	Perfil metabólico em folhas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico.	71
5.	DISCUSSÃO	74
6-	CONCLUSÕES	87
7-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8-	MATERIAL SUPLEMENTAR	103

RESUMO

VITAL, Camilo Elber, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares em cultivares de cana-de-açúcar contrastantes quanto à resposta ao déficit hídrico.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Adriano Nunes Nesi.

É comum a suposição de que plantas C₄, por sua fotorrespiração desprezível, tenham menor restrição de CO₂ quando a transpiração for reduzida pelo fechamento estomático e, conseqüentemente, maior tolerância à seca. No entanto, esta interpretação foi demonstrada não ser verdadeira e relativamente pouca informação existe sobre a tolerância a deficiência hídrica em plantas C₄, em particular, cana-de-açúcar. Aqui analisou-se dois genótipos contrastantes quanto à tolerância à seca, os quais apenas informações empíricas existem, sem dados publicados disponíveis. Embora em pequenos vasos não se observou diferenças entre cultivares, utilizando vasos maiores (30L) e rizotrons longos (1,2 m-38L) demonstramos que a cultivar RB 867515 foi mais tolerante à seca que a cultivar RB 855536, principalmente devido à redução da desidratação foliar e maior massa seca do colmo sob estresse hídrico severo. A tolerância à seca não foi associada com maior massa seca e volume de raízes ou maior relação raiz/parte aérea, mas foi claramente associada com comprimento total e profundidade da raiz sendo que a cultivar tolerante apresentou raízes mais finas e apesar da inferior massa, teve maior área superficial radicular. Este dado é um bom exemplo de como importante para a tolerância à seca é a arquitetura e morfologia das raízes comparada a análise apenas da massa. As trocas gasosas, análise de fluorescência da clorofila a, atividade total de algumas enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) não contribuíram para tolerância diferencial ao déficit hídrico da cultivar RB 867515. Apesar disso, resultados de proteômica diferencial e fosfoproteômica mostraram aumento exclusivo de abundância de 10 de proteínas fotossintéticas sob estresse severo e aumento da fosforilação de 14, sendo 8 exclusivamente na cultivar tolerante. Esta discrepância entre a medição pontual da fotossíntese e a análise sistêmica ilustra a importância desta última abordagem para obter não só uma visão mais integrada das respostas bioquímicas, mas também uma visão mais fiável das respostas de plantas a seca. Estas evidências sugerem que alterações moleculares na fotossíntese podem contribuir para a tolerância à seca em cana devido a sua contribuição parcial para o aumento da biomassa do colmo sob

estresse. O maior nível de ABA foliar sob déficit hídrico severo na cultivar tolerante poderia estar envolvido na mudança de profundidade e área superficial radicular, mas não parece contribuir para um comportamento estomático diferencial. Análises do proteoma diferencial e fosfoproteoma das folhas indicam a importância do metabolismo da glutathione na tolerância ao estresse hídrico, embora o genótipo tolerante tenha apresentado maior carbonilação de proteínas e sem diferenças relativas na peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos. A análise do redoxproteoma não permitiu inferências claras sobre a tolerância à seca sendo que a maior parte de proteínas com carbonilação foram detectadas em genótipos tolerantes. Levando-se em conta o atraso do enrolamento foliar sob estresse e da maior biomassa do colmo, pode-se interpretar que o genótipo tolerante não teve uma queda tão pronunciada no fluxo fotossintético como resultado de uma maior carbonilação, e sugere-se que o aumento na abundância e fosforilação de proteínas envolvidas neste processo seria uma resposta ao aumento da carbonilação observada. A contribuição específica da glicólise na tolerância ao estresse severo também foi visualizada simultaneamente no proteoma diferencial e fosfoproteoma, e o aumento da fosforilação de várias enzimas dessa via não pode ser atribuído ao aumento da abundância relativa das mesmas. Mais uma vez as duas abordagens proteômicas citadas mostraram claras evidências da importância do metabolismo de aminoácidos nas folhas na tolerância à seca, mas a contribuição de diferentes aminoácidos podem mudar, dependendo do grau de estresse. Essas mudanças na proteômica foram fortemente reforçadas por dados enzimáticos e metabolômicos. Genótipo tolerante apresentou maiores teores de aminoácidos totais sob estresse, e sob estresse severo, níveis mais elevados de cisteína, substrato para biossíntese de glutathione, além de maiores níveis de glicina, serina, lisina, treonina e isoleucina. Estes dados sugerem a importância de vários aminoácidos diferentes para ajuste osmótico, e poderia explicar parcialmente a menor desidratação foliar no genótipo tolerante sob déficit hídrico severo. Outra boa concordância entre os dados de proteômica e metabolômica foi observada para a respiração. Análise funcional do proteoma diferencial e fosfoproteoma claramente indicam o enriquecimento da abundância de enzimas glicolíticas e genes do metabolismo de açúcares no genótipo tolerante. Adicionalmente, os dados de metabolômica indicam níveis mais elevados de glicose, isocitrato, aconitato e malato nesse genótipo, o que sugere que um maior fluxo respiratório suportando o aumento da biossíntese de aminoácidos nas folhas sob

estresse possa ser um importante mecanismo de tolerância à seca em cana. Em síntese, este estudo ilustra a natureza poligênica da tolerância à seca, bem como a importância do uso de abordagens sistêmicas para complementar as medidas pontuais, a fim de compreender melhor os mecanismos de resposta das plantas ao déficit hídrico.

ABSTRACT

VITAL, Camilo Elber, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Physiological and molecular mechanisms study in sugarcane cultivars contrasting response to water deficit.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos and Adriano Nunes Nesi.

Is a quite usual the assumption that C4 plants, because their negligible photorespiration, will have lower CO₂ restriction when transpiration will be reduced by stomatal closure and consequently higher drought tolerance. However this interpretation was shown not to be true, and relatively reduced information exist about C4 drought tolerance, in particular, with sugarcane. Here we analyzed two contrasting genotypes regarding drought tolerance, from which only empirical information exist, without any published data available. Although with small pots we were unable to show differences between cultivars, using large pots (30L) and long rizotrons (1,2 m), we have demonstrated that the cultivar RB 867515 was more drought tolerant than cultivar RB 855536, mainly due to reduced leaf dehydration and higher culm dry mass under severe water stress. Drought tolerance was not associated with higher root dry mass and root volume or higher root/shoot ratio, but was clearly associated with individual root length, root deepness, and the tolerant cultivar have thinner roots, and despite lower root mass, have higher root surface area. This data is a good picture how more important for drought tolerance is root architecture and morphology than root mass. Gas exchange, chlorophyll a fluorescence analysis and total activity of some antioxidative enzymes (SOD, APX and CAT) do not contribute for the differential drought tolerance of cultivar RB 867515. Despite that, differential proteomics and phosphoproteomics shows an exclusive increase of abundance of 10 photosynthesis proteins under severe stress, and increase in phosphorylation of 14 of them, 8 exclusively in the tolerant. This discrepancy between single time point measurement of photosynthesis and systemic analysis illustrate the importance of this last approach to get not only a more integrated picture of biochemical responses, but also a more reliable time picture of the whole drought plant responses. These evidences suggest that molecular changes in photosynthesis could contribute to drought tolerance in sugarcane, due its partial contribution to the increased culm biomass under stress. The higher leaf ABA under severe water deficit of tolerant cultivar could be involved in the change of root deep and root surface area, but do not seems to contribute to a differential stomatal

behavior. Differential proteomics and phosphoproteomics analysis of leaves indicate the importance of glutathione metabolism in water deficit tolerance, although the tolerant genotype has higher protein carbonilation and no relative differences in lipid peroxidation and electrolyte leakiness. The redox proteomics analyses do not allow clear inferences about drought tolerances, and the greater part of proteins with carbonilation were detected in tolerant genotypes. Taking in account the delay of leaf rolling under stress and the high culm biomass, we could interpret that tolerant genotype do not have a so pronounced decrease in photosynthetic flux, which could result in higher carbonilation, and could suggest that increase in protein abundance and phosphorylation of proteins involved in this process as an response to the increased oxidative carbonilation observed. The specific contribution of glycolysis in tolerance to severe stress was also simultaneously sustained by differential proteomics and fosfoproteomics, and increase in phosphorilation of several enzymes of this pathway could not be attributed to the abundance increase of them. Again both proteomic approaches cited have gave clear evidences of the importance of amino acid metabolism in leaves for drought tolerance, but the contribution of different amino acids could change depending of the stress degree. These changes in proteomics are strongly reinforced by enzymatic and metabolomics data. Tolerant genotype have higher total amino acids under stress, and under severe stress, higher levels of cysteine, substrate for glutathione biosynthesis, besides higher increases in glycine, serine, lysine, threonine and isoleucine. This data clear suggest the importance of several different amino acids to osmotic adjustment, and could partially explain the lower leaf dehydration of tolerant genotype under severe water deficit. Other good agreement between proteomic and metabolomics data is observed for respiration. Topological analysis of differential proteomics and phosphoproteomics clear indicates the enrichment of the abundance of glycolytic enzymes and sugar metabolism genes in the tolerant genotype. Additionally, metabolomics data indicates the higher levels of glucose, isocitrate, aconitate and malate in this genotype, which strongly suggest that an higher increase in respiration flux to support increased amino acid biosynthesis in leaves under stress could be an important mechanism for drought tolerance in sugarcane. This study offers a good picture to illustrate the polygenic nature of drought tolerance, and the importance of the use of systemic approaches to complement single time point measurements, in order to better understand the mechanism of plant responses to water deficit.

1- INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância social, econômica e ambiental para o Brasil, ocupa 7,1 milhões de hectares, com produção anual de aproximadamente 570 milhões de toneladas sendo o país um dos principais produtores de cana-de-açúcar do mundo. Seus produtos são largamente utilizados na alimentação animal, na produção de açúcar, rapadura, água ardente e álcool combustível (Unica, 2013).

Até o final do século XIX, as variedades de cana-de-açúcar mundialmente cultivadas eram clones de *Saccharum officinarum*, a cana nobre, rica em açúcar. No entanto, no início do século XX surgiram “pragas” da lavoura canavieira, e em razão da alta suscetibilidade das canas até então cultivadas, nesta época tiveram início no mundo os primeiros programas de melhoramento genético de cana de açúcar, que em 1894, chegou ao Brasil, no estado de São Paulo por iniciativa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Landell e Alvarez, 1993).

Um dos principais fatores limitantes na produção de cana-de-açúcar é a disponibilidade hídrica. A disponibilidade hídrica é essencial para a produção, pois, quando a água é limitante, ocorre redução significativa da produtividade até mesmo nos solos mais férteis. Quando adequada, desloca o ambiente de produção favoravelmente até mesmo nos solos com baixo potencial químico (Dinardo-miranda et al. 2008). Durante o período de déficit hídrico, ocorre senescência de folhas acompanhada pela morte das raízes superficiais e das raízes mais jovens e tenras que se desidratam, ocorrendo perda do turgor nas células e ressecamento dos tecidos mais novos (Vasconcelos, 2004). Isto pode ocasionar diminuição da produtividade ou a morte da planta dada a irreversibilidade das alterações estruturais nas raízes em resposta à seca e a necessidade de formação de novas raízes laterais após reidratação (Stasovski, 1993).

A expansão da cultura da cana-de-açúcar no país nos próximos anos dependerá da ocupação de áreas que apresentam condições edafoclimáticas diferentes das atualmente ocupadas pela cultura, ou seja, com menor disponibilidade hídrica. O plantio, que já ocupa regiões brasileiras do cerrado e da caatinga, sofre fortes perdas na colheita e limitações de produtividade devido a fatores abióticos, principalmente a seca. A seleção de materiais visando o aumento da produtividade, sem preocupar-se com a seleção de plantas tolerantes ao déficit hídrico, tem sido o enfoque tradicional do melhoramento genético. Contudo, estudos que visem melhorar o desempenho das

plantas em ambientes sujeitos à deficiência hídrica devem envolver também a identificação e a seleção de atributos que contribuam para uma maior tolerância à seca (Creelman e Mullet, 1997).

A seca apresenta-se como um estresse multidimensional causando vários efeitos fisiológicos e bioquímicos nas plantas tratando-se, desta forma, em termos de tolerância o envolvimento de vários genes o que dificulta a identificação de características únicas potenciais para seleção de genótipos tolerantes (Rodrigues et al., 2009) . Desta forma, baseado nas informações apresentadas e na escassez de informações acerca da adaptabilidade de plantas C4 em condições de déficit hídrico, o presente estudo teve como objetivo estudar os mecanismos fisiológicos e moleculares de tolerância a deficiência hídrica em cana-de-açúcar. Para isso foi empenhada uma abordagem sistêmica que envolve, além de estudos fisiológicos e morfológicos, estudos em nível de proteínas envolvendo a caracterização do perfil protéico diferencial bem como de modificações pós-traducionais (fosfoproteoma e redoxproteoma) e estudos de metabólitos (metaboloma) nas duas cultivares de cana-de-açúcar descritas como contrastantes quanto a tolerância à seca.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies, porém, as plantas cultivadas, na sua maioria, são híbridas, sendo plantas perenes e próprias para climas tropicais e subtropicais onde se busca aliar rusticidade e resistência aos estresses bióticos e abióticos às boas qualidades de riqueza em açúcar (Clayton e Daniels, 1975).

O estresse causa mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo causando desvio significativo das condições ótimas para a vida podendo ser reversíveis a princípio ou tornarem-se permanentes (Larcher, 2000). Dentre os quatro estádios de crescimento caracterizados em cana-de-açúcar (germinação, perfilhamento, grande crescimento e maturação) as fases de perfilhamento juntamente com a de grande crescimento tem sido caracterizadas como o período crítico por demanda de água sendo, assim, neste período que os danos causados pela seca mais prejudicam a produção (Ramesh, 2000).

Do ponto de vista morfológico, plantas adaptadas à seca são frequentemente caracterizadas por um profundo e vigoroso sistema radicular (Annicchiarico, 2007) em que a profundidade do mesmo e alterações na resistência ao fluxo de água dentro dessa estrutura podem ser importantes atributos sob baixa disponibilidade hídrica (Monneveux & Belhassen, 1996). A combinação de mecanismos que restrinjam a perda de água associada a um sistema radicular profundo pode ser decisivo para a sobrevivência e/ou relativa estabilidade da produção de plantas tolerantes a seca, quando cultivadas em ambientes sujeitos a estiagens prolongadas (Padilha & Pugnaire, 2007; Songri et al., 2008). Um importante mecanismo de tolerância à seca, conferido pelo sistema radicular, é a alteração de sua arquitetura: ocorre uma inibição do crescimento das raízes mais superficiais, e um perfil de raízes mais profundos são produzidos, como descrito em arroz por Jiang et al., (1994) e Kobata et al. (1996).

Uma característica interessante referente à tolerância a seca trata-se do enrolamento foliar. Em folhas de cana-de-açúcar existem células epidérmicas de grandes dimensões em forma de bolha na sua superfície superior denominadas de células buliformes (Van Dillewijn, 1952). A perda de pressão de turgescência vacuolar nessas células sob estresse hídrico ocasiona o enrolamento foliar. As folhas enroladas têm uma menor exposição à luz solar, sendo, pois, menos aquecidas, reduzindo a

evaporação, conservando assim a água disponível na planta. (Inman-bambee et al., 1986; O'Toole et al., 1980).

O ajustamento osmótico também é considerado um mecanismo adaptativo a deficiência hídrica e consiste na ativa acumulação de solutos nas células como resposta a redução do potencial hídrico levando a uma maior retenção de água e conseqüentemente a manutenção da pressão de turgor que proporciona a manutenção de processos como abertura estomática, crescimento e alongamento celular. Este mecanismo envolve solutos que são intermediários de importantes vias bioquímicas incluindo aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos (Gonzalez & Ayerbe, 2011). O ajustamento osmótico como um eficiente mecanismo de tolerância a seca tem sido relatado por exercer efeito direto ou indireto sobre a produtividade de plantas, em que genótipos com maior capacidade de ajuste tiveram maior rendimento como observado em trigo (Santamaria et al, 1990; Morgan, 1995) e sorgo (Rodriguez-Maribona et al, 1992; Ludlow et al , 1990).

A resposta das plantas a deficiência hídrica tem sido amplamente relatada, assim como há relatos das contribuições destas respostas para a tolerância diferencial a este estresse abiótico. O efeito na fotossíntese tem sido um dos principais aspectos estudados. Entretanto, a grande maioria destes estudos tem sido feitos em plantas C3. Em contraste, a resposta da fotossíntese em plantas C4 ao estresse hídrico tem sido pouco estudada (Guanoum, 2010). Embora as plantas C4 representem somente 4 % das plantas, elas contribuem em cerca de 20% da produtividade da biomassa primária global, e representam um importante grupo de alimentos consumidos pelos seres humanos e animais (milho, sorgo e cana-de-açúcar, além de pastagens) (Lloyd e Farquhar, 1994; Ehleringer et al., 1997).

Um dos primeiros efeitos da deficiência hídrica nas plantas manifesta-se sobre os estômatos. O fechamento estomático diminui o influxo de gás carbônico limitando sua taxa fixação o que compromete a capacidade fotossintética e conseqüentemente o crescimento (Brix, 1962; Boyer, 1970).

O déficit hídrico pode causar um decréscimo na fotossíntese por meio de uma limitação de CO₂, resultante do fechamento dos estômatos ou através de um efeito direto sobre a capacidade fotossintética nos cloroplastos (Lawlor e Cornic, 2002). O controle estomático da transpiração é considerado o principal processo determinante da resposta a curto-prazo de uma planta a condições de seca, afetando diretamente a taxa

de depleção de água do solo, o potencial hídrico da planta e o transporte de solutos no fluxo xilemático (Tardieu e Simonneau, 1998).

A rota fotossintética das plantas C4 tem sido considerada uma resposta evolucionária a altos níveis de fotorrespiração resultantes de várias combinações de estresses ambientais incluindo baixo nível de CO₂ atmosférico, alta temperatura, deficiência hídrica e/ou salinidade (Ehleringer et al., 1991, 1997; Sage, 2004; Tipple e Pagani, 2007). É bem estabelecido que as vantagens fisiológicas conferidas pelas altas taxas fotossintéticas das plantas C4, comparadas às plantas C3 sob alta luz e temperatura, são cruciais para a dominância ecológica das plantas C4 em ambientes naturais quentes e áridos (Osmond et al., 1982; Long, 1999; Edwards e Still 2008; Osborne e Freckleton 2009, Edwards e Smith 2010).

Em particular, o mecanismo concentrador de CO₂ nas folhas C4 resultam em uma maior eficiência do uso da água (EUA) (Downes, 1969), comparadas com as plantas C3 em condições normais. Embora este mecanismo seja um tamponador de reduções de CO₂ que ocorrem em resposta ao fechamento estomático, reduzindo a transpiração, conservando mais a água do solo, principalmente quando a demanda evaporativa é alta (Percy e Ehleringer, 1984), experimentos controlados de seca mostram que as plantas C4 apresentam uma maior limitação bioquímica da fotossíntese sob seca comparada com plantas C3 (Ghannoum, 2002; da Silva e Arrabacxa, 2004). Os estudos destas limitações metabólicas têm sido bem caracterizados em plantas C3 (Lawlor, 2002; Flexas et al., 2006). Adicionalmente, estudos de fitogeografia em escalas regionais em savanas, têm mostrado que a abundância relativa de monocotiledôneas C4 declina com o decréscimo da precipitação anual (Paruelo e Lauenroth, 1996; Taub, 2000; Cabido et al., 2008; Taylor et al, 2011). Em conjunto, estas observações levantam questões importantes a cerca dos custos e vantagens da fotossíntese C4 em condições de seca, bem como as questões relativas à evolução filogenética das plantas C4 em savanas. Mesmo entre os subtipos de plantas C4 ou entre diferentes espécies do mesmo grupo a resposta à seca varia. Por exemplo, várias plantas do subtipo NAD-ME possuem maior EUA do que plantas NADP-ME (cana, milho e sorgo) (Ghannoum et al., 2002; Taylor et al, 2011).

Uma visão mais detalhada da literatura sobre os efeitos da seca nas plantas C4 mostra que a concentração intercelular de CO₂ (C_i) diminui somente nas fases iniciais do estresse hídrico, como descrito para o milho (Lal e Edwards, 1996; Leakey et al., 2004), sorgo (Williams et al., 2001), cana (Du et al., 1996), e amaranto (Lal e Edwards,

1996). Durante estágios posteriores da seca, quando há maior desidratação foliar, tem sido descrito em todas estas espécies o aumento de C_i , enquanto a assimilação líquida de carbono diminui (Kalapos et al., 1996; Lal e Edwards, 1996). Entretanto esta resposta parece não ser consensual. Em contraste a estes trabalhos, várias plantas C4 não apresentam mudanças em C_i sob estresse hídrico (Saliendra et al., 1996, Ripley et al., 2007), ou mesmo aumentando (Kalapos et al., 1996; Lal e Edwards, 1996).

O efeito da seca na fase bioquímica da fotossíntese também tem sido sustentada com dados mostrando o aumento do vazamento de CO_2 das células da bainha em plantas C4 sob seca (Bowman et al., 1989; Saliendra et al., 1996). O mecanismo de concentração de CO_2 em plantas C4 tem um custo energético equivalente a 2 ATP, consumidos na reação de síntese do fosfoenolpiruvato (PEP) (Hatch, 1987). Como resultado, qualquer CO_2 que vaza das células da bainha significa uma redução da eficiência energética da fotossíntese C4. Este aumento no vazamento pode ser causado por vários fatores, como redução relativa de enzimas do ciclo C3 em relação ao ciclo C4 (von Caemmerer e Furbank, 1999). No estudo de Saliendra et al. (1996), o aumento no vazamento de CO_2 foi também relacionado com a redução da razão da atividade enzimática da RUBISCO/PEPC, onde uma redução da atividade de RUBISCO foi ativada por um leve aumento na atividade da PEPC.

Alterações nos processos mitocondriais, como a respiração, podem também acontecer em paralelo às alterações da fotossíntese. A cadeia respiratória é responsável pela dissipação do excesso de poder redutor originado nos cloroplastos (Raghavendra & Padmasree, 2003) e estudos têm destacado que mutantes com alguma disfunção mitocondrial possuem uma menor capacidade fotossintética (Giraud et al., 2008; Juszczuk et al., 2007; Nunes-Nesi et al., 2007), evidenciando que a respiração é uma importante via metabólica que pode se relacionar com a tolerância à seca.

Além da fotorrespiração, a qual é muito baixa nas plantas C4, um dreno alternativo do excesso de poder redutor é a reação de Mehler, a qual envolve a redução direta do oxigênio molecular a radicais superóxidos no fotossistema I. Em grande parte dos estudos envolvendo plantas C3, sob estresse hídrico moderado a contribuição da reação de Mehler para o fluxo eletrônico é reduzida ou permanece não modificada, e evidências indicam que este ciclo é maior nas plantas C4 em ausência do estresse. (Cornic e Fresneau, 2002; Haupt-Herting e Fock, 2002). Entretanto, em várias plantas C4 a contribuição desta reação para a redução do estresse oxidativo pode diminuir sob estresse hídrico, como observado para o milho sob estresse moderado, onde as

atividades da peroxidase e da redutase da glutaciona não foram afetadas pela seca (Brown et al., 1995).

Excesso de pequenas moléculas denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser formado durante o estresse. EROs são oriundas dos processos fotossintéticos, da fotorrespiração e respiração (Noctor, 1998) sendo o resultado da redução parcial do oxigênio atmosférico, existindo basicamente quatro formas nas células: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). Por outro lado, vem sendo demonstrado que se as EROs forem mantidas a baixos níveis podem funcionar como um componente da via de sinalização, dirigindo respostas de defesa e aclimação contra o estresse (Dat et al. 2000 e Vranova et al. 2002).

Embora as plantas possuam um sistema composto por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para decompor o excesso de EROs, quando estas alcançam certos níveis, tornam-se extremamente deletérias, iniciando uma descontrolada cascata oxidativa que danificam membranas e outros componentes celulares resultando no estresse oxidativo (Miltter et al. 2002 e Dat et al. 2000). Desta forma, os níveis normais de EROs são alterados quando se inicia a seca. Isto ocorre devido ao fechamento dos estômatos levando a limitação de CO_2 e acúmulo de poder redutor (NADPH). Conseqüentemente, o excesso de energia solar é canalizado para uma maior produção de EROs. Diante deste fato, ocorre a ativação do sistema antioxidante e de vias de sinalização para respostas de aclimação. Se o estresse é severo, resultará em quantidade exacerbada de EROs que não poderá ser contrabalanceada pelo sistema antioxidativo, levando a eventos deletérios que culminam com morte celular (Carvalho, 2008). Portanto, o equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras, é crucial para regulação dos níveis de ERO nas células. Nos mecanismos enzimáticos de destoxificação de ERO, a SOD atua como a primeira linha de defesa contra as EROs, transformando o superóxido em peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio produzido pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (catalase) ou, somente em água, pela ação da ascorbato peroxidase. O ascorbato pode reduzir radical livre com ou sem a catálise da APX e pode indiretamente regenerar antioxidantes ligados à membrana como o α -tocoferol (Noctor e Foyer, 1998).

O hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) é muitas vezes relacionado a respostas a estresses e está intimamente relacionado com mecanismos de tolerância,

pois seus níveis tendem a aumentar consideravelmente em condições de déficit hídrico (Silva, 2007; Sreenivasulu, 2012). A regulação dos processos fisiológicos e tolerância à seca mediadas por ABA está associada a alterações no seu conteúdo, o que é determinado pela sua taxa de biossíntese, degradação e transporte entre os diferentes órgãos e da sensibilidade da célula e/ou tecido ao ABA (Sreenivasulu, 2012). Constatou-se em estudo com café que a redução do potencial hídrico induz aumento de ABA foliar (Silva, 2007).

ABA dirige respostas que adaptam a planta à condição de estresse (Shinozaki et al., 1997). No entanto, estudos têm mostrado que somente ABA não é suficiente para a resposta. O acúmulo de ABA é necessário para aumento de prolina em *Arabidopsis thaliana* em condições de baixo potencial hídrico, mas aplicação exógena de ABA em condições de alto potencial hídrico não reproduz o acúmulo de prolina induzida no déficit hídrico. Assim, tem sido sugerido que o status metabólico da planta em condição de seca seria a ligação de ABA com a via de sinalização desse hormônio. Como EROs induzem várias modificações durante o estresse, essas seriam a ponte entre o status metabólico e a sinalização de ABA agindo “downstream” deste hormônio e modulando a transdução de sinal (Verslues et al., 2005).

Dentre as EROs, o H_2O_2 tem sido estipulado como o principal candidato a agir como mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal em resposta a estresses devido a sua baixa reatividade, a capacidade maior de difusão e maior meia vida (Pitzschke et al. 2006).

Estudos têm mostrado que o H_2O_2 está envolvido na via de sinalização mediada por ácido abscísico (ABA). Sua concentração aumenta sob ação de ABA e age na ativação de canais de cálcio em células guardas de *Arabidopsis* induzindo o fechamento estomático (Pei et al. 2000). Além do mais, outros estudos mostram sua ação em induzir proteínas cinases (MAPKs- mitogen-activated protein kinases) que são implicadas em várias cascatas de transdução de sinal que modulam a expressão gênica (Desikan et al. 1999) e, conseqüentemente, alteram os níveis proteicos.

Nas células, as EROs podem reagir com diversas moléculas. Ao nível de proteínas uma das principais modificações oxidativas é a carbonilação. As cadeias laterais dos aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina sob ação de EROs oxidam e formam grupos reativos aldeídicos ou cetônicos (carbonila) causando inativação, ligações cruzadas e quebra das proteínas. Não há evidências da reversibilidade destas reações e a carbonilação seria uma marcação da proteína para proteólise. As causas que

podem levar ao acúmulo de proteínas carboniladas nas células incluem aumento da produção de EROs, diminuição no sistema de defesa antioxidante, diminuição na capacidade de remoção das proteínas oxidadas e aumento da suscetibilidade das proteínas ao ataque oxidativo (Nystrom, 2005). As plantas podem exibir graus variados de carbonilação durante seu ciclo de vida mesmo na ausência de estresse. A espécie *Arabidopsis thaliana* exibiu aumento no nível de carbonilação proteica no estágio vegetativo com diminuição no início da fase reprodutiva. Tem sido sugerido que o baixo grau de carbonilação durante o estágio reprodutivo pode ser parte de uma estratégia para limitar a transferência de componentes danificados por oxidação para a prole (Johansson et al., 2004).

Além da oxidação, as proteínas estão sujeitas a outras modificações pós-traducionais. A fosforilação é uma das modificações mais comuns em plantas e pode afetar a função da proteína, a localização subcelular, a interação com outras proteínas e a sua estabilidade. Além do mais é um dos mais críticos mecanismos regulatórios nas vias de transdução de sinal modulando o crescimento, desenvolvimento e respostas ao ambiente (Huber et al.2007).

A despeito dos numerosos trabalhos sobre déficit hídrico e dos recentes avanços em técnicas de biologia molecular, os mecanismos de tolerância à seca permanecem ainda pouco esclarecidos. Existem, relativamente, poucos estudos sobre tolerância à seca em cana-de-açúcar. Genes que respondem aos estresses abióticos em nível transcricional têm sido identificados em várias plantas, e muitos deles têm um papel importante na tolerância a esses estresses (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Diferenças entre condições de disponibilidade hídrica são refletidas em mudanças na expressão gênica as quais podem ocorrer por variações nos níveis de mRNA ou proteína. O uso de arranjos de DNA tem sido de grande utilidade para estudos de genoma funcional, mas ainda existem sérios problemas de reprodutibilidade entre laboratórios que ainda não foram resolvidos (Canales et al., 2006). Além do mais, existe uma baixa correlação entre as alterações detectadas nos níveis dos transcritos e aquelas observadas nas proteínas, em grande parte pelo fato da regulação ocorrer durante ou após a tradução. Desta forma, estudos ao nível de proteínas ajudam a complementar as informações obtidas com a análise do transcriptoma.

A tecnologia de análise do proteoma é recente e foi revolucionada com a descoberta de novas formas de ionização e fragmentação, de grande valor para o estudo de grandes macromoléculas como as proteínas. Esta revolução está associada à análise

de massa com resolução e precisão cada vez maiores (Cox e Mann, 2007). Mas a utilidade da análise proteômica não se limita a expressão diferencial, como a análise do transcriptoma. Ela permite ainda detalhar alterações na expressão e vários diferentes tipos de alterações após a tradução (Cox e Mann, 2007).

Do ponto de vista pós-traducional, a então chamada redoxproteômica é a abordagem mais adequada para a visualização de proteínas modificadas pelo estresse oxidativo. O estresse oxidativo deixa impressões na forma de diferentes componentes modificados pela oxidação e usando a redoxproteômica é possível decifrar o potencial papel desempenhado pelas modificações induzidas pelas EROs nas células (Rinalducci et al. 2008).

Outro campo promissor para melhor compreensão dos mecanismos de tolerância à seca é a fosfoproteômica, sendo um campo ainda recente em estudos com plantas de importância econômica (Jensen, 2006; Mann & Jensen, 2003). O principal objetivo dessa abordagem é identificar sítios de fosforilação em proteínas e compreender como isso regula processos celulares envolvidos nos mecanismos de tolerância (Rampitsch & Bykova, 2012). A fosforilação é catalisada pelas proteínas cinases enquanto a desfosforilação é catalisada pelas proteínas fosfatases. Esta modificação tem como alvo os grupos hidroxilas dos resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) e já é bem conhecida por exercer um papel chave na sinalização celular. Em mamíferos, tanto a fosforilação como outras modificações pós traducionais, tais como a acetilação, exercem importantes funções no metabolismo mitocondrial (Guan & Xiong, 2011; Koc & Koc, 2012), mas, em plantas apenas a fosforilação de proteínas mitocondriais está sendo estudada com mais detalhes (Havelund et al., 2013).

Mais próxima ainda do fenótipo é a abordagem metabolômica que permite a análise global dos metabólitos, ou seja, as inferências dos produtos finais de alterações das vias metabólicas afetadas por fatores bióticos ou abióticos (Fiehn, 2002). Entre todas as tecnologias ômicas, o metaboloma é o mais transversal e pode ser aplicado para diferentes organismos com pouca ou nenhuma modificação. Ele tem sido aplicado com sucesso para o estudo de fenótipos moleculares das plantas em resposta ao stress abiótico, a fim de encontrar padrões particulares associados a tolerância ao estresse. Estudos puseram em evidência o envolvimento essencial de metabólitos primários: açúcares, aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs como marcadores directos da disfunção fotossintética, bem como efectores de ajustamento osmótica. Além do mais, o estresse oxidativo induzido pela indisponibilidade hídrica leva ao acúmulo de

compostos antioxidantes como ácido ascórbico, glutatona e polifenóis (Arbona et al., 2013). Desta forma, o metaboloma, aliado a outras metodologias como proteoma e transcriptoma, é uma ferramenta de grande importância para estudar os mecanismos de resposta de cana-de-açúcar a deficiência hídrica.

Neste estudo foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar com características diferenciais em resposta a condições de seca. A primeira cultivar, RB867515, caracterizada como resistente, é uma variedade de rápido desenvolvimento, a qual facilitou a expansão dos canaviais para solos de baixa fertilidade, arenosos e com restrições hídricas, e que tem como característica morfológica o hábito de crescimento ereto, média despalha, perfilhamento médio com colmos de diâmetro médio, boa brotação de soqueira, resistência ao acamamento e pouco florescimento. A zona radicular desta variedade é de largura média, sem enraizamento aéreo, folhas de largura média e boa capacidade de brotação. Além disso, possui alto teor de sacarose, alta produtividade agrícola e resistência à ferrugem comum e alaranjada, ao carvão, escaldadura e intermediária resistência à broca do colmo. Já a segunda variedade RB855536, sensível, apresenta bom touceiramento, colmos eretos, de diâmetro médio e cor arroxeadas e bainhas semiabertas de fácil despalha. Possui alta produtividade industrial, ausência de florescimento e ótima brotação de soqueira, mesmo sob palha. Para um bom desempenho, esta variedade necessita ser plantada em ambientes de elevada fertilidade e com suprimento hídrico adequado. Quando o plantio é precoce (dezembro a janeiro) pode ocorrer estresse hídrico muito forte se o inverno for muito seco (RIDESA, 2010).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Cultivo e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Colmos da cultivar RB 867515 (tolerante) e da RB 855536 (sensível), contrastantes quanto a produtividade em condições de seca (Hoffmann, 2008), foram plantados diretamente em vasos de 30 L contendo 28 kg de solo/esterco bovino, na proporção de 2:1. Três colmos foram germinados por vaso.

O solo foi mantido na capacidade de campo durante todo o período de crescimento até a imposição do déficit hídrico. As análises e coletas foram realizadas em folhas específicas nas plantas de cana-de-açúcar. Foi adotado o sistema de numeração denominado de “sistema Kuijper” utilizado para a padronização dos estudos em folhas, o qual define que a folha possuidora da primeira aurícula visível (Top Visible Dewlap, TVD) no topo da planta onde se localizam as folhas novas, recebe a denominação de folha +1 e assim também se procede com o nó que a prende e com seu internódio (Figura 1-B). As folhas mais velhas recebem numeração crescente, ou seja, +2, +3, etc, e as mais novas, em direção ao ponteiro e gema apical, recebem a numeração 0, -1, -2, etc (Van Dillewijn, 1952).

