

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ELTON PEDRO NUNES PENA

PROTEÔMICA RADICULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* SPP.) ASSOCIADA A FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR SOB DÉFICIT HÍDRICO

Recife
2022

ELTON PEDRO NUNES PENA

**PROTEÔMICA RADICULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* SPP.) ASSOCIADA A FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR SOB DÉFICIT HÍDRICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Coorientadora: Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

**Recife
2022**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Pena, Elton Pedro Nunes.

Proteômica radicular de cana-de-açúcar associada a fungo micorrízico arbuscular sob o déficit hídrico. / Elton Pedro Nunes Pena. – 2023.

122 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Tercilio Calsa Junior.

Coorientador: Fabiana Aparecida Cavalcante Silva.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Saccharum. 2. FMA. 3. Proteoma. 4. Seca. 5. Espectrometria de massas I. Calsa Junior, Tercilio. (Orient.). II. Silva, Fabiana Aparecida Cavalcante (coorient.). III. Título.

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-261

ELTON PEDRO NUNES PENA

**PROTEÔMICA RADICULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
SPP.) ASSOCIADA A FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética. Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 19/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Tercilio Calsa Junior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Katia Castanho Scortecci (Examinador Externo) Universidade
Federal do Rio Grande do Norte

Prof^o. Dr. Marcos Vinicius Loss Sperandio (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. João de Andrade Dutra Filho (Examinador Externo ao Programa)
Universidade Federal de Pernambuco

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me permitido realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior por ter me orientado e me ensinado desde a iniciação científica, permitindo a realização deste trabalho, e contribuindo para minha formação profissional.

À minha Coorientadora Dr^a. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva pelos ensinamentos, pelas contribuições durante a realização deste trabalho, pela amizade, pelos momentos divertidos e pelas broncas.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional.

Ao professor Dr. Djalma Euzébio da EECAC/UFPE pelo fornecimento do material vegetal.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, na pessoa do Dr. José de Paula e aos demais integrantes do Laboratório de Biologia dos Solos pelo auxílio na montagem do experimento em casa de vegetação e todo suporte para montagem do mesmo.

Ao Instituto Vale, na pessoa do Dr. Rafael Borges Valadares e ao pesquisador Felipe Trindade pelas análises de espectrometria de massas.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Lucas Freitas e José Mogahid pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos egressos do LGPP, Geisenilma Rocha, Mara Danielle, Melquisedec Souza pela amizade.

Aos colegas da turma do doutorado 2017.1 pela acolhida calorosa, pelas conversas, estudos e risadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética (PPGG/UFPE) pelos conhecimentos transmitidos.

Anna Aca pelo auxílio durante a montagem do experimento, pelo apoio e pela amizade.

À UFPE pela estrutura para realização do experimento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais fatores limitantes da produtividade da cana-de-açúcar, comprometendo o desenvolvimento da planta e podendo ocasionar perdas no canavial. A associação de plantas com organismos simbiotes como fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem mitigar os efeitos do déficit hídrico, pela modulação da expressão de genes e o acúmulo de proteínas e metabólitos específicos. Entretanto, relativamente poucas informações estão disponíveis sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação com FMAs e estresses nas plantas. O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações fisiológicas, morfométricas e proteômicas em raízes de cana-de-açúcar associada a FMAs e submetidas ao déficit hídrico. Variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) foram propagadas em vasos inoculados ou não com esporos de *Dentiscutata heterogama* (FMADH) ou de *Claroideoglobus etunicatum* (FMACC). Após quatro meses da inoculação, metade dos vasos foram submetidos ao estresse por déficit hídrico por sete dias. Posteriormente, foi retomado o fornecimento de água para a realização de análises de reidratação. A análise proteômica diferencial foi realizada utilizando as variedades RB867515 e RB041443 submetidas ao déficit hídrico, inoculadas ou não pelo FMADH. As proteínas radiculares foram extraídas por método fenólico, quantificadas pelo método de Bradford, e digeridas com tripsina. Os peptídeos obtidos foram submetidos à espectrometria de massas via ESI-Q-ToF. Os espectros obtidos foram analisados no programa Progenesis Q1 (Waters) para quantificação e identificação das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs). As DAPs foram agrupadas por processo biológico e analisadas quanto a interação entre elas. Ambas variedades apresentaram alterações morfométricas e fisiológicas, com destaque para variedade RB867515, no qual os FMAs interagiram de forma mais eficiente. O FMADH interagiu de forma mais eficaz com as variedades RB867515 e RB041443. Na variedade RB867515 foi identificado um total de 399 proteínas e, destas, 29 foram DAPs, das quais 5 foram do tratamento não-inoculado com FMADH e 24 do tratamento inoculado com FMADH. Já na variedade RB041443 foi observado 60 DAPs no tratamento não-colonizado e 22 na condição colonizada. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se as proteínas GDH, PLY10, Protoclorofila redutase sub. N independente de luz, SPINDLY, MDH citoplasmática e mitocondrial e desidratase NAD(P)HX dependente de ATP. Os resultados obtidos podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de tolerância da cana-de-açúcar ao déficit hídrico associado a FMAs e no desenvolvimento de variedades mais tolerantes.