Aproximadamente 4 meses após plantio, período em que as plantas se encontravam com cerca de 1m de comprimento (Figura 1-A), a irrigação foi suspensa até obtenção de potenciais hídricos de -0,5MPa (estresse moderado) e -1MPa (estresse severo) mensurados em folhas +3 com a utilização de uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemãhã (Ψ_{am}) (4:30h – 5:30h) conforme descrito por Da Matta et al. (2003). Por se tratar de uma metodologia destrutiva e o número de folhas ser limitado, monitorou-se também a umidade do solo utilizando-se eletrodo “EC-5 Soil Moisture Sensor” até obtenção de valores em torno de 20% e 14% relativos, respectivamente, baseado em testes preliminares, ao estresse moderado e severo.



Figura 1- Cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 e RB 855536 quatro meses após plantio (A), anterior a imposição do déficit hídrico. Detalhe a esquerda (B) mostrando a numeração foliar segundo o “sistema Kuijper”.

3.2- Teor relativo de água (TRA)

O teor relativo de água (TRA) foi calculado segundo Silva et al. (2007) baseado no peso fresco (Pf), peso túrgido (Pt) e peso seco (Ps) aplicados na fórmula $TRA = (Pf - Ps) / (Pt - Ps) * 100$. Para isso, 4 discos foliares da folha +1 foram coletados e imediatamente pesados (Pf) seguido de imersão em água desionizada em ambiente protegido da luz por 12 h à aproximadamente 24°C. Os discos foram secos com papel absorvente para retirada do excesso de água e pesados nova pesagem (Pt). Por fim, foram completamente secos em estufa de circulação forçada por 48 h a 80°C, resfriados a temperatura ambiente e novamente pesados (Ps).

3.3- Caracterização das variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

A caracterização foi realizada em folhas +1 em todas as unidades experimentais, incluindo grupo controle. Esta caracterização viabiliza o entendimento do controle de abertura estomática em resposta ao status hídrico solo/planta, e suas implicações no aparato fotossintético.

Para o estudo destas variáveis foi utilizado analisador de gás no infravermelho (IRGA, Li-Cor – Li6400 XT), conforme descrito por Flexas et al. (2007).

As variáveis relacionadas às trocas gasosas foram a taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As medições foram realizadas em casa de vegetação entre 11 e 14 horas utilizando-se radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 , temperatura e umidade ambiente.

J\u00e1 as vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila a foram a fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F_0) e m\u00e1xima (F_m) das folhas adaptadas ao escuro com a finalidade de calcular o rendimento qu\u00e2ntico potencial do FSII (F_v/F_m) conforme descrito por Van Kooten e Snel (1990). Foram determinados ainda a fluoresc\u00eancia m\u00ednima de folhas adaptadas a luz ($F_0' = F_0 / (F_v/F_m + F_0/F_m')$), fluoresc\u00eancia m\u00e1xima de folhas adaptadas \u00e0 luz (F_m'), rendimento qu\u00e2ntico efetivo do FSII (Φ_{FSII}), taxa aparente de transporte de el\u00e9trons ($\text{ETR} = \Phi_{\text{FSII}} \times \text{RFA} \times 0,5 \times 0,84$) segundo Genty et al. (1989), rendimento qu\u00e2ntico da dissipac\u00e3o da energia regulada do FSII ($\Phi_{\text{NPQ}} = (F/F_m') - (F/F_m)$) e rendimento qu\u00e2ntico da dissipac\u00e3o de energia n\u00e3o regulada do FSII ($\Phi_{\text{NO}} = F/F_m$), sendo Φ_{FSII} , Φ_{NPQ} e Φ_{NO} calculados conforme Kramer et al. (2004), Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004), resultando em somat\u00f3rio unit\u00e1rio ($\Phi_{\text{FSII}} + \Phi_{\text{NPQ}} + \Phi_{\text{NO}} = 1$).

3.4- Coleta e armazenamento das amostras foliares

Ap\u00f3s caracteriza\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis de trocas gasosas e de fluoresc\u00eancia da clorofila a, as amostras foram coletadas (folha +1) por volta das 12-13 horas em envelopes de alum\u00ednio devidamente identificados. Foram imediatamente congelados em nitrog\u00eanio l\u00edquido e transferidos para ultra refrigeradores onde permaneceram a -80°C at\u00e9 o momento das an\u00e1lises moleculares/bioqu\u00edmicas.

Medi\u00e7\u00f5es biom\u00e9tricas (altura, numero de folhas, perfilhos, entren\u00f3s e volume radicular, enrolamento foliar) foram realizadas e, logo em seguida, os \u00f3rg\u00e3os vegetais (folha, colmo, bainha e raiz) foram coletados e colocados em estufa para secagem e posterior mensura\u00e7\u00e3o da massa seca.

3.5- Morfometria radicular

Um estudo mais aprofundado das ra\u00edzes de cana-de-a\u00e7\u00facar foi realizado em novo experimento mediante utiliza\u00e7\u00e3o do sistema de “rizotrons”. Para isso, canos de policloreto de polivinila (PVC) com cerca de 20 cm de di\u00e2metro e 1,2 m de comprimento foram cortados e adaptados com uma placa de vidro na lateral de modo a

ter acesso visual em toda extensão do recipiente. As plantas foram cultivadas em “rizotrons” contendo 40 L de solo:esterco (2:1) e aos 4 meses após plantio foi imposto o déficit hídrico como relatado anteriormente. Segmentos de raízes em diferentes profundidades foram coletados, lavados com água corrente e armazenados em álcool 20%, 5°C. As raízes foram digitalizadas em bandeja de acrílico contendo água e colocada sobre escâner de alta resolução (Image Scanner III -200 dpi). As análises das imagens foram realizadas no software WinRHIZO o qual se determinou os parâmetros de comprimento, diâmetro, área superficial e volume. Em seguida, cada segmento radicular foi seco em estufa com objetivo de expressar os resultados baseados na massa seca.

3.6- Discriminação isotópica do ^{13}C

Amostras de folhas (+1) coletadas foram secas em estufa de ventilação forçada à 70°C por 72 h e posteriormente trituradas e encaminhadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Departamento de Solos (DPS) da Universidade Federal de Viçosa, onde a abundância natural do isótopo ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) foi determinada por combustão do material orgânico em analisador elementar conectado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA GSL 20-20, Sercon, Crewe, UK). A razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) das amostras foi expressa em partes por 1000 (‰) em relação ao padrão Pee Dee Belemnita (PDB), conforme a equação (Bernoux et al., 1998):

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ amostra} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}} \right) \times 1000$$

A partir dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, a discriminação isotópica do ^{13}C (Δ ‰) e Φ (fração de carbono fixado pela PEP-case, descarboxilado nas células da bainha, não fixado pela RUBISCO e que retorna ao mesofilo foliar) foram calculados baseados na equações (Meinzer et al., 1994) abaixo:

$$\Delta \text{ (‰)} = \frac{(\delta^{13}\text{C} \text{ (‰)} \text{ CO}_2\text{atm} - \delta^{13}\text{C} \text{ (‰)} \text{ planta})}{1 + \frac{\delta^{13}\text{C} \text{ (‰)} \text{ planta}}{10^3}}$$

$$\Phi = \frac{\Delta - a + (a - b_4)p_i/p_a}{(b_3 - s)p_i/p_a}$$

Onde “ $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})\text{CO}_2\text{atm}$ ”, abundância isotópica natural na atmosfera; “ $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})\text{CO}_2\text{ planta}$ ”, abundância isotópica natural na planta; a, fracionamento de ^{13}C durante a difusão de CO_2 no ar (4,4‰); “ b_3 ”, fracionamento durante a fixação pela RUBISCO (29‰); “ b_4 ”, fracionamento durante a dissolução de CO_2 para bicarbonato e subsequente fixação pela PEP carboxilase (-5,2‰); “s”, fracionamento durante o vazamento de CO_2 das células da bainha para o mesófilo (1,8‰); “ p_i/p_a ”, razão entre a pressão interna de CO_2 e atmosférica estimado a partir de dados de trocas gasosas.

3.7- Teores de pigmentos

Para a determinação dos pigmentos, amostras de 100 mg de folhas (+1) foram trituradas em nitrogênio líquido após adição de CaCO_3 e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de acetona 80% (v/v), por 1 minuto (min), sob luz verde. A suspensão resultante foi filtrada através de papel de filtro, sendo o resíduo lavado por três vezes com acetona 80% e o volume final completado em balão volumétrico de 25 mL com o mesmo solvente. As absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm e os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas a e b; e carotenóides) estimados conforme sugerido por Lichtenthaler (1987).

3.8- Avaliação de danos celulares

3.8.1- Aldeído Malônico (MDA)

Os teores de MDA foram estimados segundo Gomes Junior et al.(2006). Para isto, amostras de 200 mg de folhas (+1) foram trituradas, separadamente, em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 g por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v), os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria a 95°C. Após 2 horas (h), a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 g por 10 min e a absorvância dos sobrenadantes determinadas a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de absorvância molar de $155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.8.2- Extravasamento de eletrólitos

A integridade e permeabilidade da membrana plasmática foi avaliada mediante extravasamento de eletrólitos conforme Tarhanen et al. (1999). Foram coletados 5 discos foliares de 1 cm de diâmetro e imersos em 15 mL de água deionizada dentro de pesa-filtros e deixados em repouso por 8 h, momento no qual foi medida a condutividade inicial (CnI) com a utilização de condutivímetro portátil CD-4301 Lutron. Seguiu-se com a inserção dos pesa-filtros em estufa de aquecimento à 90°C por 2 h, momento no qual foi medida a condutividade final (CnF). O cálculo da permeabilidade relativa (Pr) deu-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Pr (\%)} = \text{CnI} / (\text{CnI} + \text{CnF}) * 100$$

3.8.3- Determinação do conteúdo de proteínas oxidadas.

A oxidação de proteínas por EROs leva à formação de derivados carbonilados. Grupos carbonila são formados pela oxidação dos resíduos de aminoácidos arginina, lisina, treonina ou prolina. Estes grupos podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente (Levine et al.,1990).

Para a extração de proteínas totais, 0,5 g de tecido foliar (+1) foi macerado e homogeneizado em 2 ml de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7.4) contendo EDTA 1 mM, dithiothreitol (DTT) 2 mM, Triton X-100 0,2% (v/v), and phenyl-methane sulphonyl fluoride (PMSF) 1 mM) gelado. O homogeneizado foi centrifugado (16000 g) e separado em novos tubos. Realizou a quantificação as amostras segundo metodologia descrita por Bradford (1976). Cerca de 500 µg de proteínas foram incubadas em solução contendo triton X-100 0,03% e sulfato de estreptomicina 1% na amostra por 20 min para remover ácidos nucleicos. As amostras foram centrifugadas a 2000 g por 20 min e coletou-se o sobrenadante (200 µl) para 2 novos tubos. Adicionou-se 300 µl de DNPH 10 mM em HCl 2 M a um dos tubos e 300 µl de HCl 2 M ao segundo tubo (branco) e deixou-se incubando por 1 h a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foi realizada a precipitação das proteínas com 1 ml de TCA 10% (10 minutos) e em seguida a centrifugação a 15000 g por 10 min, 4°C. Lavou-se o pellet 3 vezes com 1 ml de etanol/acetato de etila (1:1) centrifugando-se após cada lavagem. O pellet foi ressuscitado em 250 µl de tampão fosfato de potássio (20 mM, pH-2,3) contendo uréia 8 M e as absorbâncias foram lidas a 370 nm.

Novamente determinou-se a concentração de proteínas e os resultados foram expressos em nmol/mg proteínas.

3.9- Caracterização do sistema antioxidativo

Inicialmente, foi obtido um extrato bruto para uso na determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), da peroxidase do ascorbato (APX) e da superóxido dismutase (SOD). Para isto, 0,3 g de tecido vegetal foi macerado em N₂ líquido, seguido da adição de 2 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Seguiu-se a filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4°C, obtendo-se o extrato enzimático bruto. A partir deste extrato, a determinação da atividade enzimática da SOD, da CAT, da APX foi feita, respectivamente, conforme descrito por Giannopolitis & Ries (1977), Havir e Mchale (1987) e Nakano e Asada (1981).

3.10- Determinação de açúcares, malato, amido, proteínas solúveis e aminoácidos livres.

Tecido foliar liofilizado (10 mg) foi utilizado para a quantificação dos teores de açúcares. Após ser macerado em nitrogênio líquido, adicionou-se 1 mL de metanol ao pó resultante e manteve-se à 70°C por 30 min sob agitação de 950 rpm e seguido por centrifugação por 5 min a 24°C e 12000 g. O sobrenadante foi coletado em novos tubos e utilizado para a quantificação de glicose, frutose e sacarose segundo metodologia proposta por Gibon et al. (2002).

O precipitado da metodologia de quantificação de açúcares foi utilizado para quantificação de amido. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80% v/v, incubado por 10 min a 70°C e centrifugação por 5 min. a 24°C e 12000 g. O processo foi repetido por 3 vezes. O precipitado lavado foi coletado e adicionou-se 400 µL de KOH 0,2 M com incubação por 1 h a 90°C seguido pela neutralização com 70 µL de ácido acético 1M e centrifugação por 5 min a 24°C e 12000 g. Ao sobrenadante (350 µl) iniciou-se a hidrólise enzimática do amido com a utilização de amiloglicosidase por 1 h a 55°C. A glicose oriunda da hidrólise enzimática do amido foi quantificada seguindo a metodologia de Gibon et al. (2002).

Para a quantificação de proteínas solúveis totais, 10 mg de tecido liofilizado foi macerado em nitrogênio líquido, homogeneizado com 1 mL de metanol e incubado à 70°C por 30 min sob agitação de 950 rpm, seguido por centrifugação por 5 min a 24°C e 12000 g, de onde foi coletado o sobrenadante. No sobrenadante foi realizada quantificação de proteínas por metodologia do ácido bicinônico com a utilização do kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific) conforme especificações do fabricante.

Já para os aminoácidos livres foi utilizado, no sobrenadante, quantificação pelo método da ninidrina (Yemm & Cocking, 1955), no qual o sobrenadante foi adicionado ao tampão citrato/NaOH pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2% p/v e ninidrina 1% p/v sob aquecimento à 95°C por 20 min, com leitura em espectrofotômetro de placas a 570 nm.

3.11- Quantificação de ácido abscísico

A quantificação do ácido abscísico foi realizada de acordo metodologia proposta por Durgbanshi et al. (2005). Tecido foliar (10 mg) liofilizado e macerado em nitrogênio líquido foi homogeneizado em 1 mL de metanol 80% v/v e centrifugado a 5000 g por 10 min, 25°C. O sobrenadante foi coletado para o processo de purificação. Assim, o sobrenadante foi submetido a secagem até 150 µl para evaporação do metanol. O volume foi corrigido para 500 µl e o pH para 3 com adição de ácido acético 10% v/v. Adicionou-se 500 µl de éter dietílico e coletou-se a fase orgânica superior. Por fim as amostras foram secas (Speed Vac) e armazenadas a -80°C.

Para o processo de quantificação de ABA foi utilizado cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas (LC/MS) em aparelho UPLC QqQ 6430 (Agilent), pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras foram ressuspensas em 250 µl de solução de acetronitrila/água/ácido fórmico (19:81:0,5) e centrifugadas por 30 min. a 14000 g, 24°C. O sobrenadante foi coletado para novos tubos. Foi pipetado 200 µL do extrato de ABA em placas de 96 poços e vedadas com tampa siliconizada. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Os tampões de eluição usados foram ácido fórmico 0,1% em acetronitrila (A) e ácido fórmico 0,1% em água (B) num gradiente de tempo/%B de: 0/ 81; 3/50; 4/10; 4,25/10; 4,5/81. Os dados foram processados pela plataforma MassHunter.

3.12- Caracterização do proteoma e fosfoproteoma

As proteínas foram analisadas quanto à diferença na expressão (proteoma diferencial) e também quanto ao nível de fosforilação (fosfoproteoma) nas cultivares.

3.12.1-Extração de proteínas totais

Para extração das proteínas de folhas cana-de-açúcar foi usado o protocolo de extração descrito por Aryal et al. (2012), com modificações, com intuito de diminuir proteínas abundantes (RuBisCo). Cerca de 3 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido. Ao pó resultante foi adicionado 15 ml de tampão de extração contendo 0,5 M de Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM de MgCl₂, 2% de Triton X-100 e 2% de β-mercaptoetanol acrescido de 0,2% de cocktail inibidor de protease (P-9599, Sigma Aldrich), 1% de cocktail inibidor de fosfatase (P-0044, Sigma Aldrich), 25mM de Fluoreto de Sódio (NaF), 1mM de Molibdato de Sódio (Na₂MoO₄) e 0,5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O macerado foi vortexado por 30 segundos e deixado por 1 h e 30 min no gelo com agitação a cada 20 min. Em seguida, procedeu-se a centrifugação (12000 g por 10 min) e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Adicionou-se PEG 4000 ao sobrenadante para uma concentração final de 15% seguida da agitação em vórtex (30 segundos) e repouso no gelo por 30 min. Uma nova centrifugação (3200 g, 20 min) foi realizada, o sobrenadante foi coletado e as proteínas foram precipitadas com acetona 20% (1 volume) por 12 h. Após centrifugação (10000 g por 15 min), o pellet foi lavado com 10 ml de acetona gelada por duas vezes. Uma ultima lavagem foi feita com etanol gelado 80%, centrifugado e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 14 h.

O pellet foi dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 2% IPG-bulffer, 80 mM DTT) e sonicado por três vezes por 1 min no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976).

3.12.2-Separação das proteínas em géis bidimensionais

A primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 24 cm com gradientes de anfolinos entre o pH 3-10 (GE Healthcare). Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h em 450 µl de tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0.002% azul de bromofenol, 2% IPG-buffer, 0.2% DTT) contendo 1,5 mg de proteína das amostras. A IEF foi realizada em um sistema IPGphor

(GE Healthcare Upsala, Suécia) a 20°C seguindo o programa: 0.5 kVh a 500 V, 0.8 kVh a 1000 V, 13.5 kVh a 8000 V e 40 kVh a 8000 V . Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em duas etapas individualmente por 15 min em 5 mL de solução de equilíbrio (6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl pH 8.8) contendo 1% de DTT (etapa de redução) e 2,5% de iodoacetamida (etapa de alquilação), respectivamente. A separação da segunda dimensão foi realizada no aparelho PROTEAN DaltSIX (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,0 mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram de 40 min a 20 mA/gel e em seguida a 40mA/gel até a saída de bromofenol na parte inferior do gel com temperatura mantida a 10°C utilizando circulador termostático. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

Para os experimentos de 2D-PAGE, devido aos custos das análises, foram utilizadas apenas 3 réplicas biológicas escolhidas aleatoriamente para confirmar a reprodutibilidade e permitir a análise estatística dos dados.

3.12.3-Detecção das proteínas e análise de expressão

Primeiramente, os géis foram submetidos a coloração para visualização de proteínas fosforiladas. Imediatamente após a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação (ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) por 12 h sob agitação constante. Terminada a etapa de fixação, os géis foram corados usando-se o reagente fluorescente específico para fosfoproteínas Pro-Q Diamond (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todo o processo foi realizado na ausência de luz e seguindo as especificações sugeridas por Agrawal & Thelen (2009). As imagens dos géis contendo as fosfoproteínas foram digitalizadas usando o equipamento FLA 5100 (Fuji Medical Systems, Stamford, CT) no modo de escaneamento fluorescente, resolução de 300 dpi, filtro de excitação de 532 nm e emissão de 580 nm. As imagens foram calibradas com o software Multi Gauge (Fuji Medical Systems, Stamford, CT). Para a caracterização do proteoma diferencial, em seguida, os géis foram corados com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie blue G-250 0,08% (v/v) e metanol 20% (v/v) (Neuhoff et al., 1985) por 72 h e lavados com ácido acético 1% (v/v) até a eliminação completa do corante excedente. As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um

escâner ImageScanner III (GE-Healthcare) e calibradas com o programa Labscan (GE-Healthcare).

A análise das imagens dos géis do proteoma diferencial e fosfoproteoma foram realizadas no software ImageMaster 2D Platinum (GE-Healthcare). O software realiza a detecção automática dos “spots” correspondentes a proteínas em todos os tratamentos. Além do mais, permite estimar o nível de expressão das proteínas baseados no parâmetro volume (densidade ótica x área do “spot”) bem como os respectivos pontos isoelétricos e massas moleculares.

A comparação foi feita entre os géis de plantas da condição irrigada em relação ao déficit hídrico (-05 MPa ou -1 MPa) visando proteínas com aumento de expressão. Somente foram consideradas proteínas diferencialmente expressas, aquelas com variação (volume) mínima de 1,5 vezes e anova com valor p menor que 0,05.

3.12.4- Identificação das proteínas

Para a identificação, todas as proteínas diferencialmente expressas (proteoma e fosfoproteoma) foram excisadas dos géis corados com Comassie. No entanto, as imagens de géis corados com o corante fluorescente Pro-Q DPS foram sobrepostas aos géis corados com Colloidal Comassie para localizar os respectivos spots e retirá-los para identificação.

Seguiu-se a metodologia proposta por Shevchenko et al. (2006) para a tripsinização das proteínas com algumas modificações. Primeiramente, os spots diferencialmente expressos foram retirados dos géis com auxílio de uma ponteira de 1000 µl, estéril, com a ponta cortada. Para a remoção de corantes, os pedaços de géis contendo as proteínas foram transferidos para tubos de 500 µl contendo solução de acetonitrila 50% / bicarbonato de amônio 25 mM para uma primeira lavagem (12h). Em seguida, procedeu-se outra lavagem com solução de metanol 50% / bicarbonato de amônio 25 mM. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente a 750 rpm no aparelho Thermomixer digital Comfort (Eppendorf). A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min (2 vezes) e secos em Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf) por 15 min. As proteínas foram, então reduzidas com DTT 25mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C utilizando Thermomixer a 500 rpm. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente (Thermomixer a 500 rpm) na ausência de luz. Os pedaços de gel

foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min por 2 vezes, desidratados em acetonitrila por 5 min e secos em Speed Vac por 15 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (20 µg/mL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0, acetonitrila 10%. A solução com enzima (15 µl) (Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280) foi adicionada fria (4°C) e as amostras foram mantidas em banho de gelo durante 45 min para penetração no gel. Adicionou-se 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM/acetonitrila 10% e incubou-se a 37°C durante 16 h sob agitação 500 rpm.

Os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1500 rpm por 2 min e a solução foi removida para novos tubos. Aos pedaços de gel restantes foram adicionados 40 µL da solução de ácido fórmico 5% / acetonitrila 50% e 40 µL da solução de ácido fórmico 5% / metanol 60% para recuperar a maior quantidade de fragmentos trípticos. Foram novamente mantidos a 1500 rpm por 2 minutos e a solução foi removida e juntada ao tubo novo. A solução triptica foi concentrada em Speed Vac até um volume final de 5 µl e acrescida de mais 5 µl de solução contendo acetonitrila 50% / TFA 0,1%. Todas as amostras foram submetidas a dessalinização em coluna de hidrofobicidade C18 (Zip Tip - Eppendorf) seguindo recomendações do fabricante.

A identificação das proteínas foi realizada utilizando-se o espectrômetro de massa do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystem) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

Cerca de 0,5 µl de cada amostra contendo os peptídeos foi aplicada à placa de aço do espectrômetro de massas juntamente com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma), numa proporção 1:1. A placa contendo as amostras foi inserida no equipamento e analisada no modo positivo com refletor ativado. As massas dos quinze peptídeos mais intensos foram automaticamente selecionadas e submetidas a análise por MS/MS.

As proteínas foram identificadas por meio da comparação dos dados obtidos no espectrômetro de massas confrontando-os com sequências de proteínas presentes em bancos de dados (algoritmo MS/MS ion search) com auxílio do software Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). O banco de dados utilizado foi de sequências de proteínas (dados ainda não publicados) cedidas pelo SUCEST (Projeto de

sequenciamento de EST de cana-de-açúcar) (Vettore et al. 2001). As identificações geradas foram confirmadas utilizando os softwares SCAFFOLD (Proteome Software). Os parâmetros utilizados para a busca das proteínas foram: peptídeos com até dois sítios de clivagem perdidos; erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos; como modificações variáveis escolheu-se carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina, e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina.

Como as sequências de proteínas presentes no banco de dados da cana-de-açúcar não estão caracterizadas, procedeu-se uma busca via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra o banco de proteínas de arroz para identificação dos respectivos ortólogos. A classificação ontológica de cada proteína foi realizada mediante pesquisa no UniProt (Universal Protein Resource), um banco repositório de sequências e informação funcional de proteínas.

Para as proteínas fosforiladas, procedeu-se da mesma forma, entretanto, foi realizada uma busca adicional na plataforma Plant Protein Phosphorylation Data Base (P³DB) (Yao et al., 2013; Gao et al., 2009) por sítios de fosforilação nas sequências das proteínas. O objetivo foi confirmar a fosforilação da proteína obtida no gel com trabalhos anteriores que usaram metodologias diversas. Para isso, foi utilizada a ferramenta "Phosphoprotein BLAST" (E-value threshold = 0,1).

3.13- Redoxproteoma

3.13.1- Extração de proteínas totais

Para extração das proteínas de folha de cana-de-açúcar foi utilizado o protocolo descrito por Mesquita et al. (2012). As folhas foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) foi ressuspensionado e solubilizado por 2 h a 4°C em 10 mL de tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 40 mM; sacarose 250 mM; EDTA 10 mM; Triton X-100 1%; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; 2-mercaptoetanol 2%). Após centrifugação a 6000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado uma vez com 5 mL de tampão de extração e o sobrenadante coletado juntamente com o primeiro. Em seguida as proteínas foram precipitadas pela adição ao sobrenadante de 15 mL de TCA 10% em acetona gelada. Após 12 h a -20 °C, a mistura foi centrifugada a 6000 g por 15 min e o precipitado lavado (3-4 vezes) com acetona gelada até clarificação do sedimento. O

excesso de acetona foi removido com uma lavagem com etanol 80% e o precipitado foi seco a temperatura ambiente.

3.13.2- Derivatização das amostras com DNPH

O pellet foi dissolvido em tampão de amostra e as proteínas quantificadas como descrito anteriormente para proteoma diferencial. Da mesma forma foi realizada a focalização isoeétrica (IEF) carregando-se 1500 µg de proteínas em fitas de 24 cm.

A derivatização das amostras ou marcação com DNPH (dinitrofenilhidrazina) foi realizada após a IEF segundo Fedorova et al. (2010). As fitas foram incubadas em solução de HCl 2 M contendo DNPH 5 mM por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas com 15 ml de glicerol 30% (v/v) em tampão Tris (2 M). As etapas de redução, alquilação e segunda dimensão foram realizadas como descrito anteriormente. As proteínas no gel foram transferidas para membrana de PVDF utilizando aparato de transferência semi-seco (Blotting system MultiPhor Novablot kit, semi-dry by GE Healthcare) e foi realizado bloqueio da membrana por 12 horas em tampão salino Tris/Tween-20 (TBS-T) contendo leite em pó desnatado 5%. A membrana foi incubada sob agitação durante 2 h em solução contendo anticorpo primário anti-DNPH (diluição 1:7000). A revelação das proteínas carboniladas foi realizada utilizando o anticorpo secundário anti-coelho Cy5 (ECL PLEX Cy5- GE Healthcare Life Sciences) diluído 1:4000 seguido do escaneamento com comprimento de onda de 635 nm utilizando escâner de fluorescência (Fujifilm Fluorescence-Scanner FLA-5100) para obtenção das imagens.

A análise das imagens e a identificação das proteínas diferencialmente oxidadas por espectrometria de massas foram realizadas da mesma forma descrita para o proteoma e fosfoproteoma.

3.14- Análise dos resultados de proteômica

Uma vez que é cada vez maior o número de proteínas identificadas nas análises proteômicas, ferramentas que ajudem na interpretação e sumarização dos resultados são de grande importância. Desta forma, foi utilizado o software Cytoscape (Shannon et al., 2003) juntamente com o “plug in” ClueGO (Bindea et al., 2009) para este fim. A partir do software ClueGO é possível visualizar, mediante uma lista de proteínas, os processos biológicos em que cada uma está envolvida. Adicionalmente, os processos biológicos são agrupados de acordo com as proteínas que os compõem e, dentro de cada

grupo, é eleito aquele mais enriquecido, ou seja, o processo constituinte de maior proporção de proteínas. Embora nas células, as proteínas participem de múltiplas vias metabólicas, filtrar os processos mais enriquecidos é importante para uma visão daquele de maior relevância. O software permite também comparar duas ou mais listas diferentes de proteínas (exemplo, cultivar tolerante x cultivar sensível) destacando o compartilhamento ou não dessas, e por fim, os processos relacionados a cada lista.

Neste estudo, apenas grupos de proteínas que aumentaram a expressão com a imposição do déficit hídrico foram inseridas no software e comparadas.

3.15- Perfil metabólico

Às amostras de folhas de cana-de-açúcar maceradas e liofilizadas (10 mg) foi adicionado 1,5 mL de solução extratora gelada (-20°C) contendo água:metanol:clorofórmio (1:2,5:1). Foi adicionado 60 µl de ribitol (0,2 mg.mL⁻¹ em água ultra pura) como padrão interno das amostras seguido por vortex e agitação por 30 min a 4°C. Procedeu-se a centrifugação a 14000 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado para novo microtubo. Adicionou-se 750 µl de água ultra pura ao sobrenadante, seguido de vortex, centrifugação (15 min a 14000 g) e coleta (500 µl) da fase superior polar para novos tubos. As amostras foram fracionadas em volumes menores em tubos de 1,5 ml e secas sob vácuo (speed vac). A derivatização das amostras foi realizada pela adição de 40 µL de piridina (Merck) contendo metoxiamina hidrocloreto (20 mg/ml) (Sigma) submetendo-as a 37°C por 2 h com agitação. Em seguida, foram adicionados 70 µL da solução de MSTFA (20 µL/ml da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada seguindo Lisec et. al. (2006) e mantidas a 37°C por 30 min. Foi utilizado 100 µl da amostra derivatizada colocados em frascos de vidro específicos para análise no sistema GC-MS.

As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS com as seguintes especificações: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 m (MDN-35) de acordo com Lisec et al. (2006).

As amostras (1 µl) foram injetadas no modo splitless a 230°C carregado pelo fluxo de gás (fluxo contínuo de hélio) de 2 ml/min. A temperatura do forno foi

inicialmente mantida constante a 80°C e, em seguida, aumentou-se 15°C/min até alcançar 330°C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min.

Os cromatogramas gerados tiveram a linha de base corrigida e alinhada com o software MetAlign. Os picos foram atribuídos usando os espectros deconvoluídos obtidos utilizando o software ChromaTOF (LECO) e bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS) obtido do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal, Golm-Postdam, Alemanha (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb>). Atribuição do pico foi verificada com o software TagFinder (Luedemann, 2008) (bioinformatics). Áreas de picos cromatográficos para íons fragmentados anteriormente foram verificados e normalizados pela área do pico correspondente ao ribitol e corrigidas pela massa da amostra extraída.

3.16- Análise estatística

O experimento foi realizado com base em distribuição ao acaso sendo 2 cultivares, 3 regimes hídricos e 6 repetições. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa SAEG utilizando-se o teste Tukey (5% de significância) para a comparação das médias dos tratamentos entre as cultivares e os regimes hídricos. Apenas nas análises dos resultados de proteômica foram utilizadas três repetições biológicas para as análises estatísticas.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito do déficit hídrico no teor relativo de água (TRA)

O déficit hídrico ocasionou a redução do teor relativo de água (TRA) em ambas as cultivares (Figura 2). A maior tolerância da cultivar 7515 pode ser observada sob estresse severo, havendo menor desidratação (maior TRA) nesta cultivar. Isto demonstra uma maior capacidade de manutenção da quantidade de água nas folhas nessa cultivar indicando a existência mecanismos de tolerância à seca. Sob estresse moderado, nas condições testadas, as variedades não diferiram entre si.

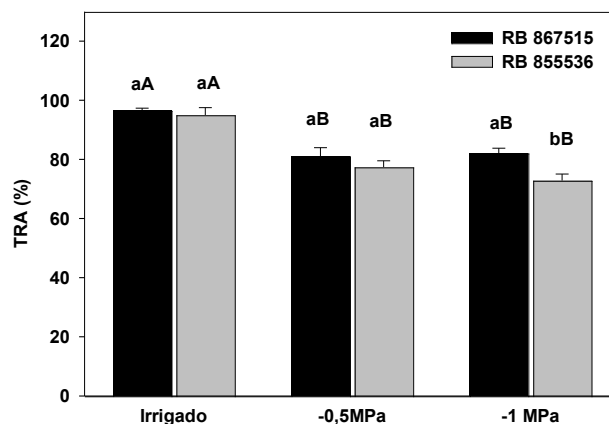


Figura 2. Teor relativo de água (%) nas folhas das cultivares RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) de cana de açúcar, submetidos a diferentes regimes hídricos. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

Adicionalmente, na condição irrigada, as duas cultivares estudadas (RB 867515, tolerante e RB 855536, sensível) apresentaram potencial hídrico da antemãhã (Ψ_{am}) igual a 0 MPa. Com a suspensão da irrigação, ambas as cultivares chegaram ao Ψ_{am} de -0,5MPa (estresse moderado) após 3 a 4 dias e depois de 5 a 6 dias alcançaram Ψ_{am} de -1MPa (severo). Assim sendo, não foi observada diferença entre as cultivares quanto a diminuição do potencial hídrico dependente do tempo, ou seja, as plantas chegaram aos mesmos valores com o mesmo número de dias.

4.2- Parâmetros de crescimento

A imposição do déficit hídrico causou mudanças no padrão de crescimento das plantas estudadas (Figura 3). A altura das cultivares (Figura 3-A) mostrou-se igual na condição irrigada e a imposição do déficit causou um menor crescimento em altura na

cultivar sensível (-0,5MPa), fato esse não observado na cultivar tolerante que manteve altura igual a das plantas irrigadas. O estresse hídrico não afetou o número de entrenós (Figura 3-B), nem o volume radicular (Figura 3-F) e nem o número de perfilhos (Figura 3-C), embora o último tenha sido superior na cultivar sensível em todos os tratamentos, ao passo que o volume radicular ser maior na cultivar sensível na ausência de estresse e a -1MPa. Em contraste, o número de folhas (Figura 3-D) mostrou-se menor com a indução do déficit hídrico nas duas cultivares, não havendo diferenças entre as mesmas. Observa-se pelos resultados que a cultivar tolerante responde diferencialmente ao déficit hídrico em termos de parte aérea uma vez que pelo menos a altura manteve-se igual a condição irrigada, fato este não observado na cultivar sensível. O fato de que a cultivar tolerante tenha tido maior altura somente sob estresse moderado e não severo, mostra que no período de estresse estudado houve tempo para a recuperação do crescimento da parte aérea na cultivar sensível. Também o aumento do nível do estresse não levou a uma redução adicional da altura das plantas.