Palavras-chave: *Saccharum*; FMA; Proteoma; seca; espectrometria de massas

ABSTRACT

Water deficit is one of the main limiting factors of sugarcane productivity, compromising the plant's development and possibly causing losses in the sugarcane field. The association of plants with symbiotic organisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can mitigate the effects of water deficit, by modulating gene expression and the accumulation of specific proteins and metabolites. However, relatively little information is available on the molecular mechanisms involved in this interaction with AMFs and plant stresses. The objective of this work was to analyze the physiological, morphometric and proteomic changes in sugarcane roots associated with AMF and submitted to water deficit. Sugarcane varieties (RB867515 and RB041443) were propagated in pots inoculated or not with spores of *Dentiscutata heterogama* (FMADH) or *Claroideoglossum etunicatum* (FMACC). After four months of inoculation, half of the pots were subjected to water deficit stress for seven days. Subsequently, the water supply was resumed to carry out rehydration analyses. Differential proteomic analysis was performed using the varieties RB867515 and RB041443 subjected to water deficit, inoculated or not by FMADH. Root proteins were extracted by the phenolic method, quantified by the Bradford method, and digested with trypsin. The peptides obtained were submitted to mass spectrometry via ESI-Q-ToF. The spectra obtained were analyzed using the Progenesis Q1 program (Waters) for quantification and identification of differentially accumulated proteins (DAPs). The DAPs were grouped by biological process and analyzed for the interaction between them. Both varieties showed morphometric and physiological changes, with emphasis on variety RB867515, in which the AMFs interacted more efficiently. FMADH interacted more effectively with the RB867515 and RB041443 varieties. In the variety RB867515, a total of 399 proteins were identified and, of these, 29 were DAPs, of which 5 were from the non-FMADH inoculated treatment and 24 from the FMADH inoculated treatment. In the RB041443 variety, 60 DAPs were observed in the non-colonized treatment and 22 in the colonized condition. Among the proteins identified, the proteins GDH, PLY10, Protochlorophyll reductase sub stand out. Light-independent N, SPINDLY, cytoplasmic and mitochondrial MDH and ATP-dependent NAD(P)HX dehydratase. The results obtained may help to elucidate the mechanisms of sugarcane tolerance to water deficit associated with AMF and to develop more tolerant varieties.

Keywords: *Saccharum*; FMA; Proteome; dry; mass spectrometry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Mapa da distribuição geográfica das áreas de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil	20
Figura 2 –	Variedades de cana-de-açúcar. A: RB867515; B: RB041443.	22
Figura 3 –	Mapa das Áreas Susceptíveis à Desertificação no Brasil.	26
Figura 4 –	Benefícios da interação planta-FMA.	33

Capítulo 1

Figura 1 –	Análise de Teor Relativo de Água (TRA) de variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) submetidas a estresse por déficit hídrico. SFMA- Sem Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA); FMADH- FMA <i>Dentiscutata heterogama</i> ; FMACG- FMA <i>Claroideoglopus etunicatum</i> ; IS- Irrigação do solo; SS- Sem irrigação do solo	70
Figura 2 –	Avaliação do Teor hídrico do solo em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) dos tipos <i>Dentiscutata heterogama</i> (DH) e <i>Claroideoglopus etunicatum</i> (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMA_DH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_DH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_CG.	71
Figura 3 –	Avaliação do Teor de carotenoides radiculares em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) dos tipos <i>Dentiscutata heterogama</i> (DH) e <i>Claroideoglopus etunicatum</i> (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMA_DH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_DH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_CG.	72