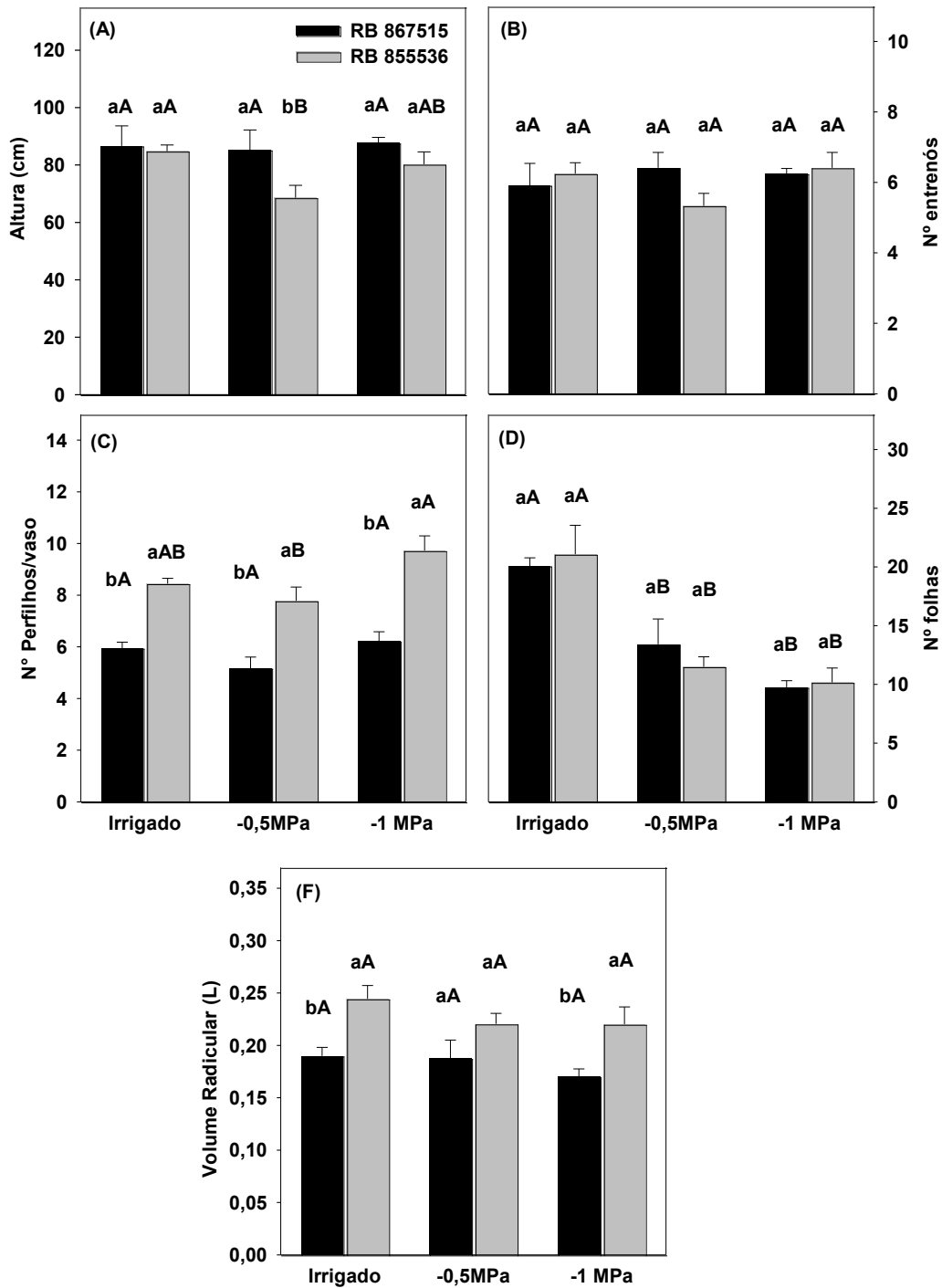


Figura 3 – Biometria das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica (Irrigado, -0,5MPa, -1MPa). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

Quanto aos parâmetros de massa seca, o déficit hídrico ocasionou uma redução da massa foliar (Figura 4-A), já a $-0,5\text{MPa}$ na cultivar tolerante, enquanto na sensível esta redução só foi vista a -1MPa . Não houve diferença entre as cultivares com relação a disponibilidade hídrica. A massa seca da bainha (Figura 4-B) também reduziu com o déficit hídrico sem diferenças entre as cultivares. Com relação à massa seca do colmo, o déficit hídrico causou redução em ambas cultivares, mas na tolerante só ocorreu sob estresse severo (-1MPa). Maior acúmulo de massa seca no colmo na cultivar tolerante foi observado independente da disponibilidade hídrica. A massa seca da parte aérea (folha, bainha e colmo) (Figura 4-E) mostrou resultados semelhantes ao da massa seca do colmo com exceção da não diferença entre as cultivares na condição irrigada. O déficit hídrico não causou alterações na massa seca radicular (Figura 4-D) embora a mesma tenha sido maior na cultivar sensível na ausência de estresse ou sob déficit hídrico moderado. cultivares. A massa seca total das plantas (Figura 4-F) foi reduzida com o déficit hídrico e somente apresentou diferenças entre as cultivares no déficit de $-0,5\text{MPa}$. A relação raiz e parte aérea (razão raiz/PA) (Figura 4-G) apresentou valores menores na cultivar tolerante independente da disponibilidade hídrica. Somente na cultivar sensível, sob estresse hídrico severo, é que houve um aumento na razão raiz/PA.

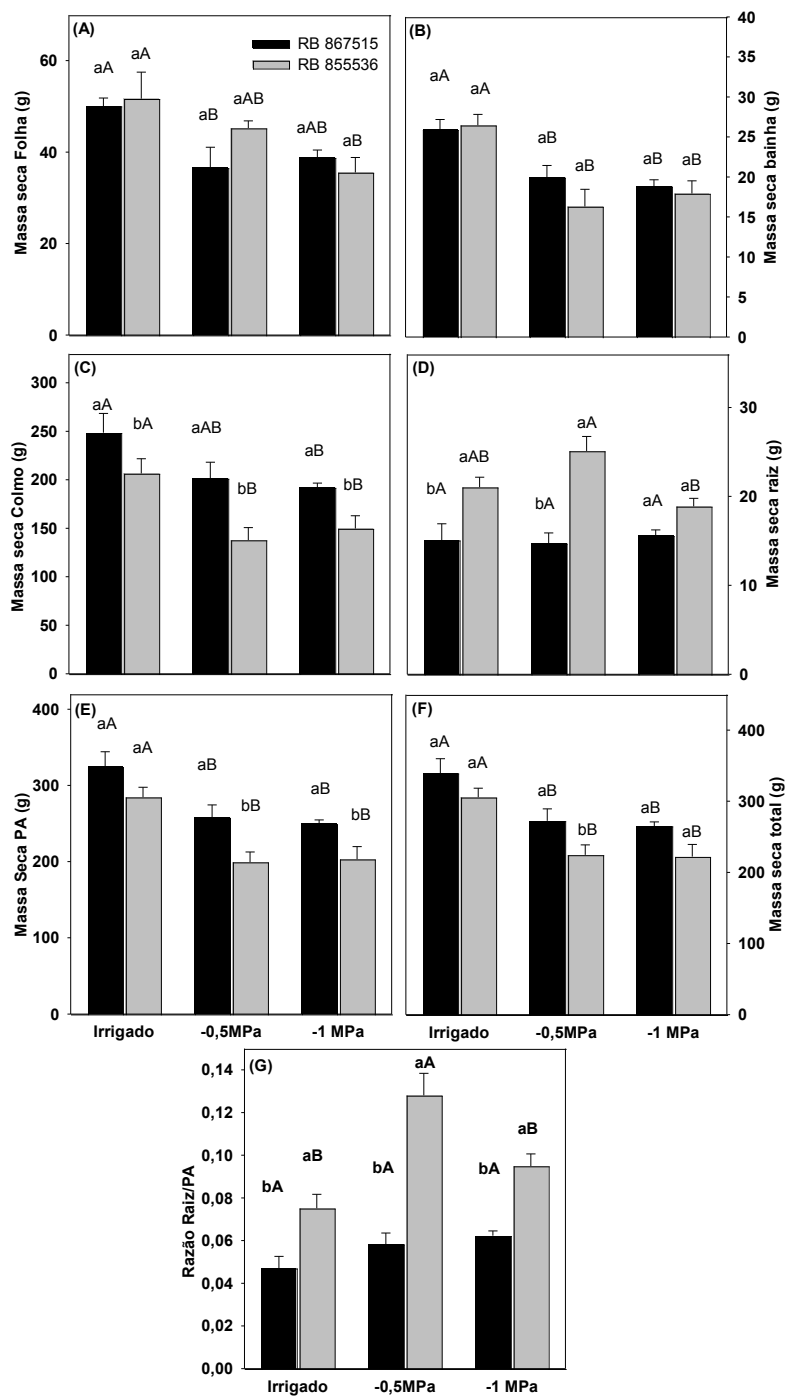


Figura 4- Parâmetros de massa seca (A- folha; B- bainha; C- colmo; D- raiz; E- parte aérea, PA; F- total; G- razão raiz/PA) das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica (Irrigado, -0,5MPa, -1MPa). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

Uma análise mais detalhada das raízes utilizando rizotrons mostrou diferenças entre as cultivares (Figura 5-A, B, C, A', B', C'). O déficit hídrico induziu o aumento do comprimento (por grama) das raízes (Figura 5-D) nas duas cultivares já ocorrendo sob estresse moderado na tolerante, ao passo que na sensível o mesmo só foi observado sob estresse severo. A cultivar tolerante apresentou maior comprimento em todas as condições hídricas comparado com a cultivar sensível. Em relação ao diâmetro das raízes (Figura 5-E), a cultivar sensível apresentou maiores valores médios e o déficit hídrico ocasionou redução desses valores em ambas cultivares. O volume por grama de raiz não diferiu em nenhum dos tratamentos (Figura 5-F). Já a área superficial por grama de raiz (Figura 5-G) foi maior na cultivar tolerante em todas as condições hídricas e não se alterou com o déficit nas cultivares. O aprofundamento radicular no solo (Figura 5-H) antes da imposição do déficit hídrico demonstrou maiores valores na cultivar tolerante. Não foi possível medir o aprofundamento radicular durante o experimento, pois as raízes estavam próximas a atingir a base do rizotron.

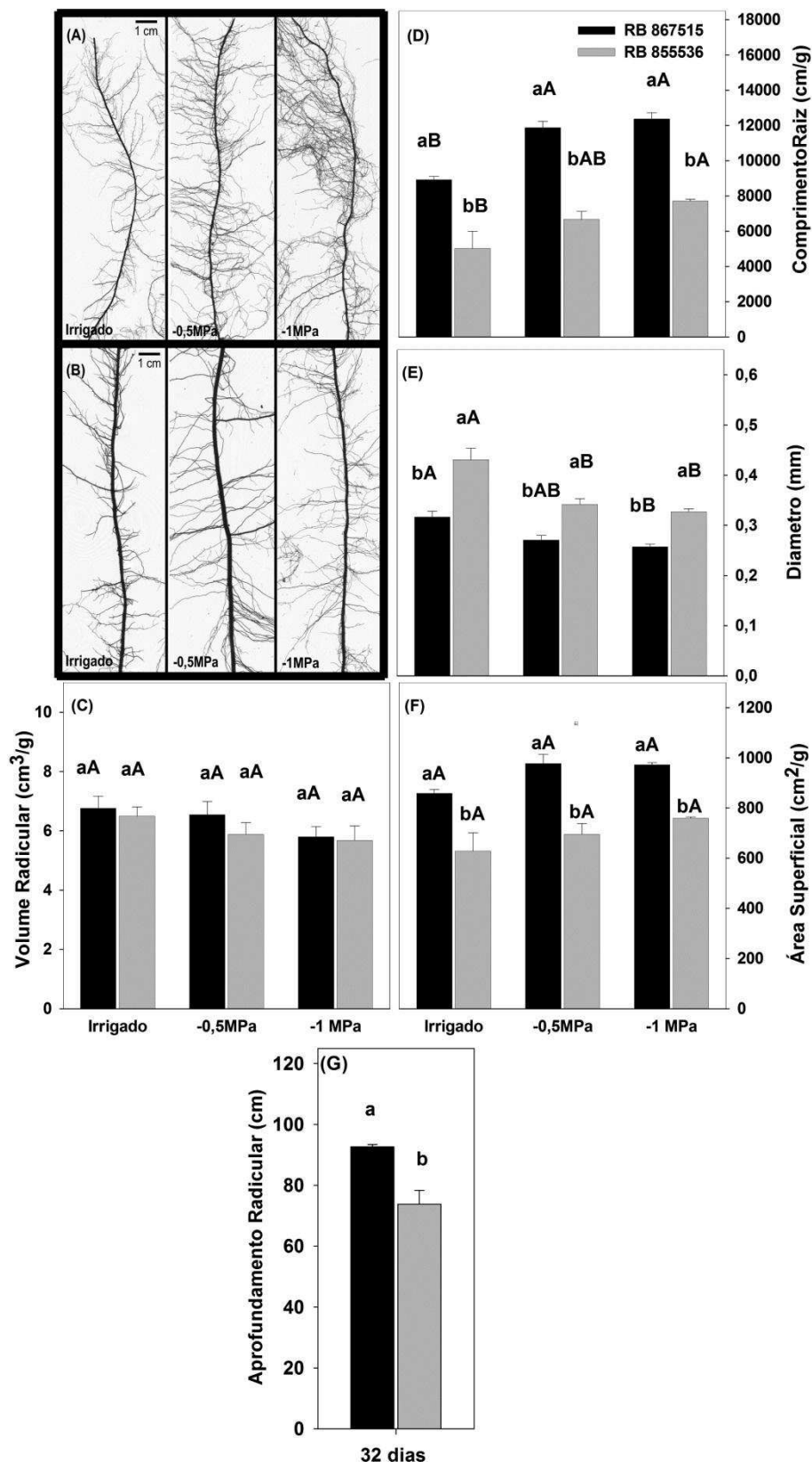


Figura 5 - Morfometria de raiz das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. Raízes escaneadas de cada cultivar são mostradas: RB 867515 (A) e RB 855536 (B). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

4.3- Enrolamento Foliar

Em relação ao enrolamento foliar (Figura 6), observou-se que a cultivar sensível teve aumento gradativo com a imposição do déficit hídrico. Já na cultivar tolerante houve diferença significativa somente no estresse mais severo (-1MPa) quando comparado a condição irrigada. Embora a cultivar sensível tenha apresentado maior número de folhas enroladas sob déficit hídrico quando comparado a cultivar tolerante, este parâmetro somente foi significativo a -0,5MPa. O enrolamento foliar pode ser um mecanismo para restringir a perda d'água uma vez que diminui a superfície de contato com a atmosfera.

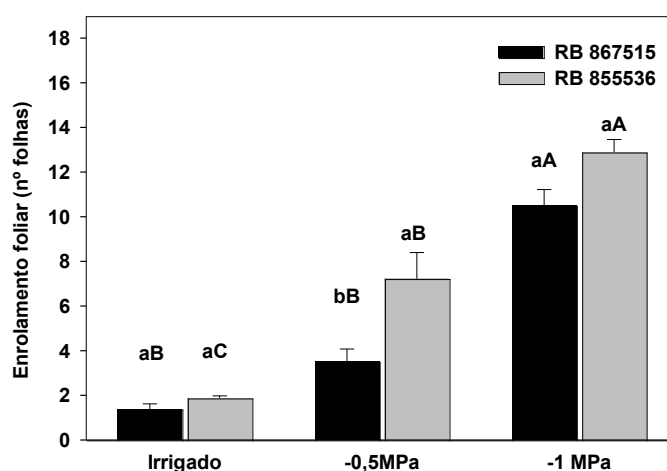


Figura 6 – Enrolamento foliar das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica (Irrigado, -0,5MPa, -1MPa). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

As características visuais de cada cultivar são mostradas na figura 7 e é possível constatar a diferença de enrolamento foliar entre as cultivares em diferentes disponibilidades hídricas.

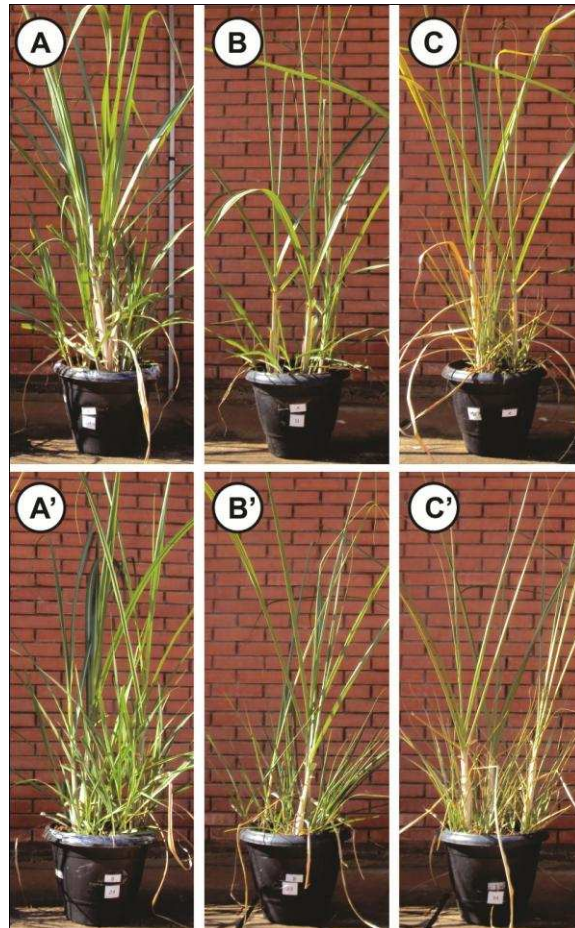


Figura 7- Cultivares de cana-de-açúcar com 4 meses de cultivo sob diferentes potenciais hídricos (Ψ_{am}) foliares. Cultivar RB 867515 (Tolerante) na condição irrigada (A), -0,5MPa (B) e -1MPa (C) são mostrados na parte superior. Na porção inferior, a cultivar RB 855536 (Sensível) irrigada (A'), -0,5MPa (B') e -1MPa (C').

4.4- Trocas gasosas e discriminação isotópica do ^{13}C

Os valores da taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) foram maiores na cultivar tolerante na ausência de estresse (Figura 8-A), assim como a transpiração (E) (Figura 8-B) e condutância estomática (gs) (Figura 8-C); registre-se que as mesmas sofreram forte redução com a imposição do déficit hídrico, não diferindo entre as cultivares sob estresse para nenhuma destas 3 características.

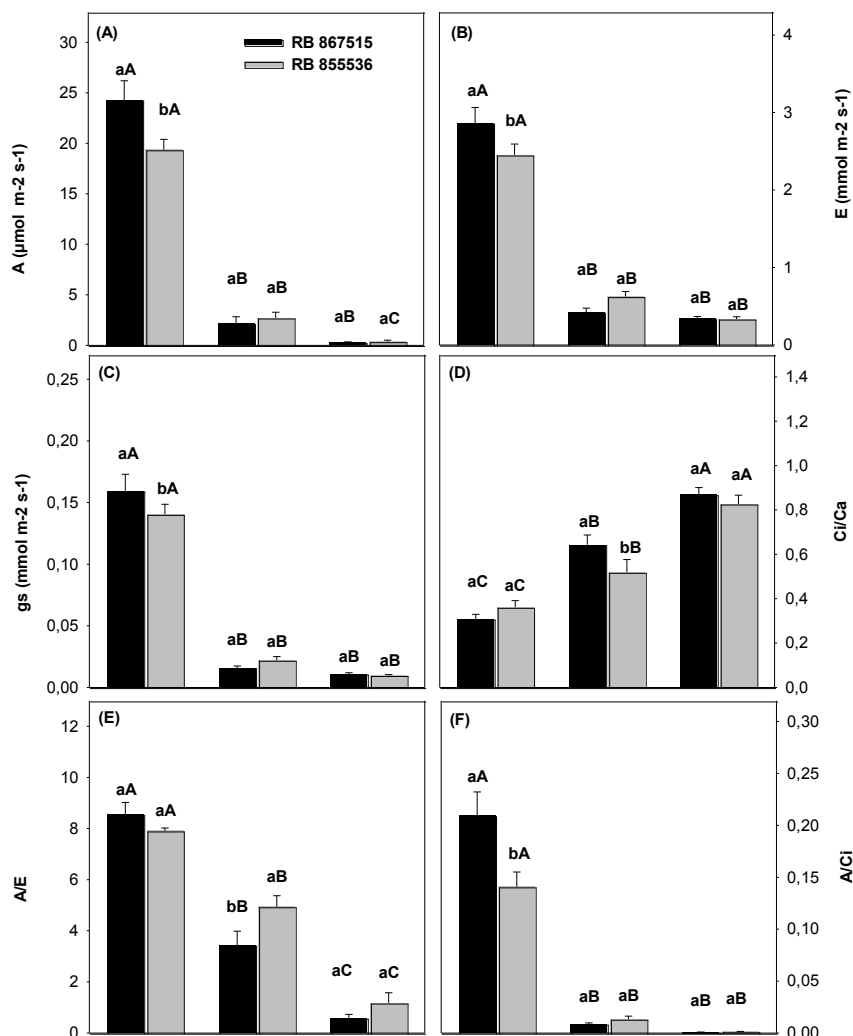


Figura 8- Parâmetros de trocas gasosas das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), razão entre concentração interna e ambiente de CO_2 (D), eficiência do uso da água (E), eficiência de carboxilação (F) das cultivares de cana de açúcar, RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível), submetidos a diferentes déficits hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

Em decorrência do fechamento estomático sob seca, a razão entre concentração interna e externa de $\text{CO}_2(\text{Ci}/\text{Ca})$ (Figura 8-D) sofreu elevação progressiva para ambas cultivares no decorrer da imposição dos déficits, sendo somente sob estresse moderado maior na cultivar tolerante.

A eficiência instantânea do uso da água (A/E) também sofreu diminuição progressiva com o déficit hídrico nas cultivares, mas esta eficiência foi maior na cultivar tolerante a -0,5MPa (Figura 8-E). Já eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) diminuiu com a imposição do déficit hídrico de forma indistinta entre as cultivares (Figura 8-F).

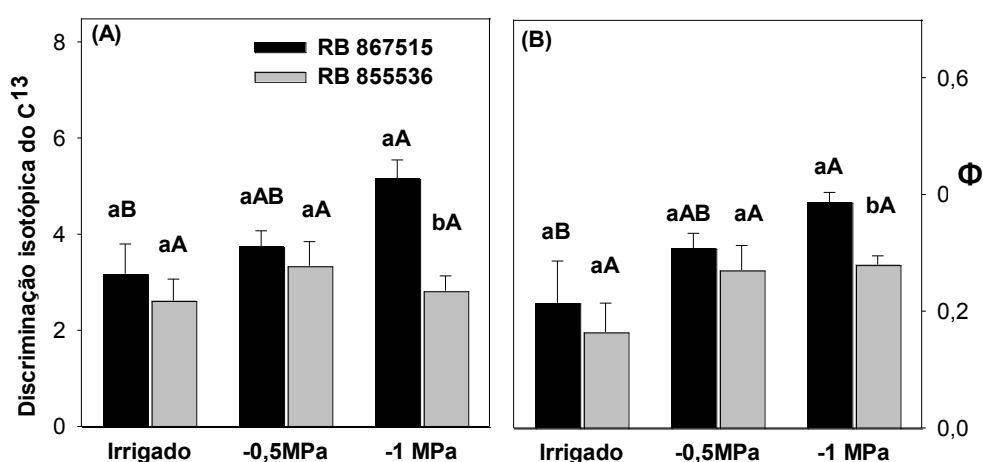


Figura 9- Discriminação isotópica de C^{13} ($\Delta\text{‰}$) (A) e fração de carbono fixado pela PEP-case, descarboxilado nas células da bainha e não fixado pela RuBisCO que retorna ao mesofilo foliar (Φ) (B) medidos em folhas de cana-de-açúcar das cultivares RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível). Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

Os resultados de discriminação isotópica de ^{13}C aumentaram com a imposição do déficit hídrico somente na cultivar tolerante e a -1MPa (Figura 9-A). Maior fração de carbono fixado pela PEP-case, descarboxilado nas células da bainha, não fixado pela RUBISCO e que retorna ao mesofilo foliar (Φ) foi observado na cultivar tolerante sob estresse hídrico severo e nestas condições, este parâmetro foi maior na cultivar tolerante (Figura 9-B).

4.5- Fluorescência da Clorofila a e teores de pigmentos

Analisando os parâmetros da fluorescência da clorofila a (Figura 10), a diminuição dos valores de Fv/Fm com a imposição do déficit hídrico mostra que houve

danos no aparato do fotossistema II e a cultivar tolerante é mais susceptível ao mesmos sob déficit hídrico severo (Figura 10-A).

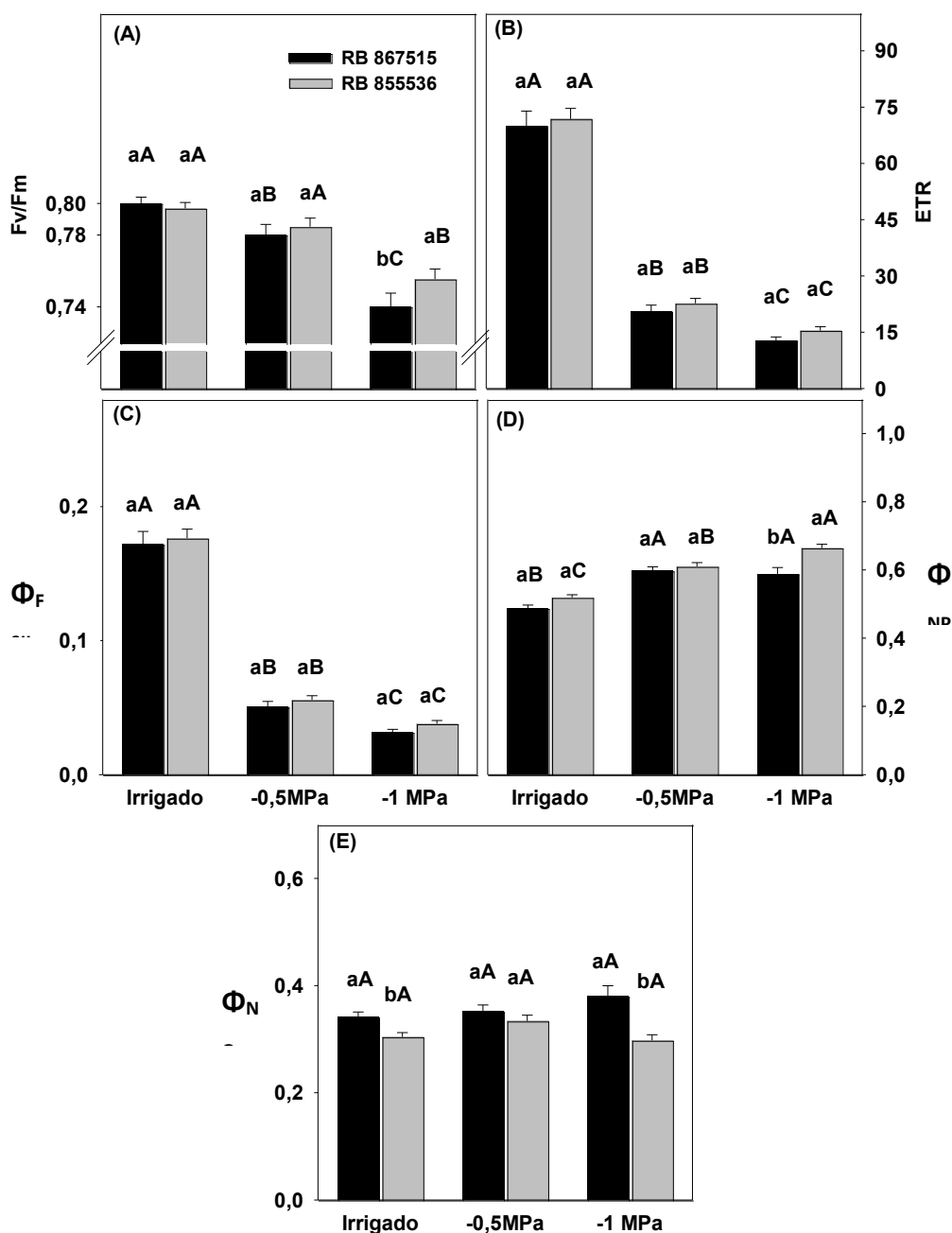


Figura 10. Parâmetros de Clorofila a das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. Rendimento quântico máximo potencial do FSII (F_v/F_m) (A), taxa de transporte de elétrons (ETR)(B), energia de excitação das clorofilas dissipadas como rendimento fotoquímico do FSII (Φ_{FSII})(C), rendimento não-fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas (Φ_{NPQ})(D) e outros mecanismos de dissipação energética (Φ_N)(E) em plantas de cana de açúcar submetidos a diferentes déficits hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas

Os resultados de rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) e taxa de transporte de elétrons (ETR) demonstraram uma diminuição com o aumento do estresse hídrico. No entanto, diferenças entre as cultivares não foram observadas (Figura 10-B e 10-C).

Quanto ao quenching não-fotoquímico (Φ_{NPQ} - dissipação de energia regulada) (Figura 10-D), ocorreu aumento com a imposição do estresse hídrico e de forma mais expressiva na cultivar sensível indicando uma maior eficiência na dissipação de energia via ciclo das xantofilas nessa cultivar. Entretanto, sob estresse hídrico severo, houve na cultivar tolerante maior contribuição de outros mecanismos de dissipação não fotoquímicos, Φ_{NO} (Figura 10-E).

O acúmulo de clorofila a (Figura 11-A), de clorofila b (Figura 11-B) e de clorofilas totais (Figura 11-E) apresentaram mesmo comportamento entre os genótipos, diminuindo de forma progressiva com a imposição dos déficits hídricos. O acúmulo de carotenóides (Figura 11-C) e a proporção clorofila a/b (Figura 11-F) também tiveram comportamento similar entre os genótipos sob estresse hídrico.

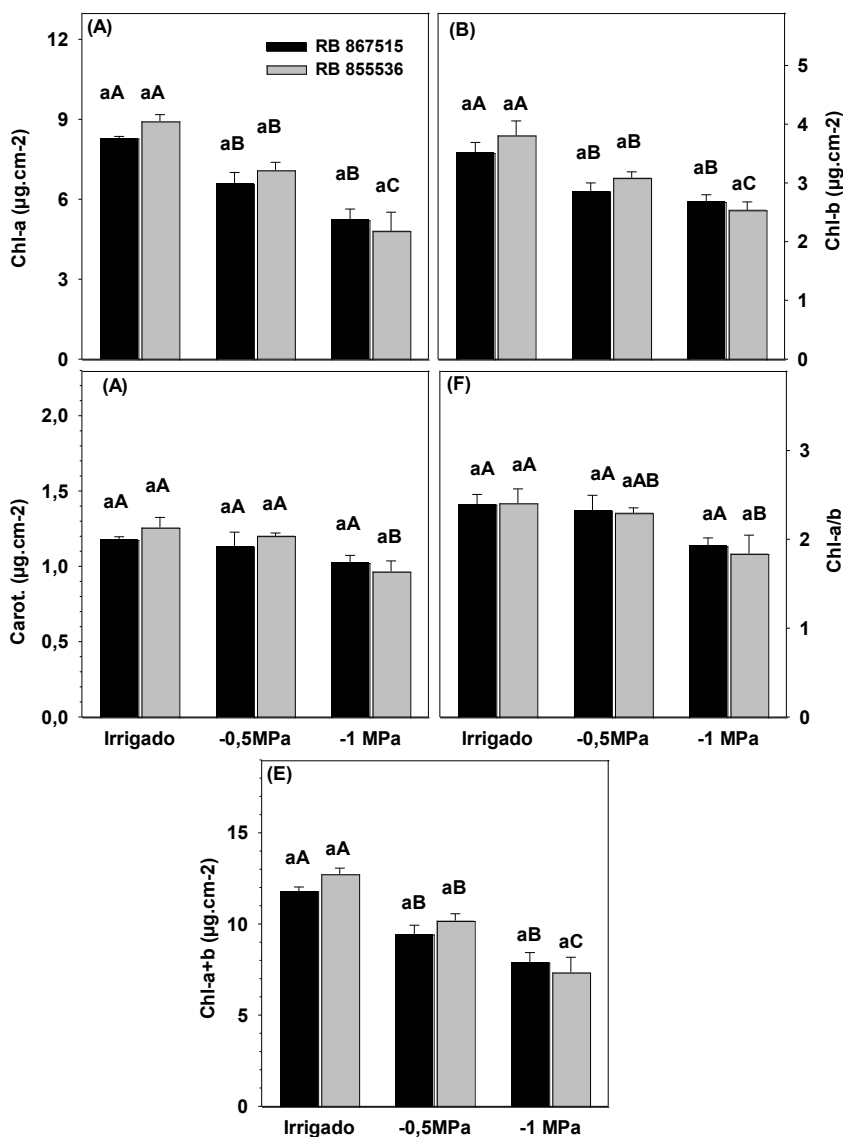


Figura 11. Teores de pigmentos foliar das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. Acúmulo de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenóides (C), acúmulo de clorofilas totais (E) e da razão clorofila a/clorofila b (F) de duas cultivares de cana de açúcar, submetidos a diferentes déficits hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas

4.6- Danos celulares

Os valores de aldeído malônico (Figura 12-A), principal produto secundário da oxidação lipídica, não variaram com o déficit hídrico e nem entre as cultivares. Já o extravasamento de eletrólitos (Figura 12-B) que reflete a integridade das membranas celulares sofreu aumento em ambas cultivares sob estresse moderado. O dano oxidativo em proteínas mensurados pela determinação de grupamento carbonil (carbonilação) (Figura 12-C) não sofreu alteração com a imposição do déficit, mas foi maior na cultivar tolerante tanto a -0,5MPa quanto a -1MPa.

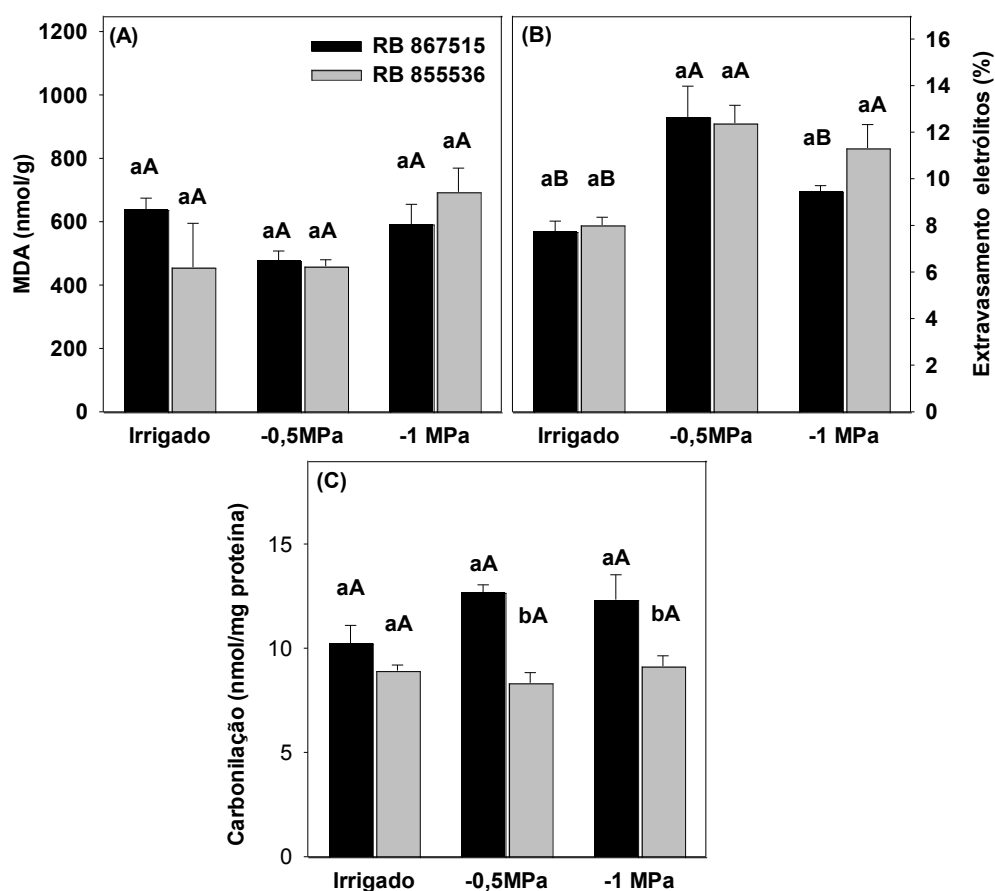


Figura 12. Aldeído Malônico (nmol por grama de tecido fresco) (A), extravasamento de eletrólitos (%) (B) e carbonilação de proteínas (nmol por mg de proteínas) (C) nas folhas das cultivares RB867515(Tolerante) e RB855536 (Sensível) de cana-de-açúcar, submetidos a diferentes déficits hídricos. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

Quanto aos resultados de atividade de enzimas antioxidantes, ocorreu aumento da peroxidase do ascorbato (APX) (Figura 13-A) somente na cultivar sensível sob estresse, mas não diferiram entre as cultivares sob ambos níveis de estresse. Já a enzima catalase (CAT) (Figura 13-B) não variou com a imposição do déficit hídrico, mas teve maior atividade na cultivar sensível na condição moderada. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 13-C) não sofreu alterações com a indisponibilidade hídrica em ambas cultivares.

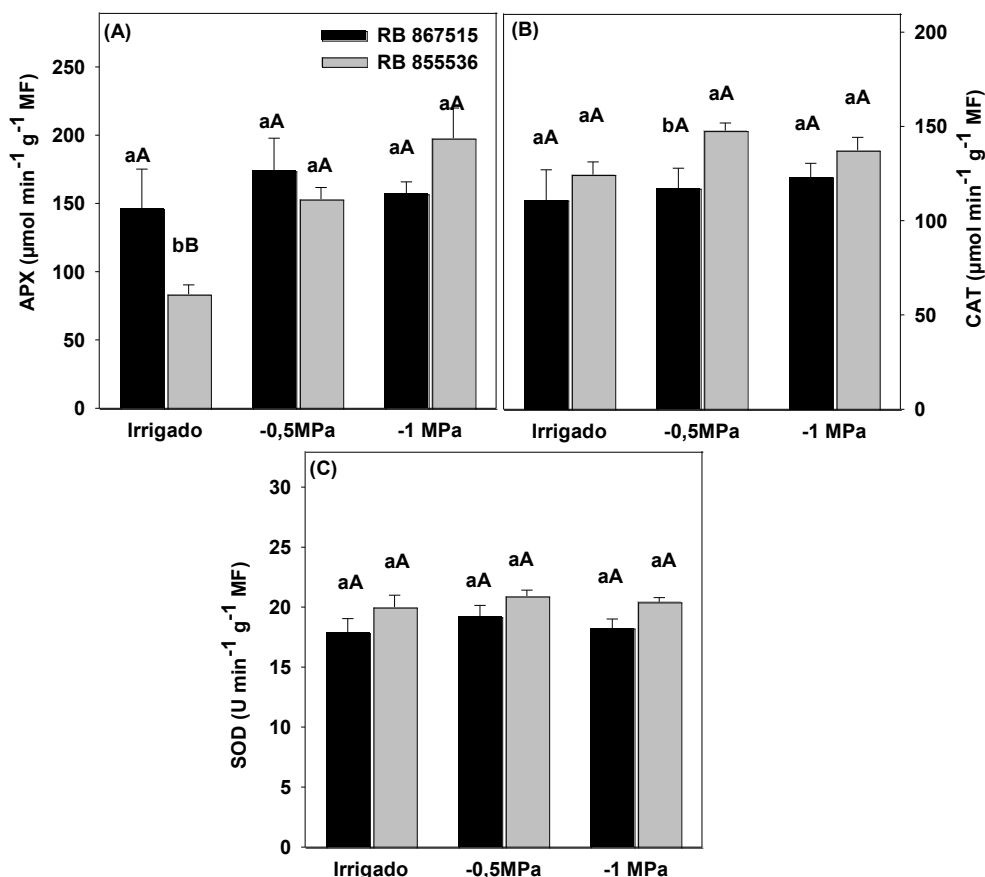


Figura 13– Atividade das enzimas antioxidantes APX (Peroxidase do ascorbato) (A), CAT (Catalase) (B) e Dismutase do superóxido (SOD) (C) por grama de massa fresca (MF) em folhas das cultivares de cana-de-açúcar RB 867515 (Tolerante) e RB 855536 (Sensível) sob diferentes déficits hídricos. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as disponibilidades hídricas.

4.7- Quantificação de Metabólitos (glicose, frutose, sacarose, malato, aminoácidos, proteínas e amido).

O teor de sacarose (Figura 14-A) e amido (Figura 14-D) foliar diminuíram progressivamente em ambas as cultivares e não diferiram entre essas com a imposição do déficit hídrico. Já o teor de glicose (Figura 14-B) e frutose (Figura 14-C) aumentaram nas cultivares e mais expressivamente na tolerante no estresse severo. Malato (Figura 14-G) também aumentou de forma semelhante e apresentou maiores níveis na cultivar tolerante em todos os regimes hídricos. O teor de proteínas (figura 14-G) não se alterou com o déficit. Em contraste, os níveis de aminoácidos (Figura 14-G) aumentaram e foram maior na cultivar tolerante no início da imposição do estresse (-0,5MPa).

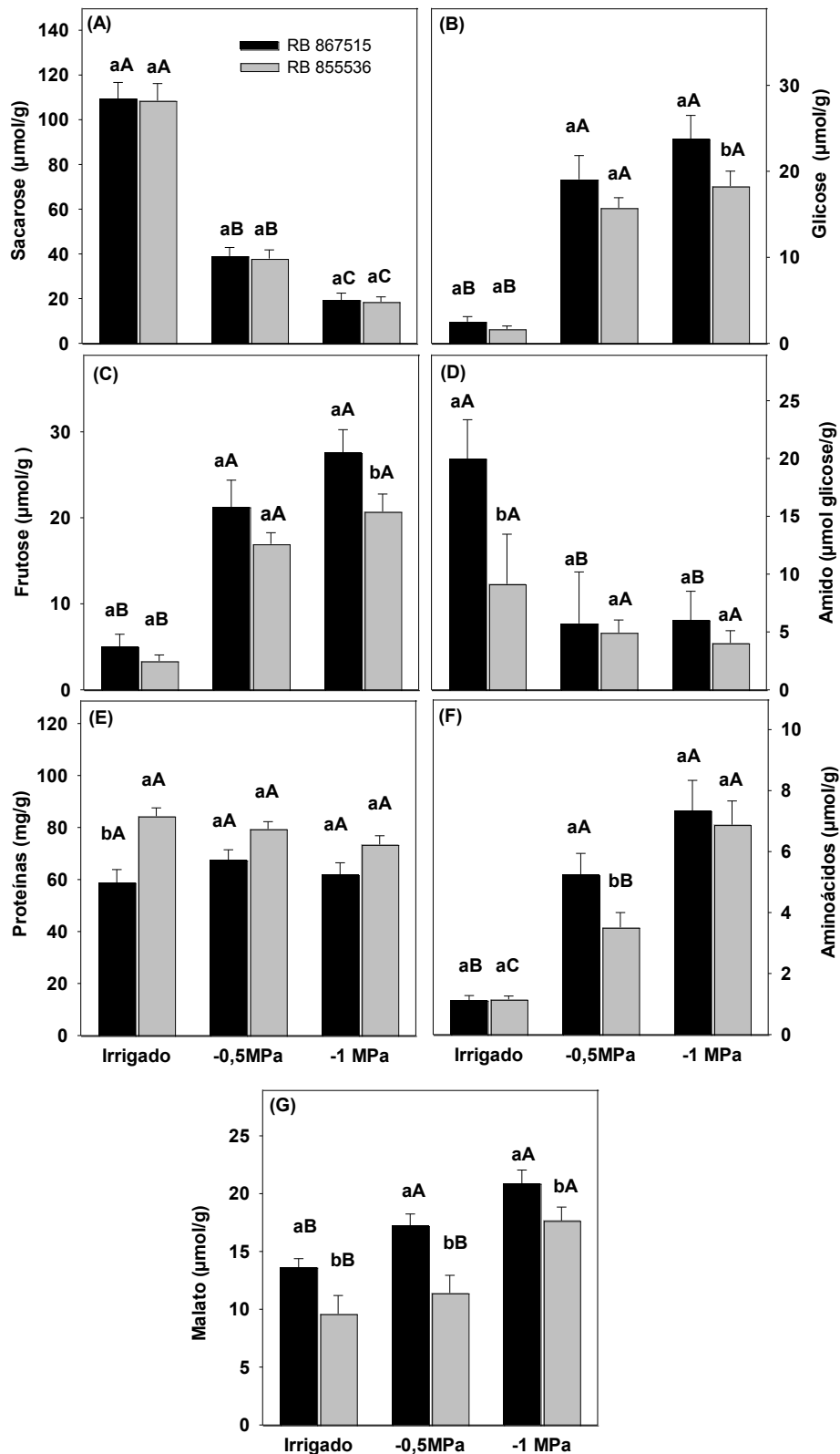


Figura 14. Valor médio e erro padrão dos teores de sacarose (A), glicose (B), frutose (C), amido (D), proteínas (E), aminoácidos (F) e malato (G) expressos em unidades por grama de tecido liofilizado nas duas cultivares de cana de açúcar, submetidas a diferentes déficits hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas.

4.8- Ácido Abscísico (ABA)

A concentração de ácido abscísico (ABA) (Figura 15) sofreu incremento de 10x vezes com a imposição do estresse moderado sem diferenças entre as duas cultivares. Entretanto, sob estresse severo, a cultivar tolerante manteve níveis mais altos de ABA.

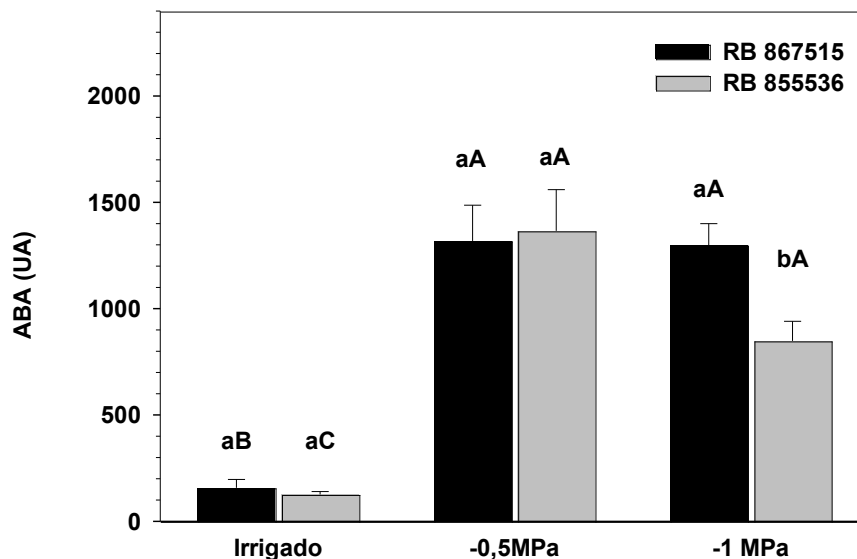


Figura 15. Concentração de Ácido Abscísico (UA-unidades arbitrárias) nas folhas das cultivares RB867515 e RB855536 de cana-de-açúcar submetidos a diferentes déficits hídricos. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas as diferentes disponibilidades hídricas

4.9- Proteoma Diferencial

4.9.1- Análise do proteoma diferencial em folhas das cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico moderado.

Na tabela 1 abaixo podemos ver que a proteína com maior aumento em sua abundância é UDP-açúcar pirofosforilase (3,6 vezes aumento sob estresse moderado), uma enzima envolvida na degradação da sacarose. Interessante foi que esta modificação se encaixa com os dados do metaboloma: houve uma redução do teor de sacarose neste nível de estresse e aumento nos teores de glicose sendo mais acentuado na cultivar tolerante sob estresse hídrico (Figura 14). Embora não tenhamos observado variação da abundância da enzima sintase da sacarose (Susy), maiores teores de frutose foram encontrados sob estresse. A diminuição dos níveis de amido (Figura 14) também corrobora com aumento da quantidade da enzima fosfoglucomutase que exerce uma função importante na degradação do mesmo.

Outro fato que emerge da tabela acima é o relativo maior número de proteínas relacionadas ao estresse, entre elas a chaperonina 60 e a chaperona da família DnaK. Proteínas deste grupo são importantes para a recuperação do estresse, identificando proteínas mal dobradas devidos a estresse, de forma a que as mesmas possam ser corretamente estruturadas após o dano oxidativo em sua estrutura. O aumento da redutase da glutatona, também correlaciona-se com o aumento no grau de peroxidação de lipídios e aumento do extravasamento de eletrólitos. Embora o nível de dano oxidativo tenha sido igual entre os genótipos, observamos que o aumento da quantidade desta proteína ocorre, neste nível de estresse, somente no genótipo tolerante. Notável também é o aumento no conteúdo de 3 proteínas do metabolismo dos aminoácidos, como a sintetase da glutamina (aumento de 2 vezes), aminotransferase da alanina (2,35 vezes) e da isomerase da metiltio-ribose-1P. Concordando com os dados de proteoma, observamos nos dados que houve um aumento nos níveis de aminoácidos totais (figura 14) neste nível de estresse.

Relacionado ao mecanismo fotossintético destaca-se o aumento da expressão da enzima málica relacionada a descarboxilação oxidativa de malato a piruvato na células da bainha do feixe vascular e a enzima desidrogenase do gliceraldeído-3P envolvida na fixação de carbono no ciclo de Calvin, ambas mais expressas as quais foram maiores na cultivar tolerante sob estresse moderado.

Tabela 1. Proteínas com aumento da abundância identificadas por MS em folhas de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico de -0,5MPa (estresse moderado).

Spot ID	Protein	Sublocation	Scaffold prob.	Exp. Level	T -0,5	S -0,5
Photosynthesis						
277	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast	100.0%	2,26	x	
470	Malic enzyme	chloroplast	98.7%	2,20	x	
496	Pyruvate phosphate dikinase 1	chloroplast	98.1%	1,60		x
Respiration						
561	Aconitate hydratase (Citrate hydro-lyase)	cytoplasmic mitochondrial	97.8%	1,60	x	
490	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	al	100.0%	1,79		x
Antioxidative Metabolism						
406	Glutathione reductase	cytoplasmic	100.0%	1,88	x	
Nucleic Acid Metabolism						
486	CTP synthase	cytoplasmic chloroplast	95.0%	1,63	x	
486	CTP synthase	cytoplasmic chloroplast	95.0%	2,15		x
Sugar Metabolism						
494	Phosphoglucomutase	chloroplast	100.0%	1,97	x	
494	Phosphoglucomutase	chloroplast	100.0%	2,44		x
617	UDP-sugar pyrophosphorylase	cytoplasmic	95.0%	3,63	x	
Metabolism of Amino Acids						
289	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,65	x	
271	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)	chloroplast mitochondrial	99.8%	1,98		x
779	Alanine aminotransferase 2	chloroplast	100.0%	2,35		x
Induced Stress Proteins						
515	DnaK family protein	cytoplasmic chloroplast	100.0%	1,90	x	
515	DnaK family protein	cytoplasmic chloroplast	100.0%	1,71		x
506	DnaK family protein	cytoplasmic chloroplast	100.0%	1,54		x
435	Chaperonin 60 beta (RuBisCo subunit binding-protein beta subunit)	chloroplast	100.0%	1,59		x
17	Salt stress-induced protein (Protein lectin-like)	cytoplasmic	100.0%	1,87	x	
507	70 kDa peptidylprolyl isomerase	cytoplasmic nuclear	99.8%	2,05		x
Other Mechanisms						
577	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (Ras-related nuclear protein 3)	nuclear	99.8%	3,56		x
547	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic	100.0%	1,97		x
672	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	chloroplast	95.0%	1,86		x
178	Plastid-lipid-associated protein 2 (Fibrillin-like protein 2)	chloroplast	100.0%	1,71	x	
773	cysteine proteinase	ER	100.0%	2,11		x
Unknown						
479	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	1,81	x	
716	Os04g0459500 protein	chloroplast	95.0%	1,81	x	
480	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	1,80	x	
758	Os09g0512900 protein	cytoplasmic plasma	100.0%	1,56	x	

Exp. Level – Expression level; Scaffold- Protein identification probability, T- Tolerant e S- sensitive

Na análise topológica criada pelo programa Cytoscape é explorada as relações regulatórias entre genes, complexos proteicos e rotas biológicas, utilizando a ontologia gênica e algoritmos que detectam o enriquecimento da expressão de genes ou proteínas.

Para isto utiliza a integração, visualização e uma modelação estatística de redes moleculares. As rotas metabólicas, onde foram identificadas maior enriquecimento da expressão das proteínas que pertencem a mesma, é representada como círculos, cujo tamanho indica o grau de enriquecimento. Adicionalmente, o negrito é utilizado para salientar quais rotas metabólicas que mais se destacaram nessa expressão proteica diferenciada. Utilizando esta metodologia, observamos que em resposta ao déficit hídrico moderado, as cultivares induziram a expressão de proteínas relacionadas a processos biológicos como fixação de carbono, respiração, metabolismo de aminoácidos, metabolismo antioxidativo, entre outros, mostrados com diferentes cores na figura 16. Além do mais, estes processos foram preferencialmente induzidos em uma ou compartilhados entre as mesmas (Figura 16- A).

Os processos biológicos mais enriquecidos em resposta ao estresse hídrico moderado foram fixação de carbono em organismos fotossintéticos e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), sendo que este último ocorreu de forma enriquecida na cultivar sensível.

Proteínas relacionadas aos processos metabolismo de glutatona, metabolismo de fenilalanina e metabolismo de metionina e cisteína (vermelho escuro-Figura 16- B) foram expressas preferencialmente na cultivar tolerante. Já a cultivar sensível induziu proteínas relacionadas aos processos catabólicos como degradação de RNA e processos catabólicos dependentes de ubiquitina como indicado pela cor azul escuro (Figura 16- B). Adicionalmente nessa cultivar houve aumento no metabolismo de arginina e prolina e no ciclo do citrato, o que poderia indicar uma demanda maior de um ajuste osmótico. Também maior foi a alteração na cultivar sensível da biogênese de ribossomos em eucariotos e biossíntese de estruturas terpenoides. (azul escuro-Figura 16-B). Os processos fixação de carbono em organismos fotossintéticos e metabolismo de amino-açúcares e nucleotídeos-açúcares foram induzidos de forma semelhante em ambas cultivares, porém, em maior proporção na cultivar tolerante, como indicado pela presença da cor vermelha (vermelho claro- Figura 15-B). As proteínas dos processos biológicos mais enriquecidos em cada grupo são mostradas na tabela 1 (material suplementar).

Em suma, os dados sugerem que sob estresse moderado a cultivar tolerante induz a expressão de proteínas do mecanismo antioxidativo não enzimático, enquanto que os dados da cultivar sensível sugerem dados indicadores de estresse. Entretanto, como o teor de aminoácidos totais aumentou mais na cultivar tolerante, os dados

sugerem que a maior desidratação da cultivar sensível sob estresse severo pode ser devida ao menor ajuste osmótico na folha.

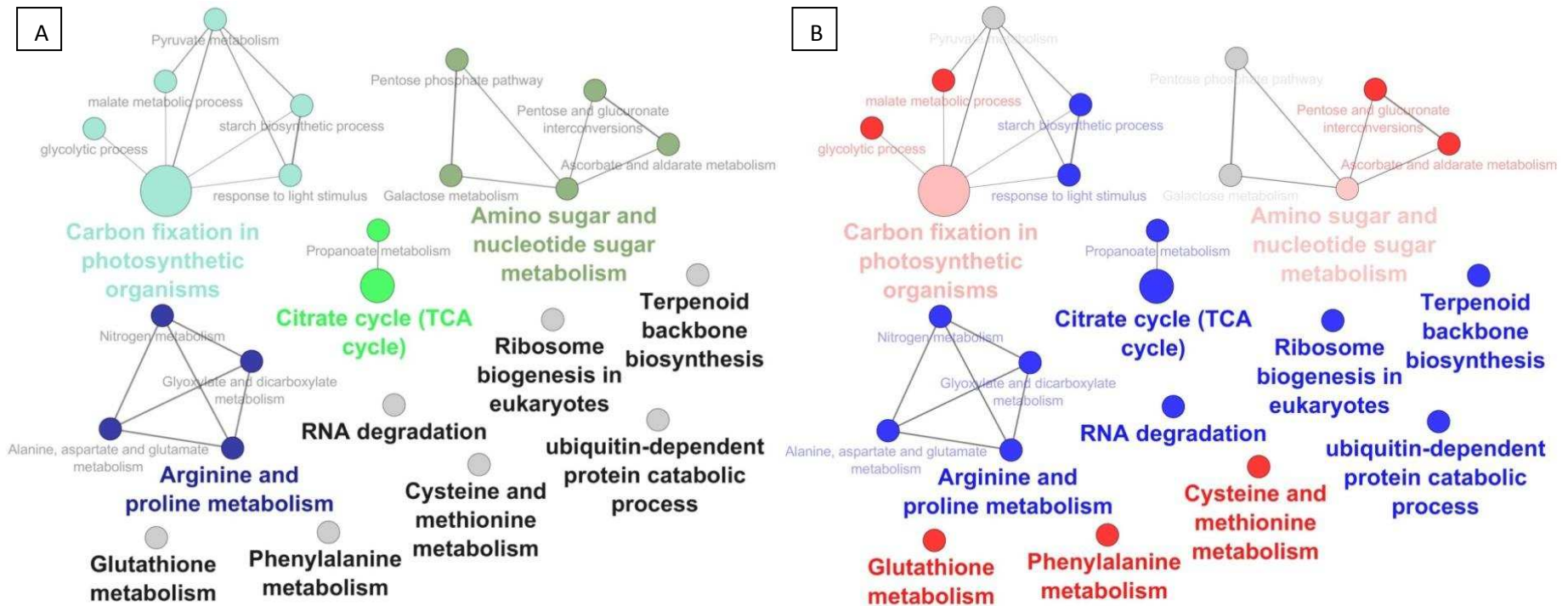


Figura 16 – Proteoma diferencial - Processos biológicos com proteínas que tiveram aumento significativo em abundância nas cultivares RB 867515 (tolerante) e RB 855536 (sensível) sob condição de estresse moderado (-0,5MPa). **A** – Resultado da análise feita no Cytoscape-ClueGO mostrando os grupos e os respectivos processos biológicos mais enriquecidos indicados pelo tamanho dos círculos. Em negrito, é mostrado o processo mais enriquecido de cada grupo. As cores se referem aos agrupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicados via conexão por linhas. Os círculos em cinza se referem aos processos não agrupados. **B** – Discriminação dos processos biológicos entre cultivares. Em vermelho, processos com proteínas que aumentaram o conteúdo exclusivamente na cultivar tolerante e em azul, na cultivar sensível. Cores menos intensas (vermelho claro, por exemplo) indicam maior número de proteínas ligadas a determinado processo e a determinada cultivar. Em cinza, os processos biológicos não específicos (comuns as duas cultivares)

4.9.2- Análise do proteoma diferencial de folhas das cultivares de cana-de-açúcar sob estresse severo.

Em resposta ao déficit hídrico mais severo é possível notar pela tabela 2 que vários proteínas ligados a fotossíntese aumentaram a expressão principalmente na cultivar tolerante. Dentre essas, destaca-se a enzima piruvato fosfato dicinase responsável pela renovação de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de piruvato oriundo da descarboxilação do malato nas células da bainha do feixe e as enzimas aldolase da frutose bisfosfato e a isomerase da triosefosfato pertencentes ao ciclo de Calvin.

No entanto, as enzimas ribulose bisfosfato carboxilase (RUBISCO) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP carboxilase) relacionadas com carboxilação aumentaram em ambas cultivares.

Relativo ao processo de respiração, foram identificadas as enzimas aldolase da frutose-bisfosfato, isomerase do trifosfato, desidrogenase do gliceraldeído 3-P, mutase do fosfoglicerato e enolase pertencentes a via glicolítica. Além dessas, ocorreu também aumento das enzimas hidratase do aconitato, desidrogenase do isocitrato do ciclo de Krebs e as enzimas desidrogenase do NADH (complexo I) e desidrogenase do succinato (Complexo II) pertencentes a cadeia de transportadora de elétrons.

Como no estresse moderado, é possível observar que o mecanismo antioxidativo também se mostrou presente na condição mais severa na cultivar tolerante. Além da redutase da glutaciona, houve a expressão das enzimas peroxidases do ascorbato (APX1, APX 2) diretamente envolvidas no Ciclo Glutaciona-Ascorbato de remoção de oxidantes celulares. Entretanto, o aumento dos níveis de APX não refletiu em maior atividade encontrada para essa enzima (figura13), o que sugere a necessidade de estudar a atividade desta enzima em géis de atividade, de forma a detectar possíveis diferenças entre a tolerante e a sensível em diferentes compartimentos celulares onde ela esta presente. Um tipo de tiorredoxina (nucleoredoxina) que são pequenas proteínas antioxidantes também foi induzida. Outra proteína induzida foi a peroxiredoxina (2-Cys), uma enzima com atividade antioxidante capaz de reduzir peróxido de hidrogênio e usar em seguida diversos doadores de elétrons como a própria glutaciona, o ascorbato e tiorredoxina para regenera-se (Dietz , 2011) .

Concordando com os resultados de metabólitos relativos ao incremento de glicose sob estresse hídrico severo foi a expressão da enzima Frutocinase 1 relacionada a degradação de sacarose. De maneira similar ao ocorrido no estresse moderado

ocorreu indução de proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e de proteínas ligadas ao estresse, entre elas a chaperona da família Dnak .

Tabela 2. Proteínas com aumento da abundância identificadas por MS em folhas de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico de -1MPa (estresse severo).

Spot ID	Protein	Sublocation	Scaffold probability	Expression Level	T ₁ -1	T ₂ -1
Photosynthesis						
44	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	cytoplasmic chloroplast	99.8%	1,61		x
47	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	chloroplast	99.7%	1,32	x	
54	Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxilase)	cytoplasmic	99.8%	1,79	x	
54	Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxilase)	cytoplasmic	99.8%	2,13		x
81	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast	100.0%	1,51	x	
224	Fructose-biphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,79	x	
363	Pyruvate phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast	98.5%	1,61	x	
364	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	cytoplasmic chloroplast	99.8%	2,24	x	
419	Triosephosphate isomerase	chloroplast	95.0%	1,79	x	
463	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast	99.8%	2,49	x	
477	Pyruvate, phosphate dikinase 1(PPDKB)	chloroplast	100.0%	1,62	x	
548	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast	99.8%	1,99	x	
660	Chlorophyll a/b-binding protein 3C	chloroplast	95.0%	1,63		x
Respiration						
22	Dehydrogenase E1 component subunit alpha-2 (PDHE1-A)	mitochondrial	100.0%	1,80	x	
96	Triosephosphate isomerase (TIM)	cytoplasmic	100.0%	1,58	x	
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic	95.0%	1,57	x	
276	Fructose-biphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial	100.0%	1,52	x	
296	Fructose-biphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial	100.0%	1,53	x	
324	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	cytoplasmic	99.8%	1,89	x	
331	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	cytoplasmic	99.8%	1,66	x	
391	NADH dehydrogenase	mitochondrial	100.0%	1,83	x	
391	NADH dehydrogenase	mitochondrial	100.0%	1,66		x
473	Phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	95.0%	1,62	x	
473	Phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	95.0%	1,81		x
559	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast	99.5%	1,63	x	
561	Aconitate hydratase	cytoplasmic	97.8%	1,89	x	
717	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	cytoplasmic	99.8%	2,19	x	
717	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	cytoplasmic	99.8%	2,01		x
777	Enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	mitochondrial chloroplast	100.0%	3,18	x	
781	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic	100.0%	2,37	x	
781	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic	100.0%	1,83		x
487	Phosphoglucomutase	chloroplast	99.8%	2,60		x
490	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	mitochondrial	100.0%	1,80		x
558	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,64		x
564	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,95		x
680	Fructose-biphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial	100.0%	2,62		x
Antioxidative metabolism						
55	L-ascorbate peroxidase 4 (APx04)	plasma	100.0%	2,35	x	
61	2-Cys peroxiredoxin BAS1 (Thiol-specific antioxidant protein)	chloroplast	99.8%	1,94	x	
77	Glutathione transferase III(B))	cytoplasmic	100.0%	1,55	x	
100	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic	100.0%	1,74	x	
102	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic	100.0%	1,59	x	
108	L-ascorbate peroxidase 2 (APx02)	cytoplasmic	100.0%	1,86	x	
109	L-ascorbate peroxidase 2 (APx02)	cytoplasmic	100.0%	1,73	x	
322	Monodehydroascorbate reductase	chloroplast proxisomal	99.7%	1,95	x	
353	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast	95.0%	1,60	x	
399	Glutathione reductase, cytosolic (GR) (GRase)	cytoplasmic	100.0%	1,95	x	
673	L-ascorbate peroxidase 4 (APx04)	plasma	98.6%	1,99	x	
481	Nucleoredoxin 1-1 (Nrx1-1)	cytoplasmic	99.8%	2,16	x	
484	Nucleoredoxin 1-1 (Nrx1-1)	cytoplasmic	100.0%	2,03	x	
484	Nucleoredoxin 1-1 (Nrx1-1)	cytoplasmic	100.0%	1,90		x
656	Peroxiredoxin-2F (Peroxiredoxin IIF) (Thioredoxin reductase 2F)	mitochondrial	95.0%	1,76	x	
Nucleic Acid Metabolism						
82	Adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic	100.0%	1,52	x	
486	CTP synthase	cytoplasmic chloroplast	95.0%	1,88		
757	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal	99.8%	1,83	x	
10	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic	100.0%	1,52	x	
Sugar Metabolism						

139	Cytochrome b5 reductase	mitochondrial	100.0%	2,33	x	
230	Fructokinase-1 (Fructokinase I) (FKI)	cytoplasmic plasma	100.0%	1,87	x	
497	Phosphoglucomutase	chloroplast	99.8%	2,12		x
669	Chitinase 12 (Basic endochitinase 2)	vacuolar	95.0%	2,90	x	x
770	Beta-1,3-glucanase	extracellular	95.0%	1,91	x	
677	Plastid-lipid-associated protein 2, (Fibrillin-like protein 2)	chloroplast	99.8%	1,63		x
Metabolism of Amino Acids						
289	Methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi)	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,73	x	
292	Phosphoserine aminotransferase	chloroplast	99.9%	1,50	x	
294	Aspartate aminotransferase	chloroplast	99.8%	2,03	x	
374	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial	100.0%	1,84	x	
406	Adenosylhomocysteinase	chloroplast	99.8%	3,85	x	
406	Adenosylhomocysteinase	chloroplast	99.8%	1,62		x
408	Adenosylhomocysteinase	chloroplast	100.0%	1,51	x	
644	Aminomethyltransferase	mitochondrial	95.0%	1,65	x	
683	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic	100.0%	2,47	x	
683	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic	100.0%	3,80		x
778	Alanine aminotransferase	chloroplast proxisomal	100.0%	2,15	x	
778	Alanine aminotransferase	chloroplast proxisomal	100.0%	1,84		x
779	Alanine aminotransferase 2	mitochondrial chloroplast	100.0%	1,76	x	
779	Alanine aminotransferase 2	mitochondrial chloroplast	100.0%	3,45		x
Induced Stress Proteins						
505	DnaK family protein, putative, expressed	cytoplasmic chloroplast	99.0%	2,25	x	
508	DnaK family protein, putative, expressed	cytoplasmic chloroplast	95.0%	2,14	x	
506	DnaK family protein, putative, expressed	cytoplasmic chloroplast	100.0%	1,70		x
515	DnaK family protein, putative, expressed	cytoplasmic chloroplast	100.0%	2,18	x	x
762	Salt stress-induced protein (Salt protein) (Protein lectin-like)	cytoplasmic	100.0%	2,72	x	
762	Salt stress-induced protein (Salt protein) (Protein lectin-like)	cytoplasmic	100.0%	2,32		x
17	Salt stress-induced protein (Salt protein) (Protein lectin-like)	cytoplasmic	100.0%	2,12	x	
17	Salt stress-induced protein (Salt protein) (Protein lectin-like)	cytoplasmic	100.0%	3,44		x
615	66 kDa stress protein	cytoplasmic	99.8%	1,59	x	
753	Stress-induced protein sti1	cytoplasmic nuclear	95.0%	4,25	x	
Other Mechanisms						
130	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (OsRan3)	nuclear	100.0%	1,54	x	
143	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (OsRan3)	nuclear	99.0%	1,87	x	
199	Lactoylglutathione lyase (Aldoketomutase)	cytoplasmic	99.6%	1,77	x	
211	Nucleoid DNA-binding protein cnd41	extracellular plasma	95.0%	1,61	x	
227	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein)	chloroplast	99.8%	1,75	x	
240	NADPH oxidoreductase	cytoplasmic	100.0%	1,86	x	
256	Flavone 3'-O-methyltransferase 1 (OMT1)	cytoplasmic	95.0%	1,81	x	
554	Cytosolic factor-like protein	cytoplasmic nuclear	95.0%	1,61	x	
577	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (OsRan3)	nuclear	99.8%	2,96	x	
577	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (OsRan3)	nuclear	99.8%	4,07		x
624	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	extracellular	100.0%	4,30	x	
672	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	chloroplast	95.0%	3,17	x	
672	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	chloroplast	95.0%	3,83		x
745	Leukotriene A-4 hydrolase	cytoplasmic	99.7%	1,63	x	
745	Family M1 containing protein	cytoplasmic	99.7%	1,52		x
769	Elongation factor Tu	chloroplast	100.0%	2,26	x	
780	Prolyl carboxypeptidase like protein	plasma	99.8%	2,25	x	
182	Plastid-lipid-associated protein 2, (Fibrillin-like protein 2)	chloroplast	100.0%	1,57		x
368	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	cytoplasmic nuclear	99.8%	1,54		x
584	Plastid-lipid-associated protein 2 (Fibrillin-like protein 2)	chloroplast	95.0%	1,57		x
547	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic	100.0%	1,76		x
574	Zinc metalloproteinase-like	mitochondrial chloroplast	99.1%	2,00		x
653	Ferredoxin sulfite reductase	chloroplast	99.7%	1,96		x
666	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar	100.0%	1,51		x
669	Chitinase 12 (Basic endochitinase 2)	vacuolar	95.0%	3,02	x	x
773	Cysteine proteinase	ER	100.0%	2,75		x
36	Peroxioredoxin-2E-1, (Peroxioredoxin IIE-1) (Thioredoxin reductase 2E-1)	chloroplast	100.0%	1,54	x	
45	Germin-like protein 8-14 (Germin-like protein 1)	extracellular	100.0%	1,52	x	
70	Chitinase III-like protein	cytoplasmic	99.8%	1,88	x	
178	Plastid-lipid-associated protein 2 (Fibrillin-like protein 2)	chloroplast	100.0%	2,20	x	
23	Homeodomain transcription factor	cytoplasmic chloroplast	99.2%	1,74		x
337	GDA1/CD39 family protein	golgi	95.0%	1,72	x	
Unknown						
28	Os05g0157200 protein	cytoplasmic	99.0%	2,55	x	
30	CBS domain containing protein	cytoplasmic chloroplast	100.0%	1,68	x	
135	Os07g0608900 protein	chloroplast	99.8%	1,50	x	
147	Os07g0196200 protein	chloroplast	100.0%	1,68	x	

180	Os02g0187100 protein	extracellular ER	100.0%	1,60	x	
266	Os04g0518000 protein	cytoplasmic	100.0%	1,58	x	
479	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	2,23	x	
480	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	2,17	x	
480	Os01g0793300 protein	extracellular	98.9%	1,82		x
493	Os02g0195500 protein	extracellular plasma	100.0%	1,67	x	
704	Os01g0793300 protein	extracellular	99.8%	4,58	x	
704	Os01g0793300 protein	extracellular	99.8%	2,70		x
380	Os04g0111200 protein	chloroplast	100.0%	2,26		x
460	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	1,69		x
504	Os04g0504800 protein	cytoplasmic	100.0%	3,91		x
611	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0%	1,60		x
648	Os09g0446800 protein	chloroplast	95.0%	2,39		x
758	Os09g0512900 protein	cytoplasmic plasma	100.0%	1,73		x
759	OSJNBa0036B21.24 protein	chloroplast	99.8%	1,82	x	
397	Os09g0375000 protein	mitochondrial	100.0%	1,85	x	
153	Os12g0169700 protein	cytoplasmic mitochondrial	100.0%	1,82	x	

Exp. Level – Expression level; Scaffold- Protein identification probability, T- Tolerant e S- Sensitive

Os resultados da análise do Cytoscape mostram que os processos biológicos relacionados com proteínas induzidas em condição de estresse severo (-1MPa) estão ligados a múltiplas funções, como também observado sob estresse moderado (Figura 17). Em comum com o estresse moderado, o grupo de proteínas envolvidas com fotossíntese (Fixação de Carbono em organismos fotossintéticos) e o ciclo do citrato (respiração) foram processos induzidos sob estresse. Em contraste, relacionado a respiração observa-se sob estresse severo aumento da expressão de proteínas da glicólise/ gliconeogênese preferencialmente na cultivar tolerante. Também em comum com estresse moderado é a indução do metabolismo da glutathione (preferencialmente na cultivar tolerante), terpenóides e do catabolismo das proteínas (ubiquitina). Entretanto, a indução do metabolismo da glutathione é maior sob estresse severo em ambas as cultivares. Observamos que sob estresse severo, nas cultivares já não observamos a indução de proteínas induzidas ao metabolismo de aminoácidos como arginina/prolina e cisteína/metionina, mas sim da indução do metabolismo de aminoácidos como glicina, serina e treonina, indicando que embora ocorra indução do metabolismo de aminoácidos, um provável mecanismo de ajuste osmótico, diferentes aminoácidos estariam envolvidos nesta resposta quando ocorrem diferentes níveis de estresse. Outros grupos de proteínas cuja indução foi observada sob estresse hídrico severo incluem, Via da pentose-fosfato, metabolismo de compostos organonitrogenados (adenine phosphoribosyl transferase, nucleoside diphosphate kinase, serine hydroxymethyltransferase), compostos orgânicos (1C) derivados folato (aminomethyltransferase, formate--tetrahydrofolate ligase) e metabolismo de pequenas moléculas (aspartate aminotransferase, nucleoside diphosphate kinase, adenine

phosphoribosyl transferase) (ver tabela 2 material suplementar para detalhes de proteínas de cada processo biológico).