- Figura 4 – Avaliação do comprimento radicular em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglossum etunicatum* (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMA_DH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_DH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_CG. 73
- Figura 5 – Avaliação dos parâmetros morfométricos em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglossum etunicatum* (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMA_DH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_DH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMA_CG. 74
- Figura 6 – Colonização micorrízica de variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB111443) com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) do tipo *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglossum etunicatum* (CG). 75
- Figura 7 – Categorização ontológica com base em processo biológico de proteínas identificadas na variedade de cana-de-açúcar RB7515 submetidas ao estresse por déficit hídrico em resposta a colonizadas por *Dentiscutata heterogama*. 76
- Figura 8 – Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em folhas não micorrizadas (SSFMA) e micorrizadas com *Dentiscutata heterogama* (SFMA_DH) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de vinte e quatro proteínas identificadas, rendeu cinco clusters (A-E) baseadas em processos biológicos. 77
- Figura 9 – Modelo biológico da interação entre FMADH e a variedade de cana-de-açúcar RB867515 na mitigação dos efeitos deletérios do déficit hídrico. As proteínas em vermelho referem-se as DAPs mais acumuladas no tratamento submetido ao déficit hídrico colonizado pelo FMADH. As proteínas em verde referem-se as DAPs mais acumuladas no tratamento 64

submetido ao déficit hídrico não-colonizado pelo FMADH. As setas inteiras referem-se as prováveis funções das proteínas no modelo biológico.

Capítulo 2

- Figura 1 – Categorização ontológica com base em processo biológico de proteínas identificadas na variedade de cana-de-açúcar RB041443 submetidas ao estresse por déficit hídrico em resposta a colonizadas por *Dentiscutata heterogama*. 105
- Figura 2 – Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em raízes não micorrizadas (SSFMA) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de sessenta identificadas, rendeu seis clusters (A-F) baseadas em processos biológicos. 106
- Figura 3 – Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em raízes micorrizadas com *Dentiscutata heterogama* (SFMADH) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de vinte e uma proteínas identificadas, rendeu três clusters (A-C) baseadas em processos biológicos. 107

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 –	Características agrícolas das variedades de cana-de-açúcar.	23
------------	---	----

Capítulo 1

Tabela 1 –	Tabela de pontos das avaliações morfométricas, fisiológicas e colonização. FMADH (<i>Densticutata heterogama</i>) e FMACG (<i>Claroideoglomus etunicatum</i>).	78
Tabela 2 –	Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB867515 não-colonizadas por <i>Densticutata heterogama</i> e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.	79
Tabela 3 –	Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB867515 colonizadas por <i>Densticutata heterogama</i> e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.	80

Capítulo 2

Tabela 1 –	Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB041443 não-colonizadas por <i>Dentiscutata heterogama</i> e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.	100
Tabela 2 –	Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB041443 colonizadas por <i>Dentiscutata heterogama</i> e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Definição
%Vol	Porcentagem de volume do spot normalizado em gel
2D-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional
ABA	Ácido Abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
ASD	Áreas Susceptíveis à Desertificação
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Bovine serum albumin (Albumina de Soro Bovino)
CAT	Catalase
CG	<i>Claroideoglopus etunicatum</i>
CHAPS	Cloroamidopropil Dimetilamônio Propano Sulfonato
CP	Capacidade de Pote
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DAPs	Peptídeos Diferencialmente Acumulados
DH	<i>Densticutata heterogama</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FMA	Fungo Micorrízico Arbuscular
GO	Gene Ontology (Ontologia Gênica)
IAA	Iodoacetamida
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	pH imobilizado em gradiente

JA	Ácido Jasmônico
LEA	late embryogenesis abundant - proteínas abundantes na embriogênese ardia
MM	Massa Molecular
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NADP	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina reduzido
PI	Ponto isoelétrico
PIB	Produto Interno Bruto
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
Ratio	Razão de variação na %Vol. do spot entre condições contrastantes
RIDESA	Rede Interuniversitária Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
RNA	Ácido Ribonucleico
RuBisCO	Ribulose-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido desmutase
THS	Teor Hídrico do Solo
TRA	Teor Relativo de Água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR E A SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	18
2.2	RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DAS PLANTAS SOB ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO	24
2.2.1	Respostas Fisiológicas	26
2.2.2	Respostas Moleculares	29
2.3	AS INTERAÇÕES SIMBIÓTICAS: PLANTAS-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	30
2.3.1	Fungos Micorrízicos Arbusculares	30
2.3.2	Interação Planta-FMA	32
2.4	ANÁLISE PROTEÔMICA VEGETAL	34
2.4.1	Proteômica da interação Planta-FMA	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
	REFERÊNCIAS	39
	CAPÍTULO 1	46
	CAPÍTULO 2	84
4	DISCUSSÃO GERAL	106
5	CONCLUSÕES	108
	CURRÍCULO LATTES	109