Embora várias destas modificações nas proteínas sejam comuns em ambas cultivares, observamos que a maioria delas foi mais induzida na cultivar tolerante do que na sensível, como é o caso do metabolismo de fixação de carbono, respiração (glicólise/gliconeogênese), metabolismo da glutatona, ciclo das pentoses e metabolismo de glicina, serina e treonina (Figura 18).

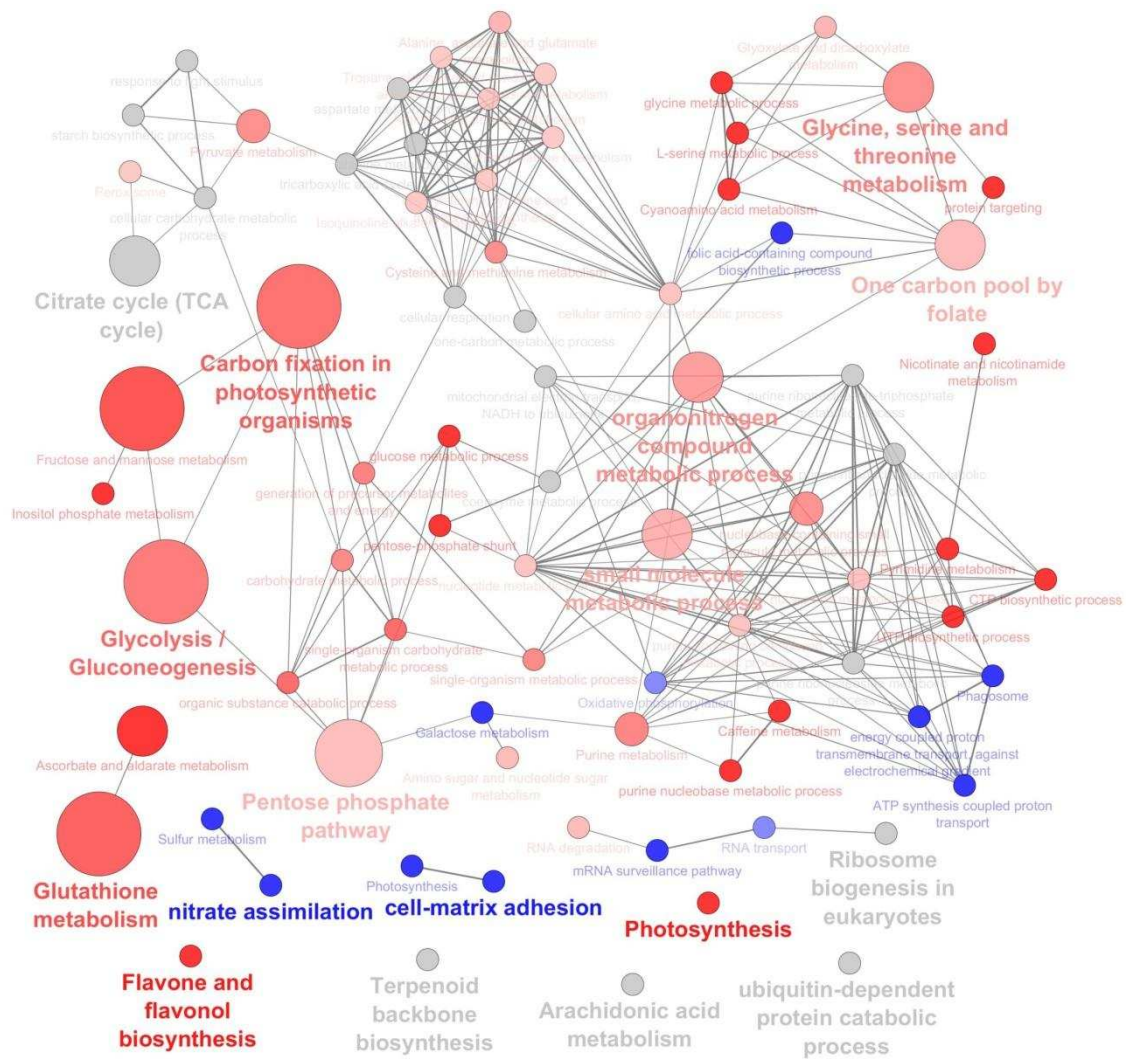


Figura 18 – Proteoma diferencial. Discriminação dos processos biológicos entre cultivares sob estresse severo. Em vermelho, processos com proteínas que aumentaram o conteúdo exclusivamente na cultivar tolerante e em azul, na cultivar sensível. Cores menos intensas (vermelho claro, por exemplo) indicam maior número de proteínas ligadas a determinado processo e a determinada cultivar. Em cinza, os processos biológicos não específicos (comuns as duas cultivares).

4.10- Fosfoproteoma

4.10.1-Análise do fosfoproteoma em folhas das cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico moderado.

A fosforilação participa de muitos processos celulares e é o processo de modificação pós-traducional mais estudado atualmente. A fosfoproteômica objetiva a caracterização das fosfoproteínas na célula ou tecido em um dado momento. No trabalho em questão foi usada a técnica de eletroforese bidimensional atrelada a espectrometria de massas para separação e identificação de proteínas.

Em condição de estresse moderado ocorreu aumento do conteúdo de proteínas fosforiladas em variados processos metabólicos (tabela 3). No entanto, convém ressaltar que o aumento da fosforilação de determinadas proteínas identificadas pode ser devido ao aumento em abundância das mesmas.

A análise realizada no banco de dados P₃DB mostrou que todas neste nível de estresse já foram previamente catalogadas pela presença sítios de fosforilação em suas estruturas baseadas em resultados experimentais. Isto mostra a confiabilidade da técnica de coloração com Pro-Q Diamond realizada neste trabalho.

As proteínas identificadas são de grande importância para o esclarecimento dos vários processos celulares regulados por esse tipo de modificação pós-traducional sob estresse hídrico, pois elenca possíveis alvos de proteínas cinases reguladoras. No mecanismo fotossintético, destacou-se na cultivar tolerante o aumento da fosforilação das proteínas transcetolase, isomerase da triosefosfato e cinase do fosfoglicerato, todas pertencentes ao ciclo de Calvin. Também houve aumento da enzima málica e da cinase do piruvato-P. A enzima descarboxilase do uroporfirinogênio 2, uma enzima relacionada com a síntese de clorofilas aumentou em ambas cultivares, embora o teor de clorofila a e b tenha diminuído com o estresse.

Na respiração podemos destacar a cinase do fosfoglicerato e a hidratase do aconitato. As enzimas peroxidase do ascorbato, a redutoisomerase de ceto-acidos e a transferase da adenilil-glicose-1-fosfato foram as únicas identificadas ligadas respectivamente ao metabolismo antioxidativo, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de açúcares.

Convém salientar que as proteínas como a isomerase da triosefosfato, a cinase do fosfoglicerato (cloroplastídica e mitocondrial), a transcetolase, a APX7, a transferase do adenil-glicose-1P, a redutoisomerase de ceto-ácidos entre outras proteínas (tabela 3)

que não tiveram variação em abundância, mas aumentaram o grau de fosforilação são possíveis alvos de cinases.

Tabela 3. Proteínas com aumento da fosforilação identificadas por proteínas por MS em folhas de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico de -0,5MPa (estresse moderado).

Spot ID	Protein	Sublocation	Ref.	Scaffold prob.	Exp. Level	T	S
Photosynthesis							
27	Triosephosphate isomerase	chloroplast	2	95.0%	1,76	x	
50	Pyruvate phosphate dikinase 1(PPDKB)	chloroplast	1	98.2% #	1,76	x	
50	Pyruvate phosphate dikinase 1(PPDKB)	chloroplast	1	98.2% #	1,68		x
131	Uroporphyrinogen decarboxylase 2 (UPD2)	chloroplast	5	100.0%	1,88	x	
131	Uroporphyrinogen decarboxylase 2 (UPD2)	chloroplast	5	100.0%	1,66		x
389	Phosphoglycerate kinase	chloroplast	1	100.0%	1,71	x	
256	Malic enzyme	chloroplast	3	99.8% #	1,67	x	
273	Transketolase	chloroplast	4	100.0%	2,35	x	
198	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2)	chloroplast	4	100.0%	1,53		x
Respiration							
173	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial	1	100.0%	1,52	x	
315	Aconitate hydratase	chloroplast	4	100.0% #	2,17	x	
		mitochondrial					
Antioxidative Metabolism							
55	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1	100.0%	2,74		x
Sugar Metabolism							
192	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	chloroplast	5	99.8%	1,82		x
275	Phosphoglucomutase	chloroplast	1	100.0% #	2,28	x	
275	Phosphoglucomutase	chloroplast	1	100.0% #	2,07		x
277	Phosphoglucomutase	chloroplast	1	100.0% #	2,23	x	
277	Phosphoglucomutase	chloroplast	1	100.0% #	2,02		x
Metabolism of Amino Acids							
243	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5	95.0%	1,65	x	
Induced Stress Proteins							
48	Stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1	99.8%	1,87	x	
48	Stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1	99.8%	1,70		x
Other Mechanisms							
75	Phosphatase 2C 59 (PP2C59)	chloroplast	1	100.0%	1,60	x	
164	Ankyrin repeat domain protein 2	chloroplast	1	95.0%	2,41	x	
304	Cytosolic factor-like protein	cytoplasmic	1	99.5%	1,64	x	
		nuclear					
362	Translation initiation factor 5A	cytoplasmic	7	99.8%	2,72	x	
20	Peptide methionine sulfoxide reductase A2-1 (MSRA2.1)	cytoplasmic	1	100.0%	1,82		x
240	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic	5	99.7% #	1,97		x
		nuclear					
Unknow							
6	Os05g0157200 protein	cytoplasmic	1	100.0%	5,76	x	
97	Os04g0531900 protein	cytoplasmic	3	99.8%	1,80	x	
		chloroplast					

Exp. Level – Expression level; Scaffold- Protein identification probability, T- Tolerant e S- sensitive
 Ref. Referencias de confirmação de sítios de fosforilação encontrados nas proteínas identificadas (1, Nakagami et al., 2010; 2, Sugiyama et al., 2008; 3, Engelsberger et al., 2012; 4, Reiland et al., 2009; 5, Rose et al., 2012).
 #- Proteínas que aumentaram no proteoma diferencial.

Os resultados da análise do Cytoscape das proteínas identificadas mostram aumento da fosforilação de proteínas envolvidas em processos biológicos que incluem principalmente a Fixação de Carbono em organismos Fotossintéticos, e Glicólise/Gliconeogênese (Figura 19-A). Em geral, pode-se observar que o aumento da fosforilação das proteínas foi maior na cultivar tolerante sob estresse moderado (círculos maiores em negrito em vermelho-Figura 19-B), onde se salientam a fosforilação de proteínas associadas a Fixação de Carbono e Glicólise/Gliconeogênese. Devido ao fato de que também houve aumento de expressão de certas proteínas desses grupos sob esse nível de estresse na cultivar tolerante, é possível que a maior taxa de fosforilação seja devido ao aumento do nível da proteína, e não a uma resposta fisiológica de tolerância envolvendo a fosforilação (Tabela 3). A cultivar tolerante apresentou processos com aumento de fosforilação proteica exclusivos, como a Biossíntese de Valina, Leucina e Isoleucina, o Metabolismo de Glioxilato e Dicarboxilato e Desfosforilação de proteínas. Apenas o processo catabólico dependente de ubiquitina foi exclusivo da cultivar sensível. Devido ao fato que o mesmo foi observado para o proteoma diferencial sob estresse moderado (Figura 16), o aumento da fosforilação de proteínas relacionadas a esse processo ocorreu devido ao aumento dos níveis da proteína “ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase” no proteoma diferencial. Esta enzima atua na degradação de proteínas, muitas delas que se tornaram alvo após algum dano oxidativo. Adicionalmente, processos como Metabolismo de Nitrogênio, Peroxissomo, Metabolismo de Clorofila e Porfirina e Via Pentose Fosfato aumentaram em ambas as cultivares sob estresse moderado.

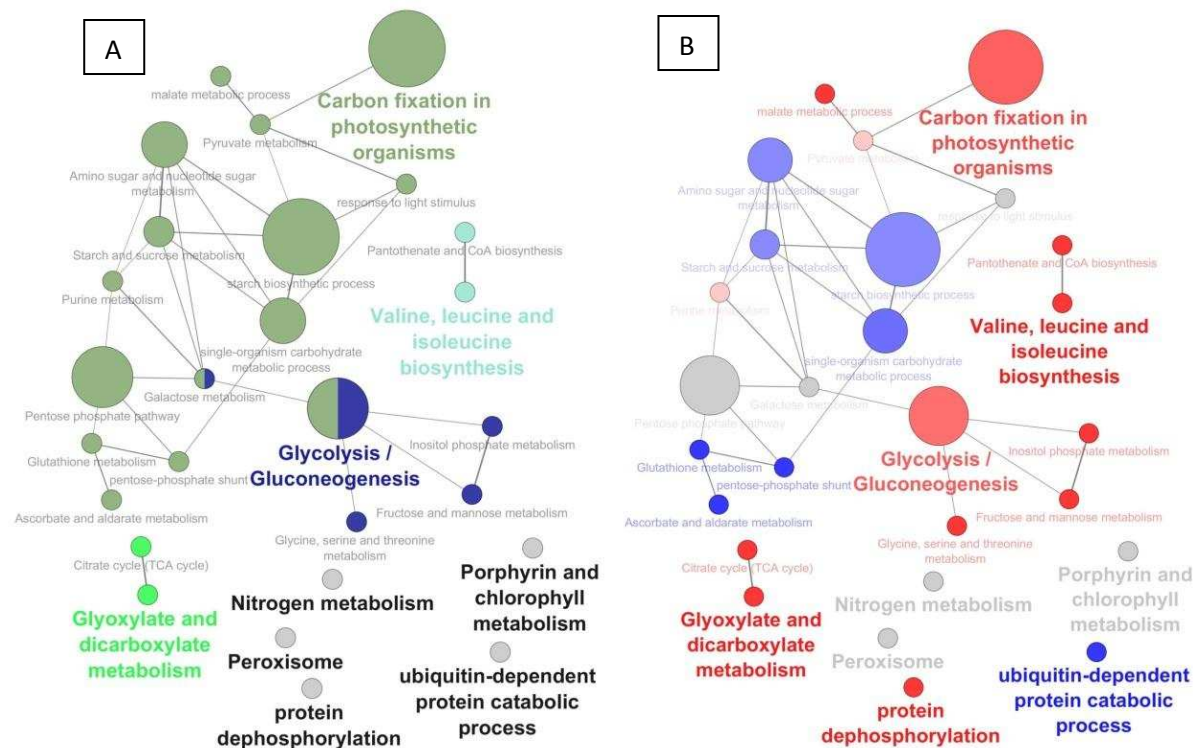


Figura 19 – Fosfoproteoma – Processos biológicos com proteínas que tiveram aumento significativo da fosforilação nas cultivares RB 867515 (tolerante) e RB 855536 (sensível) sob condição de estresse moderado (-0,5MPa). **A** – Resultado da análise feita no Cytoscape-ClueGO mostrando os grupos e os respectivos processos biológicos mais enriquecidos indicados pelo tamanho dos círculos . Em negrito, é mostrado o processo mais enriquecido de cada grupo. As cores se referem aos agrupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicados via conexão por linhas. Os círculos em cinza se referem aos processos não agrupados. **B** – Discriminação dos processos biológicos entre cultivares. Em vermelho, processos com proteínas que aumentaram o conteúdo exclusivamente na cultivar tolerante e em azul, na cultivar sensível. Cores menos intensas (vermelho claro, por exemplo) indicam maior número de proteínas ligadas a determinado processo e a determinada cultivar. Em cinza, os processos biológicos não específicos (comuns as duas cultivares)

4.10.2-Análise do fosfoproteoma em folhas das cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico severo

Assim como no proteoma diferencial em que ocorreu aumento do número de proteínas induzidas sob estresse severo quando comparado ao estresse moderado, as proteínas fosforiladas também aumentaram indicando maior quantidade de rotas metabólicas sendo reguladas nessa situação (Tabela 4).

Pode-se destacar as proteínas desidrogenase do gliceraldeído, 6-fosfogluconolactonase, sintase do ATP, enzima málica, transcetolase, fosforibocinase, oxidoreductase da ferredoxina-NADP(H) do mecanismo fotossintético. Como não tiveram aumento em abundância (tabela 4), possivelmente aumentaram o grau de fosforilação proteica sugerindo possíveis mecanismos de regulação metabólica. Além do mais, proteínas identificadas que se apresentaram como diferentes isoformas (exemplo cinase do fosfoglicerato) fornecem evidências de fosforilação que se reforçam mutuamente.

Da mesma forma ocorreu para as enzimas cinase do fosfoglicerato e sintase do malato da respiração. Já no metabolismo antioxidativo, a isoforma 7 da APX e a sintase da glutathiona também se enquadram na mesma situação. Ressalta-se que no proteoma diferencial ocorreu aumento de outras isoformas de APX (APX4, APX1, APX2) e estas não apresentaram variação na fosforilação.

Proteínas ligadas ao metabolismo de aminoácidos também tiveram aumento do grau de fosforilação (aminotransferase ALD1, subunidade maior da 3-isopropylmalato e redutoisomerase de ceto-acido) assim como proteínas ditas induzidas por estresse (subunidade 60KDa da chaperonina, proteína contendo domínio A/B e lipocalina).

Tabela 4. Proteínas com aumento da fosforilação identificadas por proteínas por MS em folhas de plantas de cana-de- açúcar sob déficit hídrico de -1MPa (estresse severo)

Spot ID	Protein	Sublocation	Ref	Scaffold probability	Expression Level	T-1	T-2
Photosynthesis							
3	Photosystem II oxygen evolving complex	chloroplast		100.0% #	4,46	x	
42	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1	95.0%	1,78	x	
44	6-phosphogluconolactonase 4 (6PGL 4)	chloroplast	1	100.0%	2,26	x	
50	Pyruvate phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast	1	98.2% #	2,50	x	
50	Pyruvate phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast	1	98.2% #	1,71		x
52	Harpin binding protein I	chloroplast		100.0%	2,82	x	
59	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	chloroplast	6	100.0% #	1,61	x	
120	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1	100.0% #	1,86	x	
200	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast		98.2% #	1,79	x	
220	ATP synthase subunit beta	mitochondrial chloroplast	1	100.0%	1,62	x	
256	Malic enzyme	chloroplast	3	99.8%	1,53	x	
262	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast		95.3% #	1,88	x	
269	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB)	chloroplast		99.7% #	1,68	x	
273	Transketolase	chloroplast	4	100.0%	1,87	x	
354	Phosphoribulokinase	chloroplast	1	100.0%	2,07	x	
11	Phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic	1	100.0% #	3,86		x
19	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast	4	100.0% #	2,11		x
86	Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	chloroplast	1	100.0%	1,83		x
120	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1	100.0% #	1,91		x
Respiration							
168	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5	100.0% #	1,63	x	
173	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1	100.0%	1,65	x	
151	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1	100.0%	1,85	x	
252	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	1	100.0% #	1,84	x	
13	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast		95.0% #	2,55		x
15	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast		100.0% #	1,66		x
372	Malate synthase	mitochondrial		95.0%	2,36		x
Antioxidative metabolism							
55	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1	100.0%	3,55	x	
55	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1	100.0%	3,14		x
201	Glutathione synthetase	cytoplasmic chloroplast		95.0%	1,88	x	
250	Protein disulfide isomerase-like 1-2 (PDIL1-2)	ER		99.0%	1,56	x	
21	2-Cys peroxiredoxin BAS1 (Thiol-specific antioxidant protein)	chloroplast		99.9% #	1,90		x
198	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4	100.0% #	1,77		x
Sugar metabolism							
275	Phosphoglucomutase	chloroplast	1	100.0% #	1,70	x	
Metabolism of Amino Acids							
176	Aminotransferase ALD1 homolog	chloroplast	1	100.0%	1,50	x	
215	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	chloroplast	1	100.0%	1,68	x	
233	Adenosylhomocysteinase	chloroplast	4	100.0% #	1,68	x	
243	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5	95.0%	1,96	x	
163	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1	99.9% #	2,20		x
Induced Stress Proteins							
251	60 kDa chaperonin alpha subunit (Putative rubisco subunit binding-protein alpha subunit)	chloroplast		100.0%	2,21	x	
48	Stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1	99.8%	2,91	x	
48	Stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1	99.8%	2,57		x
14	Temperature stress-induced lipocalin			100.0%	3,15		x
Other Mechanisms							
47	14-3-3-like protein GF14-E (G-box factor 14-3-3 homolog E)	cytoplasmic		100.0%	1,97	x	
88	Inositol-1-monophosphatase	chloroplast		95.0%	2,70	x	
96	Kelch repeat containing protein	cytoplasmic		100.0%	1,77	x	
199	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 2	nuclear		100.0% #	1,63	x	
240	Ferredoxin--nitrite reductase	chloroplast		100.0%	1,67	x	
304	Cytosolic factor-like protein	cytoplasmic nuclear		99.5% #	1,55	x	
349	Carboxymethylenebutenolidase-like protein	chloroplast		100.0%	1,95	x	
362	(Translation initiation factor 5A)	cytoplasmic		99.8%	4,33		x
20	Peptide methionine sulfoxide reductase A2-1 (MSRA2.1)	cytoplasmic		100.0%	2,62		x

323	14-3-3-like protein GF14-E (G-box factor 14-3-3 homolog E)	cytoplasmic	99.8%	1,52		x
333	Germin-like protein 8-14 (Germin-like protein 1)	extracellular	99.8% #	3,96		x
Unknown						
56	Os08g0266300 protein	chloroplast	99.8%	2,03	x	
140	Os04g0466600 protein	cytoplasmic chloroplast	99.9%	1,79	x	
247	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0% #	1,50	x	
247	Os01g0793300 protein	extracellular	100.0% #	4,08		x
6	Os05g0157200 protein	cytoplasmic	100.0% #	7,99		x

Exp. Level – Expression level; Scaffold- Protein identification probability, T- Tolerant e S- sensitive. Ref. Referencias de confirmação de sítios de fosforilação encontrados nessas proteínas (1, Nakagami et al., 2010; 2, Sugiyama et al., 2008; 3, Engelsberger et al., 2012; 4, Reiland et al., 2009; 5, Rose et al., 2012)

#- Proteínas que aumentaram concentração no proteoma diferencial.

Pela análise do Cytoscape, processos biológicos com aumento da fosforilação das proteínas sob estresse severo incluem principalmente a fixação de carbono em organismos fotossintéticos, glicólise/gliconeogênese, via pentose fosfato, metabolismo de glutatona e fotossíntese (Figura 20-A). Dentre esses, com exceção do processo fotossíntese, todos tiveram maior proporção de proteínas na cultivar tolerante (Figura 20-B). Os processos biossíntese de leucina, isoleucina e valina, metabolismo de inositol fosfato, degradação de RNA, metabolismo de nitrogênio, biossíntese de lisina, metabolismo de glicina, serina e treonina e metabolismo de galactose foram mais pronunciados na cultivar tolerante enquanto que a fosforilação de proteínas associadas ao metabolismo de fenilalanina foi mais pronunciado na cultivar sensível.

O que podemos ver novamente, é que a maior parte das mudanças dos processos quanto a fosforilação, foram mais proeminentes na cultivar tolerante (maior número e área dos círculos vermelhos), espelhando em parte o observado no proteoma diferencial.

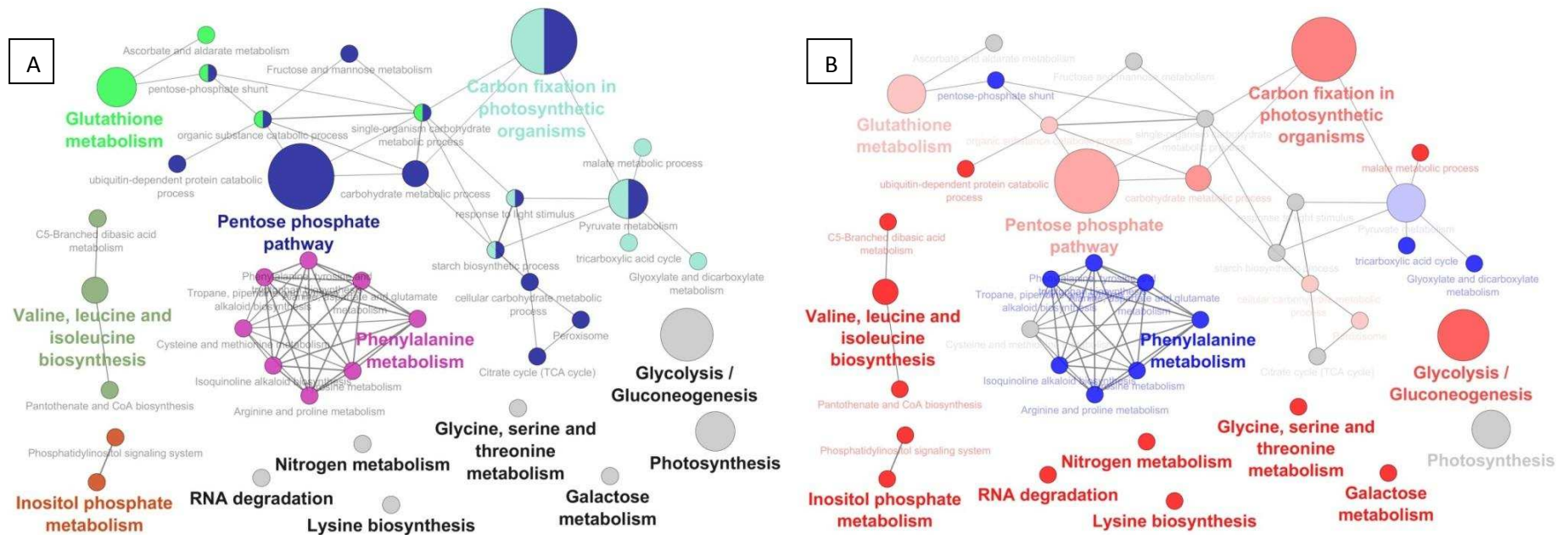


Figura 20 – Fosfoproteoma – Processos biológicos com proteínas que tiveram aumento significativo da fosforilação nas cultivares RB 867515 (tolerante) e RB 855536 (sensível) sob condição de estresse severo (-1MPa). **A** – Resultado da análise feita no Cytoscape-ClueGO mostrando os grupos e os respectivos processos biológicos mais enriquecidos indicados pelo tamanho dos círculos. Em negrito, é mostrado o processo mais enriquecido de cada grupo. As cores se referem aos agrupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicados via conexão por linhas. Os círculos em cinza se referem aos processos não agrupados. **B** – Discriminação dos processos biológicos entre cultivares. Em vermelho, processos com proteínas que aumentaram o conteúdo exclusivamente na cultivar tolerante e em azul, na cultivar sensível. Cores menos intensas (vermelho claro, por exemplo) indicam maior número de proteínas ligadas a determinado processo e a determinada cultivar. Em cinza, os processos biológicos não específicos (comuns as duas cultivares)

4.11- Redoxproteoma

4.11.1-Análise da oxidação de proteínas em folhas das cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico moderado.

Embora as plantas produzam continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs), em condições de estresse estas moléculas podem danificar componentes celulares (DNA, lipídeos e proteínas). A carbonilação de resíduos de aminoácidos (arginina, lisina, treonina ou prolina) é uma das mais comuns modificações oxidativas de proteínas e podem levar a alterações na atividade das proteínas (Levine and Stadtman, 2001).

Desta forma, foi analisada a oxidação de proteínas via identificação de carbonilação e, por limitações técnicas, nessa abordagem, apenas foram estudados a variações no estresse moderado.

Na tabela 5 é possível visualizar as proteínas que se tornaram mais oxidadas diante do estresse hídrico. Essas foram relacionadas ao ciclo de Calvin (carboxilase da ribulose fosfato, isomerase da triose fosfato, desidrogenase do gliceraldeido 3-P, transcetolase), a descarboxilação (enzima málica e dicinase do piruvato-fosfato) e carboxilação (carboxilase do fosfoenolpiruvato) em plantas C4 entre outros mecanismos relacionados a fotossíntese (sintase do ATP e proteína do complexo de evolução do oxigeno (CEO) do fotossistema II). Relativa à fotossíntese, pouca diferença pode ser observada entre as cultivares.

Também aumentou a oxidação de enzimas relacionadas à respiração mitocondrial (mutase do fosfoglicerato, subunidade sintase do ATP, cinase do piruvato fosfato). As enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidativo (APX1, nucleoredoxina, e peroxiredoxina) foram oxidadas apenas na cultivar na cultivar tolerante. Aumentou também a oxidação de proteínas do metabolismo de ácidos nucleicos (cinase do Adenilato), metabolismo de aminoácidos (metiltransferase do 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína e aminotransferase do aspartato), de proteínas induzidas por estresse, chaperonas moleculares (proteína de choque de calor de 70 Kda e chaperonas da família DnaK) entre outras.

Tabela 5. Proteínas com aumento da oxidação identificadas por MS em folhas de plantas de cana-de- açúcar sob déficit hídrico de -0,5MPa (estresse moderado).

Spot ID	Protein	Sublocation	Exp. Level	Scaffold prob.	T -0,5	S -0,5
Photosynthesis						
3	ATP synthase gamma chain 1 (H(+))	chloroplast	2,20	99.9%	x	
11	Triosephosphate isomerase	chloroplast	1,87	100.0%		x
27	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor	cytoplasmic chloroplast	4,05	100.0%	x	
38	Malic enzyme	chloroplast	2,26	99.8% #	x	
38	Malic enzyme	chloroplast	2,54	99.8% #		x
50	Pyruvate, phosphate dikinase 2	cytoplasmic chloroplast	6,43	100.0% #	x	
50	Pyruvate, phosphate dikinase 2	cytoplasmic chloroplast	1,82	100.0% #		x
51	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic	1,59	99.8%	x	
52	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic	2,12	95.0%	x	
59	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic	2,06	100.0%	x	
60	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic	2,03	100.0%	x	
86	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic	1,89	100.0%	x	
93	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast	3,29	100.0%	x	
93	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast	2,96	100.0%		x
100	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1,52	95.0% #	x	
48	Transketolase	chloroplast	2,78	95.0%		x
61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic	1,51	100.0% #		x
Respiration						
40	Phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	3,28	99.8%	x	
40	Phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	2,74	99.8%		x
13	ATP synthase subunit alpha	mitochondrial	5,07	95.0%	x	
77	Phosphoglycerate kinase	chloroplast	1,51	100.0%	x	x
34	Pyruvate, phosphate dikinase 2	cytoplasmic chloroplast	1,86	99.7%	x	
Antioxidative metabolism						
23	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic (Thiol-specific antioxidant protein)	chloroplast	2,12	99.8%	x	
24	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic	1,50	99.9%	x	
111	Probable nucleoredoxin 1-2 (Nrx1-2)	cytoplasmic	1,61	95.0%	x	
97	2-Cys peroxiredoxin BAS1(Thiol-specific antioxidant protein)	chloroplast	1,88	100.0%	x	
Sugar metabolism						
99	Phosphoglucomutase	chloroplast	2,17	99.6% #		x
1	Phosphoglucomutase	chloroplast	2,14	99.6%	x	
Nucleic Acid Metabolism						
96	Adenylate kinase, chloroplast (ATP-AMP transphosphorylase)	chloroplast	1,65	95.0%	x	
Metabolism of Amino Acids						
49	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	cytoplasmic chloroplast	1,70	100.0%	x	x
5	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1,83	100.0%		x
Induced Stress Proteins						
18	DnaK family protein	mitochondrial	1,51	95.0% #	x	
Other Mechanisms						
20	70 kDa heat shock protein	chloroplast	1,83	100.0%	x	
107	14-3-3-like protein GF14-D (G-box factor 14-3-3 homolog D)	cytoplasmic nuclear	1,97	99.8%	x	
108	Soluble inorganic pyrophosphatase	chloroplast	2,21	100.0%	x	

Exp. Level – Expression level; Scaffold- Protein identification probability, T- Tolerant e S- sensitive
- Proteínas que aumentaram concentração no proteoma diferencial.

Pela análise do Cytoscape, proteínas que aumentaram a oxidação foram relacionadas principalmente aos processos biológicos como fixação de carbono em organismos fotossintéticos e glicólise/gliconeogênese (Figura 21- A). Metabolismo de glutatona, degradação de RNA e endocitose foram mais pronunciados na cultivar tolerante, enquanto que o metabolismo de fenilalanina, mais pronunciado na cultivar sensível (Figura 21-B). Um mesmo número de proteínas foi oxidada no processo

fixação de carbono em organismos fotossintéticos nas cultivares e uma proporção maior de proteínas ligadas a glicólise/gliconeogênese na cultivar sensível.

Muitos processos que ocorreram oxidação, também tiveram aumento das respectivas proteínas no proteoma diferencial como foi o caso, principalmente, nos mecanismos de fixação de carbono (tabela 5). Entretanto, o aumento, por exemplo, da oxidação de proteínas da glicólise e gliconeogênese não foi observado no proteoma diferencial. A maior oxidação dos genes desta classe ontológica na sensível contrasta com a maior fosforilação da mesma na cultivar tolerante, neste mesmo nível de estresse. Esta correlação negativa entre fosforilação e oxidação levanta a hipótese de um possível papel da fosforilação na proteção contra a oxidação. Entretanto o oposto é visto para proteínas da classe do metabolismo da fenilalanina: tanto a fosforilação como a oxidação são maiores na cultivar sensível. Este contraste pode indicar que existiria uma limitação a certas proteínas deste potencial mecanismo protetor contra oxidação proteica.

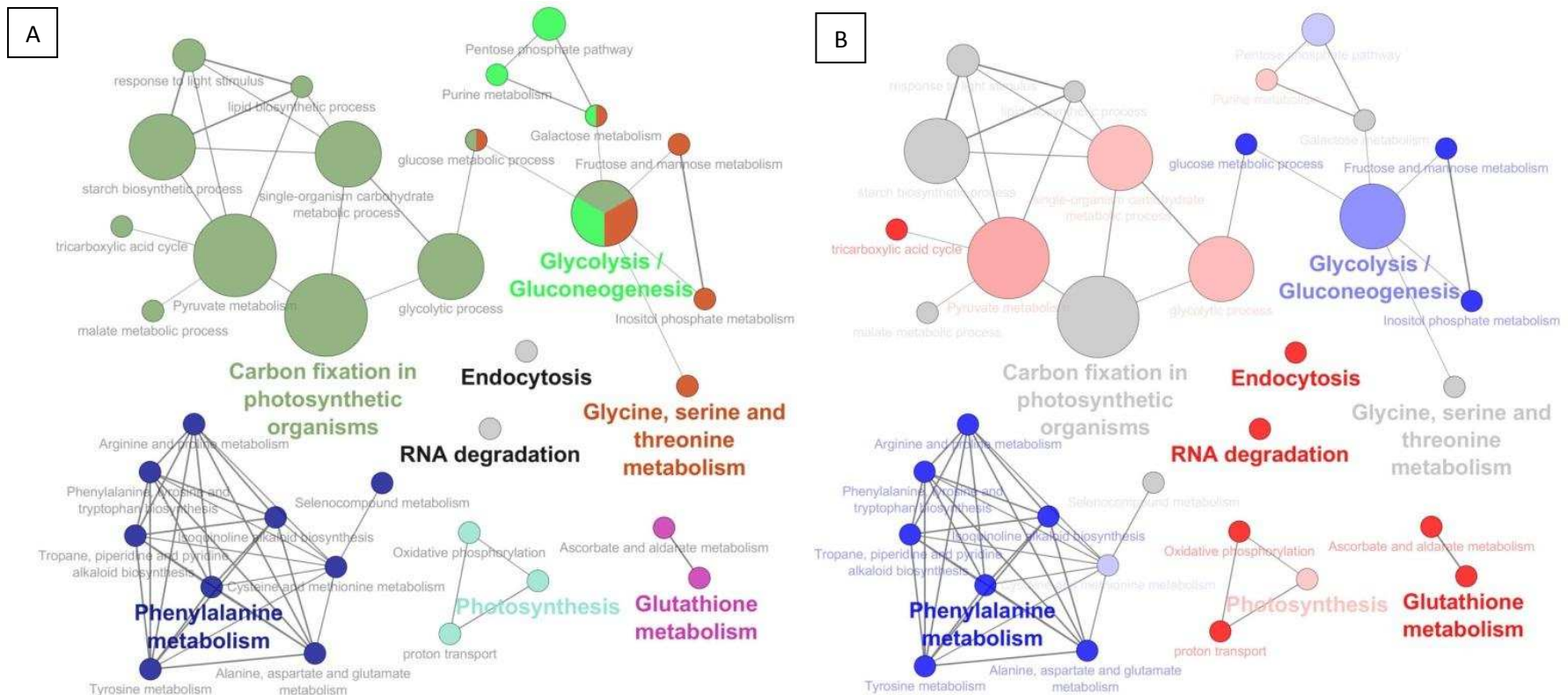


Figura 21– Redoxproteoma – Processos biológicos com proteínas que tiveram aumento significativo da abundância nas cultivares RB 867515 (tolerante) e RB 855536 (sensível) sob condição de estresse moderado (-0,5MPa). **A** – Resultado da análise feita no Cytoscape-ClueGO mostrando os grupos e os respectivos processos biológicos mais enriquecidos indicados pelo tamanho dos círculos . Em negrito, é mostrado o processo mais enriquecido de cada grupo. As cores se referem aos agrupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicados via conexão por linhas. Os círculos em cinza se referem aos processos não agrupados. **B** – Discriminação dos processos biológicos entre cultivares. Em vermelho, processos com proteínas que aumentaram o conteúdo exclusivamente na cultivar tolerante e, em azul, na cultivar sensível. Cores menos intensas (vermelho claro, por exemplo) indicam maior número de proteínas ligadas a determinado processo e a determinada cultivar. Em cinza, os processos biológicos não específicos (comuns as duas cultivares).

4.12- Perfil metabólico em folhas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

Em termos gerais foi possível observar que o estresse hídrico causou variação no metabolismo de açúcares, no metabolismo de aminoácidos e no metabolismo de ácidos orgânicos nas cultivares de cana-de-açúcar estudadas (Figura 22).

A sacarose diminuiu com a imposição do déficit hídrico não diferindo entre as cultivares, consequência esperada do efeito negativo deste estresse no crescimento, apresentado anteriormente. De forma oposta, os níveis de glicose e frutose aumentaram com o estresse, sendo os níveis de glicose maiores nas cultivares tolerantes, tanto a -0,5MPa e -1MPa. Resultados semelhantes foram obtidos para esses açúcares nas análises anteriores utilizando métodos enzimáticos (Figura 14). Outros açúcares como galactose e xilose também aumentaram sob ambos níveis de estresse mas sem diferenças entre cultivares. Rafinose aumentou a -0,5MPa em ambas cultivares. A -1MPa, esse metabólito foi maior na cultivar tolerante. Galactose-6-fosfato não diferiu entre os tratamentos. Houve aumento de inositol com maiores níveis na cultivar tolerante somente a -0,5MPa. Estes outros açúcares são derivados da glicose, e seus aumentos podem ser devidos ao aumento da glicose, que por sua vez pode explicar a redução da sacarose.

Entre os ácidos orgânicos, piruvato apresentou redução drástica com a imposição do estresse (-0,5MPa e -1MPa) mas essa redução não diferiu entre cultivares. Já para o isocitrato, houve somente diferença a -1MPa e foi maior em todas as condições hídricas na cultivar tolerante. Malato não se alterou com o estresse mas foi maior na cultivar tolerante a -0,5MPa. Esse resultado de malato é similar ao obtido anteriormente (figura 14). Aconitato diminuiu apenas na cultivar sensível e a -1MPa. Já quanto ao glicerato, houve aumento dos níveis sob estresse hídrico indistintamente nas duas cultivares. O aumento dos níveis de algumas proteínas do ciclo do citrato, sob estresse moderado, ocorre somente na cultivar sensível, e nesta também ocorrem os menores níveis de malato e isocitrato. Esta concordância entre dados proteômicos e metabólicos sublinha a importância desta mudança metabólica na menor tolerância ao estresse desta variedade. Entretanto esta correlação negativa não existe sob estresse severo neste genótipo. O estresse severo mostra que há um aumento maior da expressão de proteínas de glicólise na cultivar tolerante e isto foi associado a um nível maior de glicose nesta variedade, o que poderia explicar os maiores níveis de isocitrato neste nível de estresse.

Quanto aos aminoácidos, a maioria aumentou os níveis com a imposição de déficit hídrico (fenilalanina, triptofano, tirosina, valina, leucina, prolina, glutamina,

glutamato, metionina, lisina, treonina, isoleucina, asparagina, serina e glicina) em ambas cultivares. Dentre esses, muitos tiveram níveis significativamente maiores na cultivar tolerante sobre estresse (triptofano, valina, leucina, lisina, isoleucina, treonina, asparagina, serina e glicina). Sob estresse moderado os maiores níveis de proteínas associadas ao metabolismo da arginina e prolina na cultivar sensível não resultaram em níveis maiores nessa cultivar, visto que os aumentos desses aminoácidos sob diferentes níveis de estresse foram semelhantes entre as cultivares. Já sob estresse severo, houve aumento das proteínas do metabolismo da glicina, serina e treonina e este aumento foi associado com maiores aumentos da serina (ambos níveis de estresse), glicina (estresse moderado) e treonina (ambos os estresses). Esta boa correlação também indica a significância destas mudanças proteômicas e sugere sua importância na tolerância.

Apenas alanina teve diminuição dos níveis a $-0,5\text{MPa}$ e sem diferença a -1MPa quando comparado a condição irrigada. Aspartato não teve alteração com o estresse. Esses dois aminoácidos não diferiram entre as cultivares em nenhuma das condições hídricas.

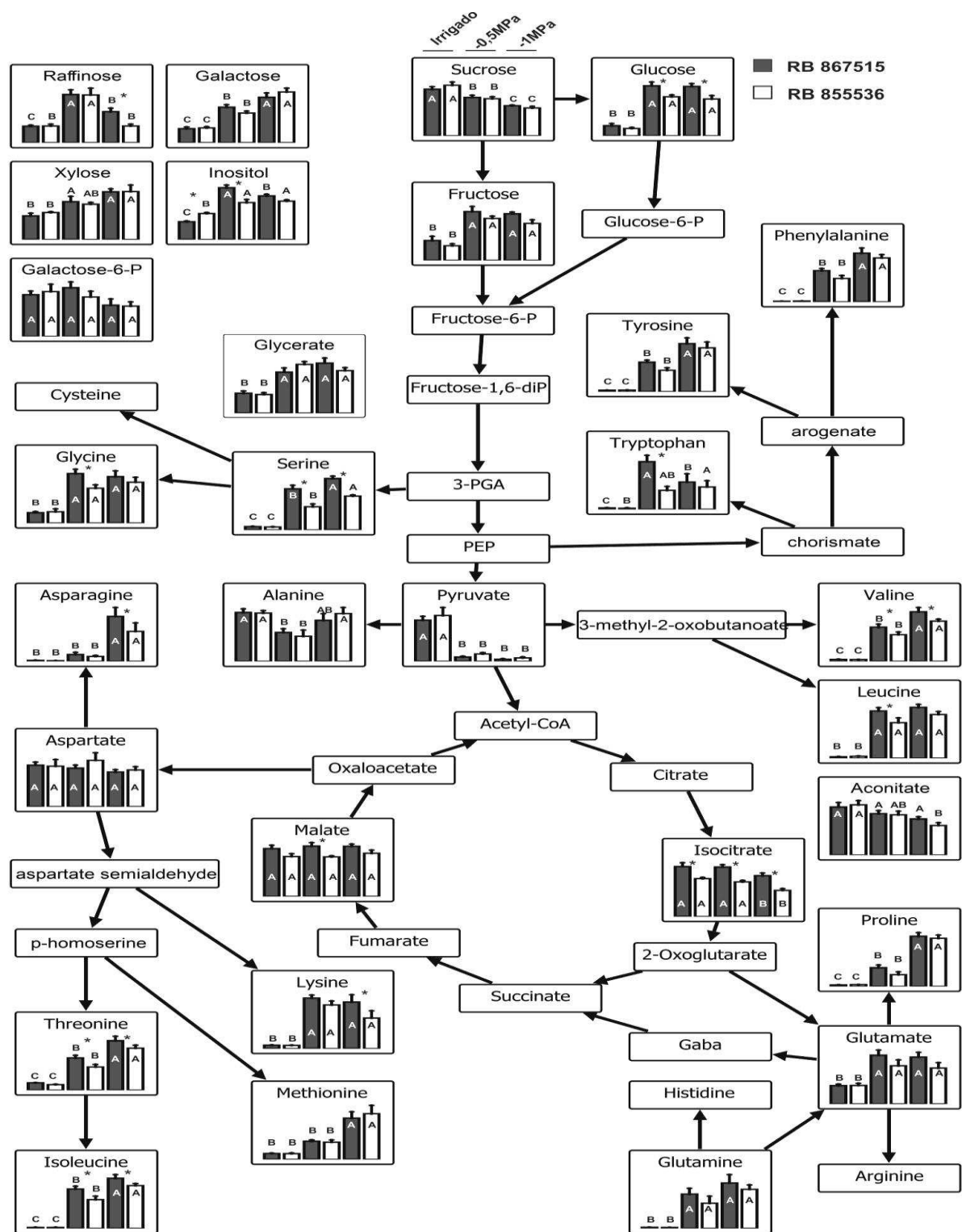


Figura 22 – Perfil metabólico de folhas de cana-de-açúcar das duas cultivares de cana-de-açúcar sob diferentes condições de disponibilidade hídrica (Irrigado, -0,5MPa e -1MPa). Os metabolitos foram identificados por GC-MS, foram normalizados em relação a cultivar RB 867515 (Irrigado) e expressos como unidades arbitrárias por miligrama de peso liofilizado (AU/mg). Letras indicam diferenças entre os tratamentos e asterisco entre cultivares.

5. DISCUSSÃO

5.1- Cultivar RB867515 sob estresse hídrico severo possui menor desidratação foliar e maior acúmulo de massa seca nos colmos

Em condições de campo foi observado que a variedade RB867515 é mais tolerante a seca, e que a variedade RB855536 é mais sensível, corroborando com dados científicos já realizados relativos à produtividade (toneladas de colmo por hectare) (Barbosa et al. 2001; Boletim Técnico, 2008). Podemos observar que sob estresse hídrico severo a cultivar RB 867515 apresentou características importantes que permitem classificá-la como relativamente mais tolerante a seca: maior teor relativo de água em folhas (Figura 2), ao mesmo tempo que possuiu cerca de 20% maior massa seca no colmo (Figura 4-C), em média, tanto sob estresse hídrico moderado como severo. É interessante observar que estas diferenças foram visíveis mesmo com certa velocidade de imposição do déficit hídrico, que foi de 6 dias em vasos de 30 litros, o que sugere que estas mudanças podem ser maiores em condições de campo. Em experimentos com vasos menores, realizados previamente, não conseguimos observar maior tolerância. Estes resultados aqui obtidos resultam então, em uma metodologia que permite observar a maior tolerância a seca entre estes cultivares, utilizando experimentos em vasos e em casa de vegetação, permitindo então estudos mais controlados, com menor número de variáveis, situação ideal para o aprofundamento dos estudos moleculares da tolerância a seca em cana-de-açúcar.

5.2- Maior tolerância a seca é conferida por maior área superficial da raiz e sistema radicular mais profundo mas com menor razão raiz/parte aérea.

É comum encontrarmos na literatura que a restrição do crescimento da parte aérea e o aumento do crescimento do sistema radicular, resultando em uma maior razão raiz/parte aérea, é uma característica que contribui para a tolerância a seca (Huck et al., 1983). Menor área foliar, pode resultar em menor perda de água, e um maior sistema radicular, pode aumentar a capacidade de extrair água do solo sob deficiência hídrica.

Em estudos com soja foram encontradas correlações significativas entre tolerância à seca e características do sistema radicular, tais como peso seco, comprimento total e volume (Liu et al., 2005; Manavalan et al., 2009; Read & Bartlett 1972). Em pesquisas com *Myrtus communis* e *Nerium oleander*, o déficit de irrigação aumentou a porcentagem de raízes grossas e reduziu a porcentagem de raízes médias e

finas (Bañón et al, 2002; 2006). No entanto, raízes mais finas em comparação com o controle irrigado foram relatadas por estresse hídrico em *Silene vulgaris* (Franco et al., 2008).

Nos genótipos utilizados nesse estudo, observamos que a arquitetura do sistema radicular foi mais importante que a razão raiz/parte aérea. A variedade mais tolerante, mesmo na ausência, como na presença de diferentes níveis de estresse apresentou sempre menor razão raiz/parte aérea comparada à variedade menos tolerante. Isto é devido ao fato que a cultivar tolerante sempre mantém maior massa seca da parte aérea sob os diferentes níveis de estresse, e a sensível apresenta maior massa seca radicular na ausência do estresse e sob estresse moderado, isso associado com menor desidratação.

Assim, a postergação do enrolamento foliar pela cultivar tolerante (Figura 6) possibilita maior tempo de exposição das folhas a radiação solar e, conseqüentemente, pode contribuir para maiores ganhos de massa. Isto também indica que nos genótipos testados, o enrolamento foliar é uma resposta que ocorre após um maior grau de desidratação foliar, e que se constitui mais em um mecanismo de aclimação do que tolerância a seca em cana.

Os resultados obtidos a partir da morfometria radicular demonstram diferenças morfológicas entre as cultivares e também quanto à responsividade ao déficit hídrico. A cultivar tolerante apresentou, por grama de tecido, raízes mais compridas e mais finas o que refletiu numa área superficial também maior (Figura 5). Essa característica maximiza o contato com o solo e associada ao maior aprofundamento radicular pode contribuir com uma maior eficiência de absorção de água pela cultivar tolerante em condições de escassez hídrica. Desta forma, embora tenha menor massa seca (quantidade e proporção) (figura 5-D e 5-G) e volume radicular (figura 3-F), a cultivar tolerante compensa essa característica com raízes mais eficientes na absorção de água. Assim, menor investimento em massa, pode permitir maior comprimento total de raízes, o que sugere que a redução do diâmetro das raízes pode beneficiar o aumento do comprimento das mesmas, resultando em maior área superficial e provável maior eficiência de absorção de água por grama de raízes, como observado no cultivar tolerante. Estes contrastes são ricos em sugerir que o investimento em arquitetura e morfologia radicular possa ser uma resposta mais efetiva em conferir a tolerância do que apenas o aumento do volume ou massa radicular, e salientam a importância destas variáveis na tolerância a seca da cana.

5.3- Comportamento estomático e fotossintético em resposta ao déficit hídrico não contribuem para a tolerância a seca na cultivar RB 867515

Os resultados obtidos nas análises de trocas gasosas mostraram uma diminuição em g_s , A e E à medida que se diminui o potencial hídrico nas folhas de cana de açúcar. Entretanto os cultivares não diferem entre si.

Em primeira análise, pode-se inferir que a diminuição em g_s devido ao decréscimo do potencial hídrico explica a diminuição em A e E . Decréscimos em g_s por si causam diminuição progressiva de A e também C_i/C_a (Radin et al, 1988, Ainsworth et al, 2007). No entanto, os resultados de C_i/C_a denotam que a concentração interna de CO_2 com a imposição do déficit hídrico (-0.5MPa e -1MPa) aumentou. Assim, verifica-se a possibilidade de estar ocorrendo diminuição na eficiência de assimilação de carbono, não só devido à indisponibilidade de CO_2 gerada pela menor g_s , mas também devido a alterações nos processos de fixação de CO_2 da fotossíntese. Ambas as cultivares tiveram aumento gradativo em C_i/C_a , que foi mais expressivo na cultivar tolerante, mostrando assim, uma maior susceptibilidade (a -0,5MPa) desse aos danos causados pelo estresse hídrico. Essa maior vulnerabilidade da cultivar tolerante pode ter culminado com menores valores de eficiência instantânea do uso da água (A/E) quando comparada a cultivar sensível a -0,5MPa. No entanto, não foram encontradas diferenças na eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) entre as cultivares.

Valores de $\Delta\text{‰}$ podem alterar-se devido a variações na razão C_i/C_a e também devido a variações em Φ (ver fórmulas material e métodos). Φ depende da condutância física da parede das células da bainha à difusão de CO_2 e do balanço entre as atividades da PEP carboxilase e da RUBISCO (Farquhar, 1983).

Considerando Φ constante e ocorrendo diminuição gradativa de C_i/C_a , espera-se que ocorra aumento de $\Delta\text{‰}$ em plantas C_4 (Farquhar, 1983). No entanto, mesmo o déficit induzindo aumento de C_i/C_a (Figura 8-D) nas cultivares, ocorreu aumento de $\Delta\text{‰}$. Isso leva a supor que a variação de $\Delta\text{‰}$, neste caso, é devido ao aumento de Φ . Desta forma, baseado neste parâmetro, pode dizer que a cultivar tolerante é mais susceptível ao vazamento de CO_2 pelas células da bainha e/ou ao desbalanço nas atividades das enzimas carboxilativas sob déficit hídrico (-1MPa).

As análises relacionadas a fluorescência da clorofila a (Figura 10) indicam uma maior redução do rendimento quântico potencial do FSII na cultivar tolerante, embora

não ocorra diferenças entre elas na taxa de transporte de elétrons (ETR). Além disso, mostram que há diferenças na forma de eliminação do excesso do poder redutor entre as cultivares, utilizando em maior grau, a cultivar sensível, o ciclo das xantofilas, enquanto que a tolerante utilizando outro sistema, possivelmente o transporte cíclico de elétrons, como mecanismo de fotoproteção (Shikanai et al, 2007). Plantas de trigo submetidas a estresse hídrico exibiram o mecanismo de transporte cíclico como um dreno alternativo de elétrons na proteção dos fotossistemas (Zivcak et al. 2013).

Pode-se inferir que nestas condições estas plantas encontram-se sob estresse e em particular podem estar sofrendo danos fotoinibitórios, contribuindo para uma redução na fotossíntese. Isso corrobora com o aumento em C_i/C_a indicando que a limitação fotossintética não é só devida a diminuição de g_s . Além do mais, menores danos na cultivar sensível podem ser explicados ao menos parcialmente pela dissipação do excesso de energia via ciclo das xantofilas.

É possível verificar que o retardamento da desidratação foliar representado pelos maiores valores de TRA na cultivar tolerante não está relacionada à g_s já que não houve diferença entre os genótipos. Ela poderia estar relacionada então a maior condutância hidráulica do xilema, ou a maior capacidade de absorção de água pelas raízes, que não foram estudadas nesta tese. Entretanto a maior área superficial radicular do genótipo tolerante suporta a segunda hipótese. Maior condutância hidráulica foi correlacionada a maior crescimento radicular em experimentos com plantas de pinus (Sayer et al, 2005).

A diminuição nos conteúdos de pigmentos (Figura 11) também pode ser responsável por parte da diminuição em A. Uma vez que a clorofila a localizada no complexo coletor de luz do FSII tem maior concentração nesse do que no FSI, o declínio da razão clorofila a/b pode refletir danos no complexo central do FSII, (Silva, 1998). Embora o déficit hídrico tenha causado danos, esses não diferiram nas duas cultivares com relação ao parâmetro clorofila a/b.

5.4- Mecanismo antioxidativo enzimático não contribui para a tolerância ao déficit hídrico

Embora seja claro que a deficiência hídrica tenha afetado as reações fotoquímicas em ambas as cultivares, não observou-se em nenhuma delas aumento da peroxidação de lipídeos, embora possa ser observado um claro aumento no extravasamento de eletrólitos, visível principalmente na cultivar sensível, em ambos níveis de estresse. Já outro indicador de estresse, a carbonilação de proteínas, resultante

da oxidação principalmente de resíduos de lisina em proteínas, é maior na cultivar tolerante sob estresse.

Verifica-se que atividade de nenhuma das 3 enzimas analisadas (APX, CAT e SOD) foi responsiva ao déficit hídrico na cultivar tolerante, demonstrando que o sistema antioxidante enzimático não é o principal mecanismo de combate a radicais livres nessa cultivar. Já na cultivar sensível, o acréscimo da atividade da APX mostra sua importância no mecanismo antioxidante neste genótipo. A maior atividade da CAT parece estar relacionada ao menor dano oxidativo nesta cultivar demonstrado pelos resultados de carbonilação.

O menor enrolamento foliar está ligado a uma maior exposição da folha a radiação luminosa. Isso leva a supor que a cultivar tolerante sob deficiência hídrica esteja mais susceptível a danos fotoinibitórios e oxidativos. Os resultados apresentados, como maior Ci/Ca, maior discriminação isotópica de C^{13} (especificamente determinado por Φ), menor Fv/Fm, menor Φ NPQ, maior carbonilação, em conjunto, dão suporte a maior exposição da cultivar tolerante a danos celulares. Entretanto, a ausência de danos oxidativos, exceto em relação a proteínas, sugere que há nesta variedade um mecanismo antioxidativo não enzimático eficiente.

5.5- Variedade tolerante possui maiores níveis de ABA sob estresse severo

Em geral, sob deficiência hídrica, a queda da fotossíntese inicialmente é devida ao fechamento dos estômatos e esta diretamente relacionada aos níveis de ABA foliar. O ABA tem uma dupla função frente à limitação hídrica. Em curto prazo reduz a transpiração e em longo prazo induz a síntese de aminoácidos livres (principalmente prolina e glicina) que aumentam a tolerância das plantas à seca (Adnan et al., 2012).

Existem vários trabalhos relatando a relação dos níveis de ABA com atividade de enzimas antioxidativas (Bano et al, 2012; Jiang and Zhang 2002; Boominathan et al., 2004). Ye et al. (2011), trabalhando com folhas de arroz em condições de déficit hídrico mostrou a relação dos níveis de ABA com a indução do gene (CATB- Catalase B) e por conseguinte, prevenindo o acúmulo excessivo de peróxido de hidrogênio. Mesmo com grande aumento desse hormônio em ambas cultivares de cana-de-açúcar, isso não refletiu em aumento substancial da atividade enzimática de CAT principalmente na cultivar tolerante (Figura 13).

Embora a cultivar tolerante tenha maior nível de ABA sob estresse severo, não possui menor gs. Entretanto pode-se notar que na variedade tolerante houve maior aumento no teor de aminoácidos totais, e de alguns aminoácidos como valina, lisina, isoleucina, asparagina, serina, glicina e treonina (Figura 22). Seria interessante observar se aplicações exógenas de ABA poderiam aumentar a concentração de alguns destes metabolitos em folhas, para confirmar estes resultados aqui obtidos. Adicionalmente, em função dos resultados do proteoma indicando a importância do metabolismo da glutatona para a tolerância, poderia ser usado o mesmo experimento para estudar o efeito do ABA na atividade total da GR redutase, bem como nos níveis de glutatona oxidada e reduzida.

Estudos têm demonstrado o acúmulo de glicose e frutose seguido pelo aumento na atividade da invertase em folhas de plantas submetidas à limitação hídrica (Pinheiro et al., 2001; Trouverie et al., 2003). ABA tem sido implicado em aumentar a atividade e expressão da invertase vacuolar (Trouverie et al., 2003), e os estudos do metabolismo deste trabalho mostram claramente a simultânea diminuição da concentração de sacarose e o aumento das hexoses.

5.6- Dados proteômicos sugerem a importância de mecanismos antioxidativos não enzimáticos na tolerância a seca na cana.

Os dados apresentados permitem ver que mudanças marcantes ocorrem no proteoma e metaboloma, algumas delas permanecendo sob estresse severo. Embora o agrupamento de proteínas enriquecidas permitam ver fenótipos proteômicos de difícil visualização em um tabela de proteínas diferencialmente expressas, esta última forma de apresentação nos permite, por exemplo, estudar associações funcionais ainda não descritas para a ontologia gênica. Embora o software Cytoscape e o plugin ClueGO forneçam uma rica topologia, eles são pobres ainda em dados funcionais (Wu et al., 2014). Por exemplo, na ontologia o metabolismo da cisteína é separado do metabolismo da glutatona, embora saibamos que ambos são funcionalmente ligados, e que uma maior demanda por glutatona cria uma maior demanda para a síntese de cisteína. Foi no cultivar tolerante que observou-se, na topologia do proteoma diferencial sob estresse moderado, aumento do metabolismo da cisteína e da glutatona, e apenas da glutatona, sob estresse severo, o que pode ser ilustrado pelo aumento exclusivo da glutatona sintase na cultivar tolerante neste nível de estresse.

Como já é estabelecido a relação do metabolismo de glutathione com o mecanismo antioxidativo em plantas sob estresse hídrico (Sofa et al. 2010), os resultados relativos a glutathione nos sugere que o metabolismo antioxidativo não enzimático possa contribuir para a maior tolerância a seca da cultivar RB 867515, mesmo sem diferenças no dano oxidativo (MDA e extravasamento de eletrólitos) e maior carbonilação de proteínas na cultivar tolerante.

As plantas podem evitar ou atrasar o estresse hídrico limitando a transpiração através do fechamento estomático ou reduzindo a área foliar exposta. Folhas de plantas de cana-de-açúcar são capazes de enrolar as folhas para reduzir a área foliar projetada e assim reduzir a radiação incidente (Inman-Bamber e Smith, 2006). Assim, o menor enrolamento foliar atrelado a maior massa dos colmos podem indicar que tenha havido um maior fluxo fotossintético e, em decorrência, uma maior produção de radicais livres (não medidos neste trabalho). Desta forma, para ter o mesmo dano, com maior produção de agentes oxidantes, haveria necessidade de um mecanismo mais ativo na cultivar tolerante.

Um exemplo que ilustra a necessidade de apresentarmos os dados como tabelas é o que observamos na tabela 1 (estresse moderado), onde proteínas que são funcionalmente relacionadas a reparo de danos oxidativos, como a peptidilprolil isomerase e chaperones DnaK (Schröder et al. 1993) estarem induzidas sob estresse moderado. No entanto, observamos que a chaperonina 60, a peptidilprolil isomerase e DnaK (spot 506) são classificadas como categoria desconhecida pelo Cytoscape e, portanto, não são consideradas na topologia (tabela 1 - material suplementar). Entretanto, elas são induzidas exclusivamente na cultivar sensível, o que pode ser uma evidência de dano oxidativo de proteínas na cultivar sensível.

5.7- Proteoma diferencial e fosfoproteoma indicam a importância da indução da glicólise sob estresse severo para a tolerância a seca

Embora já seja possível observar na tabela de proteínas diferencialmente detectadas sob estresse moderado (4 proteínas), é no estresse severo que temos um claro aumento da indução de proteínas da glicólise e do ciclo de citrato (20 proteínas) em ambas as cultivares, a maioria delas aumentada somente na cultivar tolerante (10), em contraste com aquelas que aumentaram exclusivamente na sensível (7). A grande maioria das proteínas induzidas exclusivamente na tolerante foram enzimas da glicólise,

razão pela qual no Cytoscape aparece o grupo Glicólise/Gliconeogênese como uma das principais rotas induzidas pela seca na cultivar tolerante.

A análise topológica dos dados de fosfoproteoma também indica um enriquecimento de proteínas da glicólise e ciclo do citrato fosforiladas na cultivar tolerante. Embora boa parte delas tenha sido induzida pelo estresse severo, muitas delas não foram diferencialmente expressas, indicando que os dados de fosfoproteoma não refletem necessariamente aumento da abundância da proteína (Tabela 4). Outro argumento para suportar esta interpretação é o fato de que proteínas não diferencialmente expressas sob estresse moderado na tolerante, foram fosforiladas, como a Cinase do Fosfoglicerato.

O aumento da respiração a baixos conteúdos relativos de água é relatado aumentar o metabolismo nas plantas dirigindo assim mecanismos de aclimação pra resistir ao estresse hídrico (Flexas et al., 2005). Muitas proteínas são fosforiladas em uma célula vegetal e algumas delas já foram relatadas sofrerem fosforilação em estresse hídrico (Ke et al., 2009). Convém ressaltar que no presente trabalho foram identificadas proteínas que ainda não haviam sido descritas como fosforiladas pela plataforma Planta Protein Phosphorylation Data Base (P3DB) (Tabelas 3 e 4).

Embora a fosforilação possa ter efeito positivo ou negativo na atividade da enzima, e que uma mesma enzima possa ter diferentes fosforilações, algumas com efeito positivo, outras com efeito negativo como o caso da sintase da sacarose fosfato (SPS) (Huber e Huber, 1996), os dados de metaboloma indicam o aumento de vários metabólitos respiratórios, e de seus derivados, como aminoácidos (Figura 14 e 22), o que significa maior demanda de intermediários respiratórios e a consequente necessidade de aumento da respiração.

A análise conjunta do proteoma com as modificações do metabolismo de amido revelam um importante papel deste metabolismo na tolerância a seca. A Fosfoglucosaminase converte Glicose-1P produto da degradação do amido pela enzima Fosforilase do Amido em Glicose-6P (Hattenbach e Heineke, 1999). Como no estresse hídrico ocorre uma queda muito pronunciada no teor de amido, a função do aumento da expressão desta enzima esta ligada a degradação desse, e não a sua síntese. Nossos dados mostram que na ausência de estresse hídrico, há mais do dobro de amido na folha da cultivar tolerante (Figura 14), e que, sob estresse hídrico moderado, observamos um aumento na expressão da fosfoglucosaminase cloroplastídica, em ambas as cultivares. Entretanto no fosfoproteoma, observamos que esta enzima é fosforilada tanto sob

estresse hídrico moderado (Tabela 3) como severo (Tabela 4) na cultivar tolerante, ao passo que na sensível, esta fosforilação foi detectada somente sob estresse moderado. Como há um aumento maior no acúmulo de aminoácidos e de vários intermediários do ciclo do citrato (citrato e isocitrato) sob estresse moderado, os dados sugerem que esteja havendo uma maior fosforilação desta enzima, e conseqüentemente um maior fluxo de degradação de amido na cultivar tolerante para suportar uma maior demanda de hexoses-fosfato para o ajuste osmótico da cultivar tolerante. Seria importante medir a respiração foliar durante o ciclo diário, bem como as hexoses-fosfato, para obter evidências adicionais para suportar, adicionalmente, esta hipótese da importância do metabolismo do amido foliar para a tolerância a seca em cana-de-açúcar.

5.8- Cultivar tolerante apresenta um maior nível e fosforilação de proteínas da fotossíntese sob estresse hídrico severo.