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), com área cultivada de aproximadamente 9 milhões de hectares. Originária do sudeste da Ásia, esta planta é encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

A cana-de-açúcar possui metabolismo do tipo C4 que confere a esta monocotiledônea alta adaptabilidade aos trópicos e grande capacidade fotossintética. A partir da biomassa da cana-de-açúcar é extraído um caldo rico em sacarose, do qual são gerados diversos produtos, principalmente açúcar e etanol de primeira geração. Além disso, são gerados diversos subprodutos do bagaço da cana, como biogás, fibra para alimentação animal, bioeletricidade, bioplástico e etanol de segunda geração. Esta alta diversidade de produtos e subprodutos originados da cana-de-açúcar conjuntamente com a procura mundial por fontes energéticas menos poluentes e renováveis, tornam esta gramínea umas das principais cultivares do agronegócio brasileiro, representando para economia do país cerca de 2 % do Produto Interno Bruto (PIB).

Contudo, fatores ambientais e ações antrópicas podem comprometer a produtividade e a expansão do cultivo de da cana-de-açúcar, por interferir no desenvolvimento e crescimento da planta. Seca, salinidade, variações de temperatura, alterações nos níveis de radiação ultravioleta, patógenos e inundações são alguns dos principais fatores que limitam a produção e produtividade das culturas no mundo. No Brasil, cerca de 15 % do território é formado por solos secos, degradados e em processo desertificação, consideradas como áreas susceptíveis à desertificação (ASD), onde a maioria destas áreas estão presentes na região Nordeste. Neste contexto, a seca se configura como uma das

principais causas limitantes na expansão e produtividade da cana-de-açúcar, sendo responsável por grandes perdas na produção.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são encontrados na grande maioria de plantas terrestres, associados, normalmente, de forma mutualística, onde ocorre a transferência de açúcares da planta para o fungo e alguns nutrientes derivados do solo, geralmente fósforo (P), zinco (Zn) e compostos nitrogenados do fungo para a planta. Os FMA podem agir de diferentes formas, melhorando a nutrição vegetal (biofertilizantes), interferindo na produção de fito-hormônios (biorreguladores) e mitigando os efeitos do estresse ambiental (bioprotetores). Os FMAs aumentam a tolerância da planta a estresse hídrico por atuarem de forma direta e indireta na modulação de proteínas responsivas a danos oxidativos, provenientes de EROs.

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta das variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB041443 à colonização por FMAs em condições de estresse por déficit hídrico, utilizando parâmetros fisiológicos, morfométricos e moleculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR E A SUA IMPORTÂNCIA

ECONÔMICA

A família Poaceae representa uma das principais famílias dentre as Angiospermas sendo responsável por boa parte de alimentação humana e animal. Abrangendo cerca de 780 gêneros e mais 12.000 espécies (CHRISTENHUSZ e BYNG, 2016), tem como principais representantes o milho, trigo, cevada, sorgo, arroz, bambu e cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar é uma gramínea originária do sudeste asiático no qual foi domesticada e disseminada por toda a região asiática (DANIELS e ROACH, 1987), sendo uma das primeiras culturas a serem estabelecidas pela humanidade. Pertencente ao gênero *Saccharum*, do qual é formado por seis espécies, *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*, com destaque para as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, pois foram as que mais contribuíram na geração das cultivares atuais (MORAIS et al. 2015).

A *S. officinarum* ($2n=80$) (D'HONT et al. 1996), também conhecida como cana nobre, é uma espécie aloploiploide, que apresenta altos teores de sacarose em seu colmo e baixo teor de fibras, sendo cultivada desde a Antiguidade, contudo apresenta baixa tolerância a patógenos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al. 2011a). Enquanto a *S. spontaneum* ($2n=40-128$) (D'HONT et al. 1996), uma espécie altamente polimórfica como maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, possui baixo teor de sacarose (MING et al. 2010). O cruzamento interespecífico destas plantas gerou um híbrido com alta teor de sacarose, maior adaptabilidade a intensidade luminosa, altas temperaturas e a relativa tolerância a estresses bióticos e abióticos, principalmente escassez hídrica, características de

grande interesse para o setor sucroalcooleiro (MING et al. 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al. 2011A).