Enquanto que no estresse moderado observamos um aumento em somente 2 proteínas (tabela 1) da fotossíntese observamos um aumento em abundância de 10 proteínas (tabela 2) da fotossíntese na cultivar tolerante sob estresse severo. Embora medições pontuais da fotossíntese sob estresse severo não apresentem resultados diferenciais, estes dados sugerem que poderia haver uma maior capacidade fotossintética da cultivar tolerante. Dados de fosfoproteoma de estresse severo detectaram aumento na fosforilação de 14 proteínas ligadas a fotossíntese na cultivar tolerante (Tabela 4), enquanto que somente 5 foram fosforiladas na cultivar mais sensível. Estas diferenças poderiam explicar o maior acúmulo de massa seca em colmos desta cultivar, e poderia explicar também o maior nível de proteínas carboniladas (Figura 12). A soma destes dois fatos pode explicar a menor razão F_v/F_m (Figura 10) na cultivar tolerante sob estresse hídrico severo. Estas contradições aparentes podem servir de ilustração de como uma análise sistêmica pode sugerir interpretações alternativas quando os dados não se encaixam dentro de interpretações canônicas.

Resultados semelhantes com aumento da abundância de proteínas ligadas ao mecanismo fotossintético sob estresse hídrico também foram encontrados em plantas de feijão (Zadraznik et al 2013) e algodão (Deeba et al., 2012). Da mesma forma, Zhang et al. (2014), trabalhando com trigo identificou proteínas da fotossíntese com aumento da níveis de fosforilação.

5.9- Proteoma diferencial e fosfoproteoma indicam que em estresse hídrico severo há maior contribuição do sistema antioxidativo enzimático para a tolerância a seca em folhas de cana

A indução de aumento de proteínas de enzimas antioxidantes sob estresse moderado foi restrito a GR. Entretanto, sob estresse severo, observamos que 13 proteínas foram induzidas somente na cultivar tolerante (Tabela 2), enquanto somente uma na cultivar sensível. CAT e SOD não estão presentes nesta lista.

Entretanto, embora tenhamos observado aumento da atividade total da APX na cultivar sensível, mesmo este aumento não resultando em diferença entre as cultivares, observamos que somente na tolerante é que ocorre o aumento em 6 proteínas APX. Em arroz (planta modelo utilizada para identificação das proteínas neste trabalho) as diferentes isoformas da APX são classificadas de acordo com a localização subcelular em citosólicas (APX1 e APX2), peroxissomais (APX3 e APX4), mitocondriais (APX5 e APX6) e cloroplastídicas (APX7 e APX8) (Teixeira et al., 2004). Nossos resultados mostram a importância das isoformas citosólicas, em detrimento das cloroplastídicas e mitocondriais na tolerância ao estresse severo em cana.

Em contraste, dados de qRT-PCR mostraram alteração no nível de expressão de APX em arroz sob seca. Genes codificadores da isoforma cloroplastídica OsAPX8 e peroxissomal OsAPX4 foram fortemente reprimidos pelo estresse e por outro lado, as isoformas OsAPX1 e OsAPX2 citosólicas e também OsAPX5 e OsAPX6 mitocondriais foram induzidas por estresse hídrico (Caverzan, 2008).

Dados do fosfoproteoma reforçam a importância da APX. Uma diferente APX foi mais fosforilada sob estresse moderado em ambas as espécies (Tabela 3), ao passo que diferentes proteínas APX são fosforiladas sob estresse severo em cada cultivar (Tabela 4). Nenhuma destas isoformas da APX foi detectada no proteoma diferencial.

Adicionalmente, observamos a fosforilação exclusiva da glutationa sintetase somente na cultivar tolerante e sob estresse severo, onde também não observamos diferenças no proteoma diferencial. Estes resultados indicam um possível papel positivo desta fosforilação na atividade desta enzima. O aumento da GR e da redutase do monodehidroascorbato reforçam a importância do ciclo da água-água como mecanismo antioxidativo na tolerância a seca em folhas de cana.

5.10- Proteoma diferencial e fosfoproteoma indicam que várias alterações do metabolismo de aminoácidos contribuem para a aclimação ou tolerância a seca

Análise da topologia do proteoma diferencial sugerem que as cultivares tolerante e sensível diferem entre si quanto a contribuição do metabolismo de aminoácidos. A topologia do proteoma diferencial do estresse moderado indica que o metabolismo da arginina e prolina é induzido apenas sob estresse moderado, e deixa de ocorrer sob estresse hídrico severo. Entretanto, sob esse estresse, a topologia do proteoma diferencial indica que o aumento do metabolismo de glicina, serina e treonina é específico para este nível de estresse e para a cultivar tolerante. Dados do metaboloma confirmam esta especificidade dos aminoácidos entre diferentes níveis disponibilidade hídrica. Entretanto, um aumento maior dos aminoácidos totais na tolerante sob estresse moderado (Figura 14), mostra ao mesmo tempo, a importância do metabolismo de aminoácidos para a tolerância a seca, e que mudanças nos níveis de proteínas desse metabolismo não explicam esse aumento dos aminoácidos sob estresse moderado. Esta hipótese é reforçada pelos dados de fosfoproteoma, que mostram que a maioria das modificações em fosforilação de proteínas desse metabolismo ocorre sob estresse severo, em proteínas sem diferenças no proteoma diferencial e na cultivar tolerante. Estes dados sugerem que a fosforilação em várias destas proteínas tem um efeito positivo na atividade enzimática das mesmas, mas exigem um estudo mais minucioso envolvendo identificação de fosforilação específica em diferentes proteínas e os seus efeitos isolados e combinados na expressão genica. Poucos estudos semelhantes foram feitos em plantas, destacando-se a Sintase da Sacarose-P (SPS), principalmente (Huber e Huber, 1996). Outras enzimas também estudadas referente a estes detalhes incluem a Sintase da Sacarose (SuSy) (Huber et al. 1996) e a Redutase do Nitrato (NR) (Bachmann et al. 1996). O fato de que maiores diferenças em aminoácidos totais, ou individuais (análise do metaboloma, Figura 22) ocorram sob estresse moderado na cultivar tolerante, ao passo que o aumento de vários aminoácidos ocorra sob estresse severo e no cultivar tolerante, sugere que o aumento destes compostos contribui para outros processos associados à tolerância, além do provável efeito positivo no ajuste osmótico (Raggi, 1994; Assem, 1983; Adnan et al., 2012). Um possível exemplo destes outros mecanismos seria o desvio da cisteína para a síntese de glutatona, e a contribuição do metabolismo da glicina e serina para a fotorespiração, que mesmo que seja baixa em plantas C4, ainda pode ter um papel aliviador do excesso de poder redutor

(Carmo-Silva et al., 2008). Estes aumentos em proteínas e aminoácidos podem, por sua vez, explicar porque detectamos aumento no proteoma diferencial, fosfoproteoma e metaboloma de genes ligados à respiração. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos derivam de intermediários respiratórios, indicando que haveria maior demanda respiratória para suportar este aumento do metabolismo de aminoácidos.

5.11- Redox proteoma sugere maior oxidação de proteínas fotossintéticas sob estresse hídrico moderado

Foi no cultivar tolerante que a maior parte das proteínas detectadas como carboniladas foram encontradas (Tabela 5). Entre as classes de genes, observamos que a maior parte destas formas de oxidações proteicas ocorrem em proteínas fotossintéticas. Notável é a descoberta de 5 isoformas de Carboxilase do Fosfoenolpiruvato (PEPC1) oxidadas exclusivamente na cultivar tolerante.

Uma vez que a oxidação pode influenciar na atividade das proteínas (Zhang, 2010), a oxidação de PEPC pode explicar em parte os maiores valores Φ e consequentemente maior discriminação isotópica do C^{13} na cultivar tolerante. Como Φ depende do vazamento de CO_2 pelas células da bainha e/ou do desbalanço nas atividades das enzimas carboxilativas (PEPC e RUBISCO), a diminuição da atividade de PEPC poderia favorecer a atuação direta da enzima RUBISCO (maior afinidade por C^{12}) na atividade carboxilativa levando uma maior discriminação de C^{13} . Corroborando com esta ideia, mutantes com redução da atividade de PEPC (3%) tiveram redução da fotossíntese (10%) e aumento da discriminação isotópica (80%) quando comparados a plantas selvagens (Cousins et al. 2007).

No proteoma diferencial e no fosfoproteoma não se observaram aumentos sob estresse moderado para PEPC. Estes dados em conjunto mostram um importante efeito do estresse hídrico na cultivar tolerante. Seria interessante observar em outras variedades de cana tolerante a seca, se haveria a ausência deste fato, e se as mesmas seriam mais produtivas sob estresse. Como a herança da tolerância a seca é multigênica, a presença de múltiplos mecanismos possibilitariam em última instância a tolerância. Se caso esta modificação na PEPC fosse verificada como negativa para a tolerância, poderia-se piramidar a tolerância a seca selecionando-se para progênes da cultivar RB 867515 com ausência desta maior oxidação da carboxilase do fosfoenolpiruvato.

5.12- Dados do metaboloma suportam a hipótese da importância do aumento da respiração e da síntese de aminoácidos em folhas para a tolerância a seca em cana.

Os dados de metaboloma confirmam alguns dados obtidos com medições enzimáticas de alguns metabólitos. Em ambos os genótipos ocorre uma redução nos teores de sacarose. Nos dados do perfil metabólico podemos ver que a redução no teor de sacarose é progressiva com o nível de estresse. Isto já foi mostrado em outros estudos, e tem sido atribuído a inibição da síntese de sacarose, associado a menor demanda da mesma, devido a redução do crescimento. Alternativamente, pode ser resultante do aumento da atividade da invertase. Alguns autores observaram que ABA pode induzir a síntese de Invertase (Pinheiro et al., 2001; Trouverie et al., 2003). Entretanto, o nível de ABA foi maior na cultivar tolerante sob estresse hídrico severo, mas os menores níveis de sacarose foram semelhantes entre as cultivares.

A importância da invertase pode ser inferida devido ao fato de que ocorreu simultâneo decréscimo de sacarose e aumento do teor de glicose. Entretanto o teor de glicose foi maior na cultivar tolerante. Sabe-se que o aumento do teor de glicose na célula gera um sinal, mediado ou não pela hexokinase, com um papel do ABA, em promover a respiração, e inibir a transcrição de genes fotossintéticos (Reddy et al., 2004). Entretanto, observou-se que a cultivar tolerante, mesmo tendo maiores níveis de glicose, teve maiores teores de várias proteínas fotossintéticas. Uma possibilidade seria que a tolerância poderia ser associada à presença de um mecanismo deste sinal negativo na fotossíntese. Embora a seca aumente os teores de glicose, diminui os teores de piruvato. Vários aminoácidos são derivados do 3PGA (serina, glicina ou cisteína), do PEP (fenilalanina), ou do piruvato (valina, leucina e alanina), cujos níveis aumentaram sob estresse. O fato de que maiores teores de isocitrato e malato (só sob estresse moderado) ocorreram no cultivar tolerante, pode ser devido a maior disponibilidade de glicose neste cultivar para alimentar esta demanda, explicando porque houve maiores níveis de lisina, treonina, isoleucina neste cultivar, bem como serina, glicina. Em nenhum dado metabolômico podemos ver níveis maiores de um aminoácido na cultivar sensível sob estresse.

A principal hipótese para este aumento de aminoácidos seria sua contribuição em reduzir a desidratação celular através do ajuste osmótico. A cultivar tolerante apresentou menor desidratação foliar sob estresse moderado.

6- CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados indicam que ocorrem respostas diferenciais entre as cultivares estudadas quando submetidas ao déficit hídrico.

Assim, a cultivar RB 867515 apresentou menor desidratação foliar e maior massa seca dos colmos sob estresse severo confirmando sua classificação prévia como uma cultivar tolerante. Dados morfológicos de raiz suportam a maior tolerância baseados não em aumento de volume e massa radicular, bem como não pode ser associado a maior razão raiz/parte aérea, mas sim devido a uma arquitetura de raízes mais finas e com maior área superficial e aprofundamento no solo. Arelado a estes fatores há uma maior exposição das folhas da cultivar tolerante a radiação luminosa devido a postergação do enrolamento foliar.

Parâmetros trocas gasosas e fluorescência da clorofila a não foram determinantes para explicar a maior tolerância principalmente devido a não diferenças entre as cultivares nos valores de A e gs. De forma oposta, os valores de Ci/Ca, discriminação isotópica, Fv/Fm indicaram maior susceptibilidade da cultivar tolerante a danos celulares, principalmente a nível de proteínas.

Com a análise do perfil protéico foi possível identificar proteínas com aumento de abundância nas cultivares e relacionar suas funções com diferentes mecanismos de resposta. Neste contexto, proteínas ligadas ao mecanismo antioxidativo não enzimático mostraram-se mais presentes na cultivar tolerante, ao passo que proteínas relacionadas ao reparo foram presentes na cultivar sensível sob estresse moderado. Já sob estresse mais severo, tanto dados de proteômica quanto fosfoproteômica, indicaram maior indução da glicólise, da fotossíntese e do mecanismo antioxidativo enzimático na cultivar tolerante. Cumpre mencionar que a análise do redoxproteoma não permitiu inferências precisas sobre a tolerância à seca sendo que a maior parte de proteínas com carbonilação foram detectadas no genótipo tolerante.

Os resultados de metabólitos indicaram maiores acúmulos de aminoácidos e açúcares na cultivar tolerante e isso pode estar relacionado a um ajuste osmótico que explicaria maiores teores relativos de água nessa cultivar. Além do mais, maiores níveis foliares de ABA não determinaram diferenças entre as cultivares sob estresse severo no que diz respeito aos valores de gs, mas podem explicar maior abundância de aminoácidos e açúcares, além da indução da atividade de enzimas antioxidativas na cultivar tolerante.

Por fim, este estudo oferece um bom exemplo para ilustrar a natureza poligênica da tolerância ao déficit hídrico, bem como a importância do uso de abordagens sistêmicas para complementar as medidas pontuais, a fim de compreender melhor o mecanismo de resposta das plantas ao déficit hídrico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal GK, Thelen JJ. A High-Resolution Two Dimensional Gel- and Pro-Q DPS-Based Proteomics Workflow for Phosphoprotein Identification and Quantitative Profiling. Marjo de Graauw (ed.), Phospho-Proteomics, Methods and Protocols, v. 527, 2009.
- Ainsworth EA, Rogers A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell and Environment* 30: 258–270, 2007.
- Annicchiarico, P. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favorable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Research* 102: 51 - 59, 2007.
- Arbona V, Manzi M, Ollas C, Gómez-Cadenas A. Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci.* 14(3): 4885–4911, 2013.
- Aryal UK, Krochko JE, Ross AR. Identification of phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* leaves using polyethylene glycol fractionation, immobilized metal-ion affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2012.
- Assem H , Hanke W. The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish—I. Changes in the euryhaline *Sarotherodon mossambicus* *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 74(3):531–536, 1983.
- Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BC, Harmon AC, Huber SC. Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *The Plant Cell.* 8:505-517, 1996.
- Bano A, FA Ullah. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil Environ* 4: 181–185, 2012.
- Banon S, Ochoa J, Franco JA, Alarcon JJ, Fernandez T, Sanchez-Blanco MJ. The influence of acclimation treatments on the morphology, water relations and survival of *Myrtus communis*L. plants. *Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semiarid Regions* 275-277, 2002.

- Banon S, Ochoa J, Franco JA, Alarcon JJ, Sanchez-Blanco MJ. Hardening of oleander seedlings by deficit irrigation and low air humidity. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 36-43, 2006.
- Barbosa MHP, Silveira LCI, Oliveira MW, Souza VFM, Ribeiro SNN. RB867515 Sugarcane cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 1(4) 437-438, 2001.
- Bernoux M, Cerri CC, Neil C, Moraes JFL. The use of stable isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. *Geoderma* 82: 43 - 58, 1998.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman W, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 25(8): 1091–1093, 2009.
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Praveen VK, Chattopadhyay D. Long term transcript accumulation during development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology* 135: 1608–1620, 2004.
- Boyer JS. Differing sensitivity of photosynthesis to low water potential in corn and soybean. *Plant Physiology* 46:226-239, 1970.
- Bowman WD, Hubick KT, von Caemmerer S, Farquhar GD. (1989) Short-term changes in leaf carbon isotope discrimination in salt- and water-stressed C4 grasses. *Plant Physiology*, 90:162–166.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Brix H. The effect of water stress on the rates of photosynthesis and respiration in tomato plants and loblolly pine seedlings. *Physiologia Plantarum* 15:10-20, 1962.
- Brown PS, Knievel DP, Pell EJ. (1995) Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities in mesophyll and bundle sheath cells of maize. *Physiologia Plantarum* 95: 274–280.
- Cabido M, Pons E, Cantero JJ, Lewis JP, Anton A (2008) Photosynthetic pathway variation among C4 grasses along a precipitation gradient in Argentina. *Journal of Biogeography*, 35:131–140
- Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermler B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY. Evaluation of DNA microarray results with

- quantitative gene expression platforms. *National Biotechnology* 24:1115–1122, 2006.
- Carmo-Silva AE, Power SJ, Keys A, Arrabaça MC, Parry MAJ. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions *Plant, Cell and Environment* 31: 925–940, 2008.
- Carvalho, MHC. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior* 3:3 156-165, 2008.
- Caverzan A. Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos. Rio Grande do Sul, UFRGS, 200 xxpp (Dissertação de mestrado).
- Clayton WD, Daniels CA. Geographical, historical and cultural aspect of origin of the Indian and Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinensis*. *ISSCT Sug. Breed. Newslater* 36: 4-23, 1975.
- Cousins AB, Baroli I, BadgeMR, Ivakov A, Lea PJ., Leegood RC, Von Caemmerer S. The Role of Phosphoenolpyruvate Carboxylase during C4 Photosynthetic Isotope Exchange and Stomatal Conductance. *Plant Physiology* 145:1006–1017, 2007.
- Cox J, Mann M. Is Proteomics the New Genomics? *Cell* 130(3): 395-398, 2007.
- Cornic G, Fresneau C. (2002) Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during mild drought. *Annals of Botany* 89:887–894
- Creelman RA, Muller JE. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9:1211-231997)
- Da Matta FM, Chaves ARM, Pinheiro HA, Cucatti C, Loureiro ME. Drought tolerance of two Field-grown clones of *coffea canephora*. *Plant Science* 164: 111-117, 2003.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cel Molec Life Sci*, 57:779-95, 2000.
- Deeba F, Pandey AK, Ranjan S, Mishra A, Singh R, Sharma YK, Shirke PA, Pandey V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiol Biochem* 53:6-18, 2012.

- Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp Bot* 50:1863-6, 1999.
- Dietz KJ. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal*. 15(4):1129-59, 2011.
- Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landel MGA. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agronômico, p.192, 2008.
- Downes RW. Differences in transpiration rates between tropical and temperate grasses under controlled conditions. *Planta* 88:261-273, 1969.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 8437 - 8442, 2005.
- Edwards EJ, Smith SA Phylogenetic analyses reveal the shady history of C₄ grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2532-2537, 2010.
- Edwards EJ, Still CJ Climate, phylogeny and the ecological distribution of C₄ grasses. *Ecology Letters* 11: 266-276, 2008.
- Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂ and climate. *Oecologia* 112: 285-299. Ellis RP, Vogel JC, Fuls A. 1980. Photosynthetic pathways and the geographic distribution of grasses in South Africa/Namibia. *South African Journal of Science* 76: 307-314, 1997.
- Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan LB, Pearcy RW. Climate change and the evolution of C₄ photosynthesis. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 95-99, 1991.
- Engelsberger WR, Schulze WX. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 69(6):978-95, 2012.
- Farquhar GD. On the Nature of Carbon Isotope Discrimination in C₄ Species. *Aust. J. Plant Physiol* 10: 205-26, 1983.
- Fedorova M, Kuleva N, Hoffmann R. Identification, Quantification, and Functional Aspects of Skeletal Muscle Protein-Carbonylation in Vivo during Acute Oxidative Stress. *Journal of Proteome Research* 9: 2516-2526, 2010.
- Flexas J, Galmes J, Ribas-Carbo M, Medrano H. Advances in Photosynthesis and Respiration. The Effects of Water Stress on Plant Respiration 18: 85-94, 2005.

- Flexas J, Bota J, Galme's J, Medrano H, Ribas-Carbo M Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127: 343–352, 2006.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell Environ.* 30(10): 1284-1298, 2007.
- Franco JA, Arreola J, Vicente MJ, Martinez-Sanchez JJ. Nursery irrigation regimes affect the seedling characteristics of *Silene vulgaris* as they relate to potential performance following transplanting into semi-arid conditions. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83: 15-22, 2008.
- Gao JJ, Agrawal GK, Thelen JJ and Xu D. P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucleic Acids Res* 37: 960, 2009.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92, 1989.
- Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309–314, 1977.
- Giraud E, Ho LHM, Clifton R, The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* 147: 595 – 610, 2008.
- Gomes Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratao PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65:1330-1337, 2006.
- Ghannoum O, von Caemmerer S, Conroy JP The effect of drought on plant water use efficiency of nine NAD-ME and nine NADP-ME Australian C4 grasses. *Functional Plant Biology* 29: 1337–1348, 2002.
- Guan KL, Xiong Y. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochemistry. Sci.* 36: 108 – 116, 2011.
- Hatch MD C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultra structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 895: 81–106, 1987.
- Hattenbach A, Heineke D. On the role of chloroplastic phosphoglucomutase in the regulation of starch turnover. *Planta* February 207(4) 527-532, 1999.

- Haupt-Herting S, Fock HP Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. *Annals of Botany* 89: 851–859, 2002.
- Havelund JF, Thelen JJ, Møller M. Biochemistry, proteomics, and phosphoproteomics of plant mitochondria from non-photosynthetic cells. *Front Plant Science* 4: 51, 2013.
- Havir EA, McHale NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455, 1987.
- Hendrikson L, Furbank RT, Chow WS. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 82: 73-81, 2004.
- Hoffmann HP. Variedades RB de cana-de-açúcar, *Boletim Técnico*, 2008.
- Huber SC. Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochem Soc Trans.* 2007 Feb;35(Pt 1):28-32. Review.PubMed PMID: 17212583.
- Huber SC, Huber JL. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431-444, 1996.
- Huber SC, Huber JL, Liao PC, Gage DA, McMichael RW Jr, Chourey PS, Hannah LC, Koch K. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant Physiol.* 112(2):793-802, 1996.
- Huck MG, Ishihara K, Peterson CM, Ushijima T. Soybean adaptation to water stress at selected stages of growth. *Plant Physiology* 73: 422 – 427, 1983.
- Inman-Bamber NG, De Jager JM. The reaction of two varieties of sugarcane to water stress. *Field Crops Research* 14:15-28, 1986.
- Inman-Bamber NG, Smith, DM. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research* 92:.2-3 185–202, 2005.
- Jamaux I, Steinmetz A, Belhassen E. Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. *New Phytologist*, 137:117-127, 1997.
- Jiang MY, Zhang JH. Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research* 36: 1001–1015, 2002.
- Johansson E, Olsson O, Nystrom T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 22204–22208, 2004.

- Juszczuk IM, Flexas J, Szal B, Dabrowska Z, Ribas-Carbo M, Rychter AM. Effect of mitochondrial genome rearrangement on respiratory activity, photosynthesis, photorespiration and energy status of MSC16 cucumber (*Cucumis sativus*) mutant. *Physiologia Plantarum* 131: 527 – 541, 2007.
- Kalapos T, van den Boogaard R, Lambers H Effect of soil drying on growth, biomass allocation and leaf gas exchange of two annual grass species. *Plant and Soil* 185: 137–149, 1996.
- Ke Y, Han G, He H, Li J. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Co.* 379: 133 - 138, 2009.
- Koc EC, Koc H. Regulation of mammalian mitochondrial translation by post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 1055 – 1066, 2012.
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* 79(2):209-218, 2004.
- Lal A, Edwards GE. Analysis of inhibition of photosynthesis under water stress in the C4 species *Amaranthus cruentus* and *Zea mays*: electron transport, CO₂ fixation and carboxylation capacity. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 403–412, 1996.
- Landell MGA, Alvarez R. Cana de açúcar. *Melhoramento de plantas (IAC)*. 77-93, 1993.
- Larcher W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA, p 53, 2000.
- Lawlor DW, Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275–294., 2002
- Lawlor DW. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 871–885, 2002.
- Leakey ADB, Bernacchi CJ, Dohleman FG, Ort DR, Long SP. Will photosynthesis of maize (*Zea mays*) in the US Corn Belt increase in future [CO₂] rich atmosphere? An analysis of diurnal courses of CO₂ uptake under free-air concentration enrichment. *Global Change Biology* 10: 951–962, 2004.
- Levine RL Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1990.

- Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 36,1495–1502, 2001.
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382. 1987.
- Lloyd J, Farquhar GD 13C discrimination during CO₂ assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99: 201–215, 1994.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387 - 396, 2006.
- Liu F, Anderson MN, Jacobson SE, Jensen CR. Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environmental Experimental Botany* 54: 33 – 40, 2005.
- Long SP Environmental responses. In *C4 Plant Biology* (eds R.F. Sage & R.K. Monson) pp. 215–249. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1999.
- Ludlow, M.M., Santamaria, J.M. and Fukai, S. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) moench under water-limited conditions. II. Water deficit after anthesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41, 67-78,1990.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran L-SP, Nguyen HT. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260 – 1276, 2009.
- Mesquita RO, de Almeida Soares E, de Barros EG, Loureiro ME. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins. *Genet Mol Biol.* 35(1):353-61, 2012.
- Meinzer FC, Plaut Z, Saliendra NZ. Carbon Isotope Discrimination, Gas Exchange, and Growth of Sugarcane Cultivars under Salinity *Plant Physiol.* 104: 521-526, 1994.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*; 7:405-10, 2002.
- Morgan, J.M. Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Research*, 40, 143-152,1995.

- Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, Tomita M, Ishihama Y, Shirasu K. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* 153(3):1161-74, 2010.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867–880, 1981.
- Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:249-79, 1998.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50: 1093 – 1106, 2007.
- Nystron T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal.* 24:1311–1317, 2005.
- Osborne CP, Freckleton RP Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 276: 1753– 1760, 2009.
- Osmond CB, Winter K, Ziegler H. Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis. In *Encyclopedia of Plant Physiology* pp. 479–547, 1982
- O'Toole JC, Cruz, R. T. Response of Leaf Water Potential, Stomatal Resistance, and Leaf Rolling to Water Stress *Plant Physiology* 65(3) 428-432, 1980.
- Padilha FM, Pugnaire FI. Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology* 21: 489 - 495, 2007.
- Paruelo JM, Lauenroth KW. Relative abundance of plant functional types in grasslands and shrublands of North America. *Ecological Applications* 6: 1212–1224, 1996
- Pearcy RW, Ehleringer J. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. *Plant, Cell and Environment* 7: 1–13, 1984.
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature.*406:731-4, 2000.
- Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *J. Exp. Bot.* 52:1063–1070. 2001..

- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. Reactive Oxygen Species Signaling in plants. Antioxidants & Redox signaling. 8:9-10, 2006.
- Radin JW, Hartung W, Kimball BA, Mauney JR. Correlation of Stomatal Conductance with Photosynthetic Capacity of Cotton Only in a CO₂-Enriched Atmosphere: Mediation by Abscisic Acid? *Plant Physiol.* 88(4): 1058–1062, 1988.
- Raghavendra AS, Padmasree K. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Science* 8: 546 – 553, 2003.
- Raggi, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. *Physiologia Plantarum*, 91: 427–434, 1994.
- Ramesh P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *Journal of Agronomy & Crop Science* (185):83-89, 2000.
- Read DJ, Bartlett EM. The physiology of drought resistance in soybean plant (*Glycine max*). I. The relationship between drought resistance and growth. *Journal of Applied Ecology* 9: 487 – 489, 1972.
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W, Baginsky S. Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol.* 150(2):889-903, 2009.
- Reddy AR, Chaitanyaa KV, Vivekanandanb M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161:1189–1202, 2004.
- RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba: RIDESA, 136 p, 2010.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59(14):3781–3801, 2008.
- Ripley BS, Gilbert ME, Ibrahim DG, Osborne CP Drought constraints on C₄ photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C₃ and C₄ subspecies of *Alloteropsis semialata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1351–1363, 2007.

- Rodrigues FA, Laia ML, Zingaretti SM. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176:286-302, 2009.
- Rose CM, Venkateshwaran M, Volkening JD, Grimsrud PA, Maeda J, Bailey DJ, Park K, Howes-Podoll M, den Os D, Yeun LH, Westphall MS, Sussman MR, Ané JM, Coon JJ. Rapid phosphoproteomic and transcriptomic changes in the rhizobia-legume symbiosis. *Mol Cell Proteomics* 11(9):724-44, 2012.
- Sage RF. The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341–370.
- Saliendra NZ, Meinzer FC, Perry M, Thom M (1996) Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO₂, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 47: 907–914, 2004.
- Santamaria, J.M., Ludlow, M.M. and Fukai, S. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) moench under water-limited conditions. I. Water deficit before anthesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41, 51-65, 1990.
- Sayer MAS, Brissette JC. , Barnett JP. Root growth and hydraulic conductivity of southern pine seedlings in response to soil temperature and water availability after planting. 30(2-3) 253-272, 2005.
- Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *Embo J*. 12(11):4137-44, 1993.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 13(11):2498-504, 2003.
- Shikanai T. Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol*. 58:199-217, 2007.
- Silva DM. Metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo. 117p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG., 1998.

- Silva VP. Caracterização fisiológica da tolerância a seca em *Coffea canefora*: contribuição relativa do sistema radicular e parte aérea. Viçosa, UFV, 57pp (Tese de doutorado). 2007
- Shen S, Matsubae M, Takao T, Tanaka N, Komatsu SA. Proteomics analysis of leaf sheath from rice. *J. Biochem*, 132:613-620, 2002.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature* 1: 2856 - 2860, 2006.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227, 2007.
- Smit MA, Singels A. The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field Crops Res* 98: 91-7, 2006.
- Sofo A , Cicco N, Paraggio M, Scopa A. Regulation of the Ascorbate–Glutathione Cycle in Plants Under Drought Stress. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* 137-189, 2010
- Sreenivasulu N, Harshavardhan VT, Govind G, Seiler C, Kohli, A. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506: 265 – 273, 2012.
- Stasovski E, Peterson CA. The effects of drought and subsequent rehydration on the structure, vitality and permeability of *Allium cepa* L. adventitious roots. *Canadian Journal of Botany* 71: 700-707,1993.
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol.* 4:193, 2008
- Tardieu F, Simonneau T Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49:419-432, 1998.
- Taub DR Climate and the U.S. distribution of C4 grass subfamilies and decarboxylation variants of C4 photosynthesis. *American Journal of Botany* 87: 1211–1215, 2000.
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *J Mol Evol* 59(6):761-70, 2004.

- Tipple BJ, Pagani M. The early origins of terrestrial C4 photosynthesis. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 35: 435–461. 2007.
- Trouverie J, The'venot C, Rocher JP, Sotta B, Priou JL. The role of abscisic acid in the response of a speciWc vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf, *J. Exp. Bot.* 54: 2177–2186. 2003.
- Unica. União da Indústria da Cana-de-Açúcar, outubro 2011. Disponível na internet em <http://www.unica.com.br>. Acesso em 20 de outubro, 2013
- Van Dillewijn DC. *Botany of sugarcane*. Mass Waltham, 1952.
- Van Dillewijn C. *Botany of sugarcane*. Walthaman, Masss., USA. The Chronica Botanica co. Book Departament. 371p. 1957.
- Van Kooten O, Snel JFH. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25(3): 147-150, 1990.
- Vasconcelos ACM, Prado H, Landell MGA. Desenvolvimento de sistema radicular de cana-de-açúcar e características físico-hídricas e químicas dos ambientes de produção. Relatório de pesquisa, 2004.
- Verslues PE, Zhu JK. Before and beyond ABA: Upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem Soc Trans;* 33:375-9, 2005.
- Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Arruda P. The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.* 24: 1-4, 2001.
- von Caemmerer S, Furbank RT Modeling C4 photosynthesis. In *C4 Plant Biology* (eds R.F. Sage & R.K. Monson), pp. 173–211. Academic Press, Toronto, ON, Canada, 1999.
- Vranova E, Inzé D, Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot.* 53:1227-36, 2002.
- Williams DG, Gempko V, Fravolini A, Leavitt SW, Wall GW, Kimball BA, et al. Carbon isotope discrimination by *Sorghum bicolor* under CO₂ enrichment and drought. *New Phytologist* 150: 285–293., 2001.
- Wu X, Hasan MA, Chen JY. Pathway and network analysis in proteomics. *J Theor Biol.* 2014.
- Yao Q, Ge H, Wu S, Zhang N, Chen W, Xu C, Gao J, Thelen JJ, Xu D. P³DB 3.0: From plant phosphorylation sites to protein networks. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D1206-D1213, 2013.

- Ye N, Zhu G, Liu Y, Li Y, Zhang J. ABA controls H₂O₂ accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. *Plant Cell Physiol.* 52(4):689-98, 2011.
- Yemm EW, Cocking AC. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80:209-214, 1955.
- Zadraznik T, Hollung K, Egge-Jacobsen W, Meglic V, Sustar-Vozlic J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of commonbean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Proteomics* 78:254-72, 2013.
- Zhang M, Lv D, Ge P, Bian Y, Chen G, Zhu G, Li X, Yan Y. Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteomics* 109:290-308, 2014.
- Zhang X. Regulation of Protein Function by Residue Oxidation. *Proteomics Insights* 3: 17-24, 2010.
- Zivcak M, Brestic M, Balatova Z, Drevenakova P, Olsovska K, Kalaji HM, Yang X, Allakhverdiev SI. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynth Res.* 117(1-3):529-46, 2013.

8- MATERIAL SUPLEMENTAR

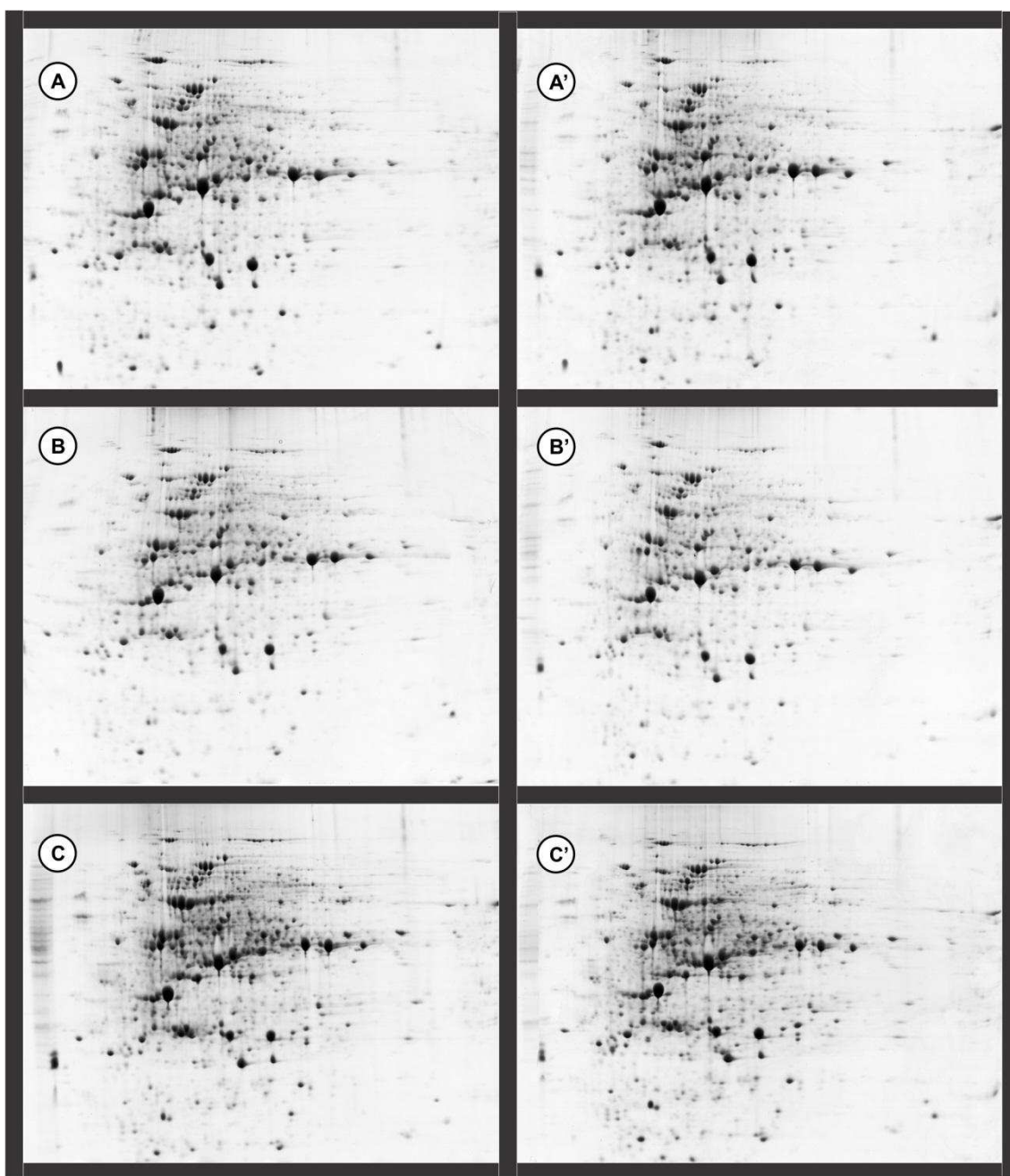


Figura 1 – Proteoma diferencial de folhas de cana-de-açúcar das cultivares RB 867515 (Tolerante) e RB 85536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. A, B, C- RB 867515 controle, -0,5MPa e -1MPa respectivamente; A', B', C'- RB 85536 controle, -0,5MPa e -1MPa respectivamente)

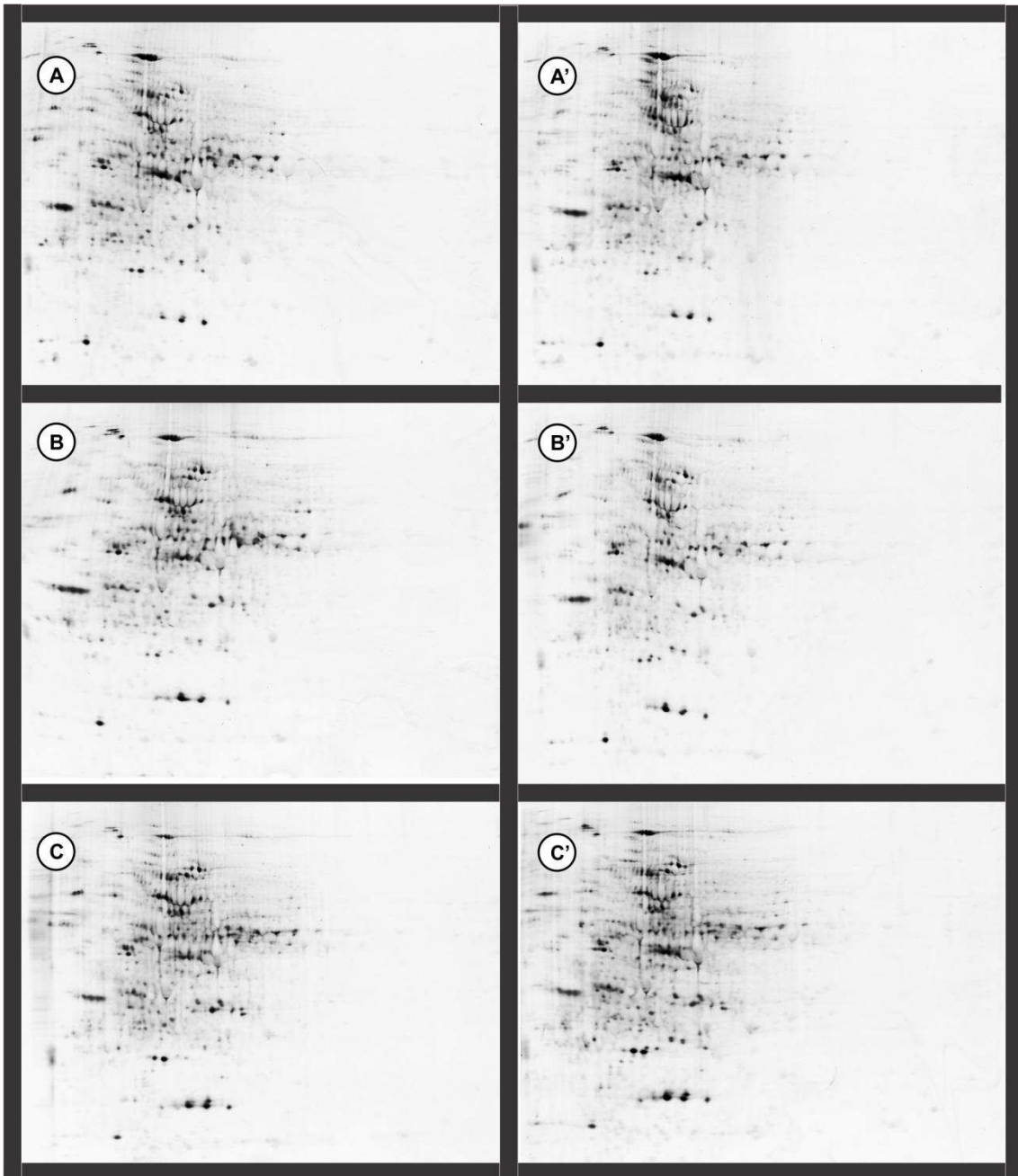


Figura 2 – Fosfoproteoma de folhas de cana-de-açúcar das cultivares RB 867515 (Tolerante) e RB 85536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. A, B, C- RB 867515 controle , -0,5MPa e -1MPa respectivamente; A', B', C'- RB 85536 controle , -0,5MPa e -1MPa respectivamente)

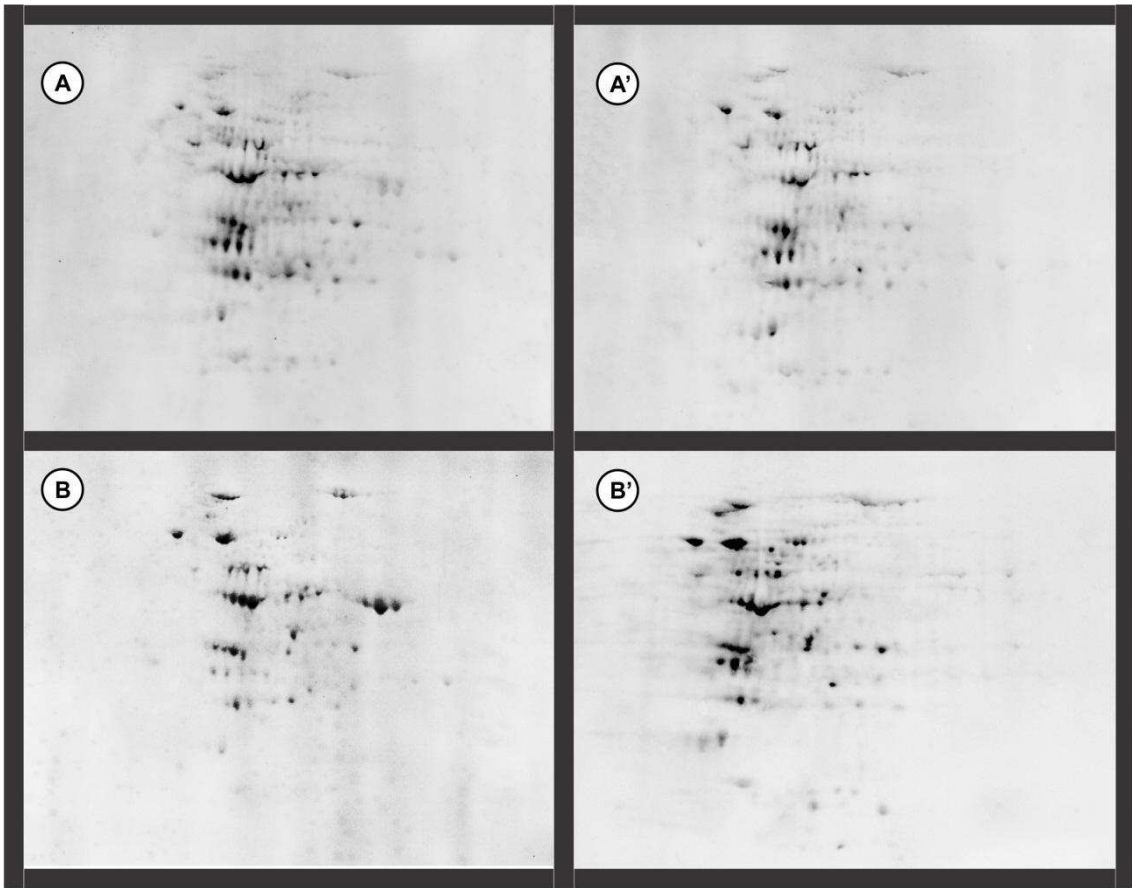


Figura 3 – Redoxproteoma de folhas de cana-de-açúcar das cultivares RB 867515 (Tolerante) e RB 85536 (Sensível) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. A, B- RB 867515 controle e -0,5MPa respectivamente; A', B'- RB 85536 controle e -0,5MPa respectivamente).

Tabela 1. Resultados da análise Cytoscape-ClueGo. Processos biológicos e respectivas proteínas com aumento da abundância no estresse moderado (-0,5MPa) em folhas de cana-de-açúcar da cultivar RB 867515 (Tolerante) e da cultivar RB 855536 (sensível) identificadas por espectrometria de massas.

GO Term	GO Groups	Protein	Sublocation
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*	[Group0]	UDP-sugar pyrophosphorylase	cytoplasmic
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group0]	UDP-sugar pyrophosphorylase	cytoplasmic
Galactose metabolism	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Pentose and glucuronate interconversions	[Group0]	UDP-sugar pyrophosphorylase	cytoplasmic
Pentose phosphate pathway	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group1]	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	mitochondrial
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group1]	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	mitochondrial
Propanoate metabolism	[Group1]	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	mitochondrial
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2]	Malic enzyme	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2]	Pyruvate phosphate dikinase 1	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
glycolytic process	[Group2]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
malate metabolic process	[Group2]	Malic enzyme	chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group2]	Malic enzyme	chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group2]	Pyruvate phosphate dikinase 1	chloroplast
Response to light stimulus	[Group2]	Pyruvate phosphate dikinase 1	chloroplast
Starch biosynthetic process	[Group2]	Pyruvate phosphate dikinase 1	chloroplast
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group3]	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)	chloroplast
Arginine and proline metabolism*	[Group3]	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)	chloroplast
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	[Group3]	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)	chloroplast
Nitrogen metabolism	[Group3]	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)	chloroplast
Cysteine and methionine metabolism*	[None]	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	mitochondrial chloroplast
Cysteine and methionine metabolism*	[None]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast
Glutathione metabolism*	[None]	Glutathione reductase	cytoplasmic
Phenylalanine metabolism*	[None]	Phenylalanine ammonia-lyase	cytoplasmic
Ribosome biogenesis in eukaryotes*	[None]	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (Ras-related nuclear protein 3)	nuclear
RNA degradation*	[None]	(chaperonin 60 beta) (RuBisCo subunit binding-protein beta subunit)	chloroplast
Terpenoid backbone biosynthesis*	[None]	(undecaprenyl pyrophosphate synthetase)	chloroplast
ubiquitin-dependent protein catabolic process*	[None]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic

GO term, classificação ontológica de cada proteína; GO Groups, agrupamento das proteínas baseado na sua ontologia (mostrados em diferentes cores nas figuras de topologia). Em asterisco, os processos mais enriquecidos de cada grupo.

Tabela 2. Resultados da análise Cytoscape-ClueGo. Processos biológicos e respectivas proteínas com aumento da abundância no estresse severo (-1MPa) em folhas de cana-de-açúcar da cultivar RB 867515 (Tolerante) e da cultivar RB 855536 (sensível) identificadas por espectrometria de massas.

GOTerm	GOGroups	Name	Sublocation
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
organonitrogen compound metabolic process*	[Group0, Group1, Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
cellular amino acid metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
cellular amino acid metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
cellular amino acid metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
cellular amino acid metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
coenzyme metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
coenzyme metabolic process	[Group0, Group1, Group6, Group8]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
folic acid-containing compound biosynthetic process	[Group0, Group1, Group6]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
One carbon pool by folate*	[Group0, Group1, Group6]	Aminomethyltransferase	mitochondrial
One carbon pool by folate*	[Group0, Group1, Group6]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
One carbon pool by folate*	[Group0, Group1, Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
cellular respiration	[Group0, Group1, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
cellular respiration	[Group0, Group1, Group8]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
cellular respiration	[Group0, Group1, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	ferredoxin sulfite reductase	chloroplast
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	formate--tetrahydrofolate ligase	chloroplast
small molecule metabolic process*	[Group0, Group1, Group8]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
small molecule metabolic process	[Group0, Group1, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Aminomethyltransferase	mitochondrial
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast

generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Fructose-bisphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	Monodehydroascorbate reductase	chloroplast proxisomal
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	cytochrome b5 reductase	mitochondrial
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	ferredoxin sulfite reductase	chloroplast
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
generation of precursor metabolites and energy	[Group0, Group1]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
Pentose phosphate pathway*	[Group0, Group2, Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
Pentose phosphate pathway*	[Group0, Group2, Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast
Pentose phosphate pathway*	[Group0, Group2, Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial
Pentose phosphate pathway*	[Group0, Group2, Group3]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
Pentose phosphate pathway*	[Group0, Group2, Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	alanine aminotransferase	chloroplast proxisomal
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	cytoplasmic
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	Fructokinase-1 (Fructokinase I) (FKI)	cytoplasmic plasma
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	sorbitol dehydrogenase	cytoplasmic
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Fructose and mannose metabolism	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Enolase(2-phosphoglycerate dehydratase) (E1)	mitochondrial chloroplast
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Fructose-bisphosphate aldolase	cytoplasmic mitochondrial
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	enolase	mitochondrial
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2 (PDHE1-A)	mitochondrial
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group2]	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	cytoplasmic
Galactose metabolism	[Group0, Group3, Group5]	Phosphoglucomutase	chloroplast
nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic

nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic
nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
nucleobase-containing small molecule metabolic process	[Group0, Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
glucose metabolic process	[Group0, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
glucose metabolic process	[Group0, Group8]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
nucleotide metabolic process	[Group0, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
nucleotide metabolic process	[Group0, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
nucleotide metabolic process	[Group0, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
nucleotide metabolic process	[Group0, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
pentose-phosphate shunt	[Group0, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Aminomethyltransferase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Fructose-bisphosphate aldolase	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Monodehydroascorbate reductase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	cytochrome b5 reductase	proxisomal
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	ferredoxin sulfite reductase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	vacuolar
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	NADH dehydrogenase	cytoplasmic
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	formate--tetrahydrofolate ligase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
single-organism metabolic process	[Group0, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Fructose-bisphosphate aldolase	chloroplast
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Phosphoglucomutase	cytoplasmic
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	beta-1,3-glucanase	chloroplast
carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	extracellular
cellular carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	chloroplast
cellular carbohydrate metabolic process	[Group0, Group9]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase	chloroplast

1)

organic substance catabolic process	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
organic substance catabolic process	[Group0]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial
organic substance catabolic process	[Group0]	Fructose-bisphosphate aldolase	chloroplast
organic substance catabolic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
organic substance catabolic process	[Group0]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	mitochondrial
organic substance catabolic process	[Group0]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Fructose-bisphosphate aldolase	chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	cytoplasmic
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	mitochondrial
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	cytoplasmic
Cyanoamino acid metabolism	[Group1, Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
glycine metabolic process	[Group1, Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
L-serine metabolic process	[Group1, Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
Cysteine and methionine metabolism	[Group1, Group8]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast
Cysteine and methionine metabolism	[Group1, Group8]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Cysteine and methionine metabolism	[Group1, Group8]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Cysteine and methionine metabolism	[Group1, Group8]	Methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi) (MTR-1-P isomerase)	mitochondrial
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	[Group1, Group8]	NADH dehydrogenase	chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group1, Group9]	Lactoylglutathione lyase (Aldoketomutase) (Allergen G1b33) (Glyoxalase I) (Glx I)	mitochondrial
Pyruvate metabolism	[Group1, Group9]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
Pyruvate metabolism	[Group1, Group9]	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2 (PDHE1-A)	mitochondrial
Pyruvate metabolism	[Group1, Group9]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
tricarboxylic acid cycle	[Group1, Group9]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
tricarboxylic acid cycle	[Group1, Group9]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic
alanine metabolic process	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group1]	alanine aminotransferase	chloroplast
Arginine and proline metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase	proximal chloroplast
Arginine and proline metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
aspartate metabolic process	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
one-carbon metabolic process	[Group1]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast
Phenylalanine metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Phenylalanine metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast

Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
Tyrosine metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Tyrosine metabolism	[Group1]	Aspartate aminotransferase (Transaminase A)	cytoplasmic
nitrate assimilation*	[Group10]	ferredoxin sulfite reductase	chloroplast
Sulfur metabolism	[Group10]	ferredoxin sulfite reductase	chloroplast
mRNA surveillance pathway	[Group11]	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	cytoplasmic nuclear
mRNA surveillance pathway	[Group11]	polyadenylate-binding protein	cytoplasmic
Ribosome biogenesis in eukaryotes*	[Group11]	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (Ran3)	nuclear
RNA degradation	[Group11]	Enolase(2-phosphoglycerate dehydratase) (E1)	mitochondrial chloroplast
RNA degradation	[Group11]	enolase	mitochondrial
RNA degradation	[Group11]	polyadenylate-binding protein	cytoplasmic
RNA transport	[Group11]	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	cytoplasmic nuclear
RNA transport	[Group11]	GTP-binding nuclear protein Ran-3 (Ran3)	nuclear
RNA transport	[Group11]	polyadenylate-binding protein	cytoplasmic
Inositol phosphate metabolism	[Group2]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Inositol phosphate metabolism	[Group2]	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	cytoplasmic
Purine metabolism	[Group3, Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
Purine metabolism	[Group3, Group5, Group8]	kinase, pfkB family	cytoplasmic
Purine metabolism	[Group3, Group5, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic
Purine metabolism	[Group3, Group5, Group8]	Phosphoglucomutase	chloroplast
Purine metabolism	[Group3, Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group3]	Fructokinase-1 (Fructokinase I) (FKI)	cytoplasmic plasma
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group3]	cytochrome b5 reductase	mitochondrial
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast
cell-matrix adhesion*	[Group4]	chlorophyll a/b-binding protein 3C	chloroplast
Photosynthesis	[Group4]	chlorophyll a/b-binding protein 3C	chloroplast
Caffeine metabolism	[Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
CTP biosynthetic process	[Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
nucleoside metabolic process	[Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
nucleoside metabolic process	[Group5, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
nucleoside metabolic process	[Group5, Group8]	adenine phosphoribosyl transferase	cytoplasmic
nucleoside metabolic process	[Group5, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
purine nucleobase metabolic process	[Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
purine-containing compound metabolic process	[Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
purine-containing compound metabolic process	[Group5, Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
purine-containing compound metabolic process	[Group5, Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
purine-containing compound metabolic process	[Group5, Group8]	Uricase (Urate oxidase)	proxisomal
UTP biosynthetic process	[Group5, Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
Glycine, serine and threonine metabolism*	[Group6]	Aminomethyltransferase	mitochondrial
Glycine, serine and threonine metabolism*	[Group6]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic
Glycine, serine and threonine metabolism*	[Group6]	alanine aminotransferase	chloroplast proxisomal
Glycine, serine and threonine metabolism*	[Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	[Group6]	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	[Group6]	alanine aminotransferase	chloroplast proxisomal

Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	[Group6]	Serine hydroxymethyltransferase	mitochondrial
protein targeting	[Group6]	Aminomethyltransferase	mitochondrial
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 2 (APx02)	cytoplasmic
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group7]	Monodehydroascorbate reductase	chloroplast
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 4 (APx04)	proximal plasma
Glutathione metabolism*	[Group7]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1 (G6PGH1)	chloroplast
Glutathione metabolism*	[Group7]	Glutathione reductase (GR)	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group7]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 2 (APx02)	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group7]	glutathione transferase III(B)	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group7]	L-ascorbate peroxidase 4 (APx04)	plasma
ATP synthesis coupled proton transport	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
energy coupled proton transmembrane transport, against electrochemical gradient	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
Nicotinate and nicotinamide metabolism	[Group8]	uridine nucleosidase 1 (Uridine ribohydrolase 1)	cytoplasmic
Oxidative phosphorylation	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
Oxidative phosphorylation	[Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
Oxidative phosphorylation	[Group8]	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	mitochondrial
Phagosome	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
purine ribonucleoside metabolic process	[Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
purine ribonucleoside metabolic process	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
purine ribonucleoside metabolic process	[Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	[Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	[Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
purine ribonucleotide metabolic process	[Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
purine ribonucleotide metabolic process	[Group8]	Vacuolar ATPase B subunit	vacuolar
purine ribonucleotide metabolic process	[Group8]	NADH dehydrogenase	mitochondrial
Pyrimidine metabolism	[Group8]	Nucleoside diphosphate kinase	cytoplasmic
Pyrimidine metabolism	[Group8]	uridine nucleosidase 1 (Uridine ribohydrolase 1)	cytoplasmic
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group9]	Aconitate hydratase	mitochondrial
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group9]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	chloroplast
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group9]	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2 (PDHE1-A)	cytoplasmic
Citrate cycle (TCA cycle)*	[Group9]	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	mitochondrial
Peroxisome	[Group9]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial
Peroxisome	[Group9]	stress responsive A/B Barrel domain containing protein	cytoplasmic
response to light stimulus	[Group9]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
starch biosynthetic process	[Group9]	Pyruvate phosphate dikinase 1, (PPDKB)(Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
Arachidonic acid metabolism*	[None]	family M1 containing protein (Putative leukotriene A-4 hydrolase)	cytoplasmic
Flavone and flavonol biosynthesis*	[None]	Flavone 3'-O-methyltransferase 1 (OMT1) (Quercetin 3'-O-methyltransferase 1)	cytoplasmic
Photosynthesis*	[None]	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	chloroplast
Photosynthesis*	[None]	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast

Terpenoid backbone biosynthesis*	[None]	undecaprenyl pyrophosphate synthetase	chloroplast
ubiquitin-dependent protein catabolic process*	[None]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic

GO term, classificação ontológica de cada proteína; GO Groups, agrupamento das proteínas baseado na sua ontologia (mostrados em diferentes cores nas figuras de topologia). Em asterisco, os processos mais enriquecidos de cada grupo.

Tabela 3. Resultados da análise Cytoscape-ClueGo. Processos biológicos e respectivas proteínas com aumento da fosforilação no estresse moderado (-0,5MPa) em folhas de cana-de-açúcar da cultivar RB 867515 (Tolerante) e da cultivar RB 855536 (sensível) identificadas por espectrometria de massas.

GOTerm	GOGroups	Protein	Sublocation	Ref
Galactose metabolism	[Group0, Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group3]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group3]	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group3]	Triosephosphate isomerase	chloroplast	2
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	chloroplast	5
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase small subunit (ADP-glucose pyrophosphorylase) (ADP-glucose synthase)	chloroplast	1
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group0]	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast	3
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	transketolase	chloroplast	4
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (OsPPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Triosephosphate isomerase	chloroplast	2
Glutathione metabolism	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
Glutathione metabolism	[Group0]	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1
malate metabolic process	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast	3
Pentose phosphate pathway	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
Pentose phosphate pathway	[Group0]	transketolase	chloroplast	4
Pentose phosphate pathway	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
pentose-phosphate shunt	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
Purine metabolism	[Group0]	adenylate kinase family protein	chloroplast	
Purine metabolism	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Pyruvate metabolism	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast	3
Pyruvate metabolism	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (OsPPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
response to light stimulus	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (OsPPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	chloroplast	5
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase small subunit (ADP-glucose pyrophosphorylase) (ADP-glucose synthase)	chloroplast	1
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (OsPPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Starch and sucrose metabolism	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	chloroplast	5
Starch and sucrose metabolism	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase small subunit (ADP-glucose pyrophosphorylase) (ADP-glucose synthase)	chloroplast	1
Starch and sucrose metabolism	[Group0]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
starch biosynthetic process	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	chloroplast	5
starch biosynthetic process	[Group0]	Glucose-1-phosphate adenyltransferase small subunit (ADP-glucose pyrophosphorylase) (ADP-glucose synthase)	chloroplast	1
starch biosynthetic process	[Group0]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (OsPPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Citrate cycle (TCA cycle)	[Group1]	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast	4

Glyoxylate and dicarboxylate metabolism*	[Group1]	Aconitate hydratase	mitochondrial chloroplast	4
Pantothenate and CoA biosynthesis	[Group2]	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis*	[Group2]	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5
Fructose and mannose metabolism	[Group3]	Triosephosphate isomerase	chloroplast	2
Glycine, serine and threonine metabolism	[Group3]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	1
Inositol phosphate metabolism	[Group3]	Triosephosphate isomerase	chloroplast	2
Nitrogen metabolism*	[None]	Ferredoxin--nitrite reductase	chloroplast	
Peroxisome*	[None]	stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1
Porphyrin and chlorophyll metabolism*	[None]	Uroporphyrinogen decarboxylase 2 (UPD2)	chloroplast	5
protein dephosphorylation*	[None]	phosphatase 2C 59 (PP2C59)	chloroplast	1
ubiquitin-dependent protein catabolic process*	[None]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase		5

GO term, classificação ontológica de cada proteína; GO Groups, agrupamento das proteínas baseado na sua ontologia (mostrados em diferentes cores nas figuras de topologia). Ref., Referências de confirmação de sítios de fosforilação encontrados nestas proteínas (1, Nakagami et al., 2010; 2, Sugiyama et al., 2008; 3, Engelsberger et al., 2012; 4, Reiland et al., 2009; 5, Rose et al., 2012).. Em asterisco, os processos mais enriquecidos de cada grupo.

Tabela 4. Resultados da análise Cytoscape-ClueGo. Processos biológicos e respectivas proteínas com aumento da fosforilação no estresse severo (-1MPa) em folhas de cana-de-açúcar da cultivar RB 867515 (Tolerante) e da cultivar RB 855536 (sensível) identificadas por espectrometria de massas.

GO Term	GO Groups	Protein	Sublocation	Ref
C5-Branched dibasic acid metabolism	[Group0]	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	chloroplast	1
Pantothenate and CoA biosynthesis	[Group0]	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis*	[Group0]	Ketol-acid reductoisomerase (Acetohydroxy-acid reductoisomerase)	chloroplast	5
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis*	[Group0]	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	chloroplast	1
organic substance catabolic process	[Group1, Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
organic substance catabolic process	[Group1, Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
organic substance catabolic process	[Group1, Group3]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1
organic substance catabolic process	[Group1, Group3]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic nuclear	5
pentose-phosphate shunt	[Group1, Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group1, Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group1, Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group1, Group3]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group1, Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group1]	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1
Glutathione metabolism*	[Group1]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
Glutathione metabolism*	[Group1]	Glutathione synthetase	cytoplasmic chloroplast	
Glutathione metabolism*	[Group1]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5
Glutathione metabolism*	[Group1]	L-ascorbate peroxidase 7 (APx07)	chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Malic enzyme	chloroplast	3
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	transketolase	chloroplast	4
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	fructose-1,6-bisphosphatase	chloroplast	5
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Phosphoribulokinase	chloroplast	1
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group2, Group3]	Pyruvate phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Pyruvate metabolism	[Group2, Group3]	Malate synthase	proxisomal	
Pyruvate metabolism	[Group2, Group3]	Malic enzyme	chloroplast	3
Pyruvate metabolism	[Group2, Group3]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic	1
Pyruvate metabolism	[Group2, Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
response to light stimulus	[Group2, Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
starch biosynthetic process	[Group2, Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	[Group2]	Malate synthase	proxisomal	
malate metabolic process	[Group2]	Malic enzyme	chloroplast	3
tricarboxylic acid cycle	[Group2]	phosphoenolpyruvate carboxylase	cytoplasmic	1
carbohydrate metabolic process	[Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
carbohydrate metabolic process	[Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
carbohydrate metabolic process	[Group3]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast	1

carbohydrate metabolic process	[Group3]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5
carbohydrate metabolic process	[Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
carbohydrate metabolic process	[Group3]	Phosphoribulokinase	chloroplast	1
carbohydrate metabolic process	[Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1	chloroplast	1
cellular carbohydrate metabolic process	[Group3]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5
cellular carbohydrate metabolic process	[Group3]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast	1
Citrate cycle (TCA cycle)	[Group3]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5
Citrate cycle (TCA cycle)	[Group3]	dehydrogenase	cytoplasmic mitochondrial	6
Fructose and mannose metabolism	[Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
Pentose phosphate pathway*	[Group3]	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2 (G6PGH2)	chloroplast	4
Pentose phosphate pathway*	[Group3]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
Pentose phosphate pathway*	[Group3]	transketolase	chloroplast	4
Pentose phosphate pathway*	[Group3]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Pentose phosphate pathway*	[Group3]	Probable 6-phosphogluconolactonase 4 (6PGL 4)	chloroplast	1
Peroxisome	[Group3]	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	mitochondrial	5
Peroxisome	[Group3]	stress responsive A/B Barrel domain containing protein	chloroplast	1
ubiquitin-dependent protein catabolic process	[Group3]	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	cytoplasmic nuclear	5
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Arginine and proline metabolism	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Cysteine and methionine metabolism	[Group4]	Adenosylhomocysteinase	chloroplast	4
Cysteine and methionine metabolism	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Phenylalanine metabolism*	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Tyrosine metabolism	[Group4]	Aspartate aminotransferase	chloroplast	1
Inositol phosphate metabolism*	[Group5]	inositol-1-monophosphatase	chloroplast	
Phosphatidylinositol signaling system	[Group5]	inositol-1-monophosphatase	chloroplast	
Galactose metabolism*	[None]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Glycine, serine and threonine metabolism*	[None]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[None]	Fructose-bisphosphate aldolase	mitochondrial chloroplast	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[None]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[None]	enolase	mitochondrial	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[None]	Phosphoglucomutase	chloroplast	1
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[None]	Phosphoglycerate kinase	mitochondrial chloroplast	1
Lysine biosynthesis*	[None]	Aminotransferase ALD1 homolog	chloroplast	1
Nitrogen metabolism*	[None]	Ferredoxin--nitrite reductase	chloroplast	
Photosynthesis*	[None]	ATP synthase subunit beta	mitochondrial chloroplast	1
Photosynthesis*	[None]	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	chloroplast	6
Photosynthesis*	[None]	ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	chloroplast	1
Photosynthesis*	[None]	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast	4
RNA degradation*	[None]	enolase	mitochondrial	1

GO term, classificação ontológica de cada proteína; GO Groups, agrupamento das proteínas baseado na sua ontologia (mostrados em diferentes cores nas figuras de topologia). Ref., Referencias de confirmação de sítios de

fosforilação encontrados nestas proteínas (1, Nakagami et al., 2010; 2, Sugiyama et al., 2008; 3, Engelsberger et al., 2012; 4, Reiland et al., 2009; 5, Rose et al., 2012).. Em asterisco, os processos mais enriquecidos de cada grupo

Tabela 5. Resultados da análise Cytoscape-ClueGo. Processos biológicos e respectivas proteínas com aumento da oxidação no estresse moderado (-0,5MPa) em folhas de cana-de-açúcar da cultivar RB 867515 (Tolerante) e da cultivar RB 855536 (Sensível) identificadas por espectrometria de massas.

GOTerm	GOGroups	Protein	Sublocation
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group1, Group5]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group1, Group5]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group1, Group5]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Glycolysis / Gluconeogenesis*	[Group0, Group1, Group5]	Phosphoglucumutase	chloroplast
glucose metabolic process	[Group0, Group5]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	transketolase	chloroplast
Carbon fixation in photosynthetic organisms*	[Group0]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
glycolytic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic
glycolytic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast
glycolytic process	[Group0]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
lipid biosynthetic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
lipid biosynthetic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
malate metabolic process	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group0]	Malic enzyme	chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group0]	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic
Pyruvate metabolism	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
Pyruvate metabolism	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
response to light stimulus	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
response to light stimulus	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	cytoplasmic
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	chloroplast
single-organism carbohydrate metabolic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
starch biosynthetic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 2 (Pyruvate, orthophosphate dikinase 2)	cytoplasmic chloroplast
starch biosynthetic process	[Group0]	Pyruvate, phosphate dikinase 1 (PPDKB) (Pyruvate, orthophosphate dikinase 1)	chloroplast
tricarboxylic acid cycle	[Group0]	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	cytoplasmic
Galactose metabolism	[Group1, Group5]	Phosphoglucumutase	chloroplast
Pentose phosphate pathway	[Group1]	transketolase	chloroplast
Pentose phosphate pathway	[Group1]	Phosphoglucumutase	chloroplast
Purine metabolism	[Group1]	adenylate kinase, chloroplast (ATP-AMP transphosphorylase)	chloroplast
Purine metabolism	[Group1]	Phosphoglucumutase	chloroplast

Oxidative phosphorylation	[Group2]	soluble inorganic pyrophosphatase	chloroplast
Oxidative phosphorylation	[Group2]	ATP synthase gamma chain 1 (H(+)-transporting two-sector ATPase/F(1)-ATPase/ATPC1))	chloroplast
Photosynthesis*	[Group2]	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	chloroplast
Photosynthesis*	[Group2]	ATP synthase gamma chain 1 (H(+)-transporting two-sector ATPase/F(1)-ATPase/ATPC1))	chloroplast
proton transport	[Group2]	ATP synthase gamma chain 1 (H(+)-transporting two-sector ATPase/F(1)-ATPase/ATPC1))	chloroplast
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Arginine and proline metabolism	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Cysteine and methionine metabolism	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Cysteine and methionine metabolism	[Group3]	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	cytoplasmic chloroplast
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Phenylalanine metabolism*	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Selenocompound metabolism	[Group3]	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	cytoplasmic chloroplast
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Tyrosine metabolism	[Group3]	Aspartate aminotransferase	chloroplast
Ascorbate and aldarate metabolism	[Group4]	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic
Glutathione metabolism*	[Group4]	L-ascorbate peroxidase 1 (APx01)	cytoplasmic
Fructose and mannose metabolism	[Group5]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Glycine, serine and threonine metabolism*	[Group5]	phosphoglycerate mutase	cytoplasmic
Inositol phosphate metabolism	[Group5]	Triosephosphate isomerase	chloroplast
Endocytosis*	[None]	70 kDa heat shock protein (Stromal 70 kDa heat shock-related protein)	chloroplast
RNA degradation*	[None]	DnaK family protein	mitochondrial

GO term, classificação ontológica de cada proteína; GO Groups, agrupamento das proteínas baseado na sua ontologia (mostrados em diferentes cores nas figuras de topologia). Em asterisco, os processos mais enriquecidos de cada grupo