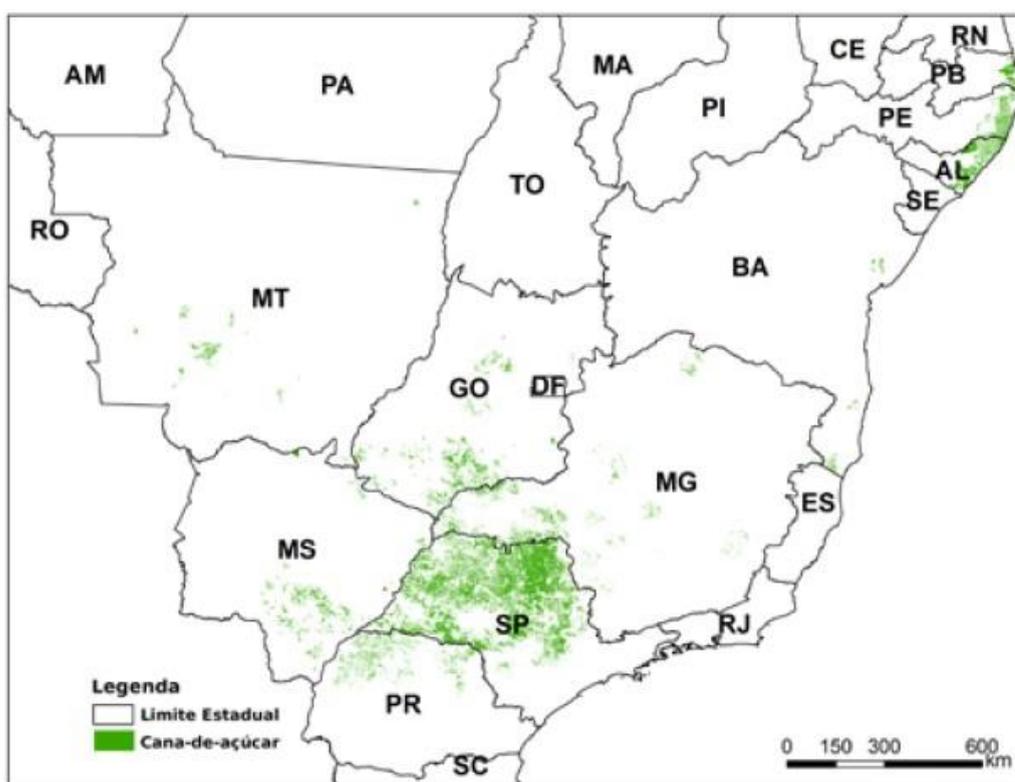
As variedades atuais de cana-de-açúcar são híbridos poliploides com alta variação cromossômica ($2n=100-130$), com genoma médio 19 Gb e 373,869 mil genes (SOUZA et al. 2019). São plantas de grande porte com alta capacidade de perfilhamento, formando grandes touceiras. Apresentam ciclo de vida semiperene, sendo necessário um novo plantio após algumas colheitas para garantir máxima produção (GÓMEZ-MERINO et al. 2014). Além disso, possui sistema fotossintético do tipo C4, o qual confere à planta maior eficiência fotossintética na utilização do gás carbônico (CO_2) (LANGDALE, 2011), bem como melhor utilização da água e do nitrogênio (KELLOGG, 2013), resultando assim em maior produtividade.

Estas características fazem com que a cana-de-açúcar seja a gramínea mais cultivada no mundo, estando presente em mais de 127 países com cobertura de 22 milhões de hectares (MORAIS et al. 2015). Anualmente são coletadas mais de 1 bilhão de toneladas de cana-de-açúcar, superando até mesmo a produção de outros cultivares da família, como milho, trigo e arroz (FAO 2019).

No Brasil, a cultura de cana-de-açúcar foi estabelecida durante o período colonial devido as condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento e produção dessa espécie. Inicialmente, cultivada apenas na região Nordeste e no Estado de São Paulo, houve a partir da década de 1970 uma significativa expansão devido a criação do programa PróÁlcool. Este programa visava a produção de álcool etílico combustível, que impulsionou a expansão dos canaviais, bem como a melhoria na infraestrutura das usinas (MARIN e NASSIF, 2013). A implementação deste programa acarretou em menor dependência do petróleo, proporcionando o desenvolvimento da agroindústria de biocombustíveis e de indústrias automotivas

com motores a álcool (JAISWAL et al. 2017), desta forma, favorecendo o desenvolvimento econômico e reduzindo os impactos ambientais. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (20%) com 8,6 milhões de hectares plantados (Figura 1), com safra 2020/21 de 665,1 milhões de toneladas, representando um aumento 3,5% em relação à safra anterior (CONAB 2020), podendo atingir em 2029 um crescimento de até 38 % na produção mundial (FAO 2019).

Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica das áreas de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil.



Fonte: CONAB (2022)

Do ponto de vista econômico, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas do agronegócio brasileiro, sendo responsável por 10 % do PIB do agronegócio, que corresponde a 2 % do PIB nacional (SIAMIG, 2019). Destaca-se no cenário mundial devido sua alta produção de açúcar e etanol anidro, com produção estimada de 41,8 milhões de toneladas e 9,6 bilhões de litros, que correspondem a 17,3 % e 26,2 % da produção mundial, respectivamente (FAO 2019; CONAB 2020).

Além disso, durante o processamento da cana-de-açúcar, são gerados diversos subprodutos que podem ser utilizados na produção de fertilizantes (ZAKARIA et al. 2020), biogás (NOSRATPOUR et al. 2018), ração animal (IQBAL et al. 2015), compostagem (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al. 2011b), bioplástico (TELLES et al. 2011), bioeletricidade. Especialmente, a produção de etanol de segunda geração ou lignocelulósico, a partir da palha e do bagaço (WOICIECHOWSKI et al. 2016), pode chegar a um incremento de 82 milhões de L.ano⁻¹ na produção nacional (UNICA, 2013).

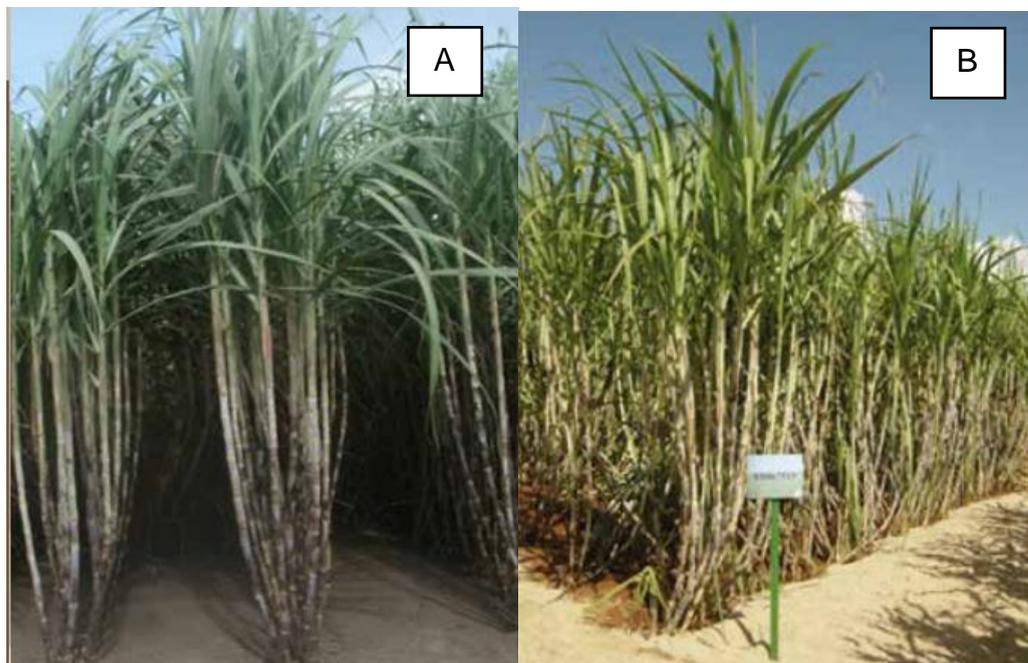
Esta diversidade de produtos e subprodutos, suas características fisiológicas e a busca por menor impacto ambiental, sem comprometer a alimentação humana e animal, fazem com que a cana-de-açúcar seja considerada a cultura de maior sustentabilidade dentre as demais culturas de matriz energética e alimentar (LONG et al. 2015; KLINE et al. 2017).

Devido à grande relevância da cana-de-açúcar para o setor agrícola, foram criados cinco principais programas de melhoramento no Brasil, realizados pelas instituições) RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro); ii) IAC (Instituto Agrônomo de Campinas); iii) CTC (Centro de Tecnologia Canavieira); iv) CanaVialis (2003 - 2015); e v) Cana Vertix. Esses programas de melhoramento genético visam gerar variedades de cana-de-açúcar mais produtivas e mais tolerantes aos estresses bióticos e abióticos nas regiões de cultivo do país.

Dentre as variedades cultivadas, destacam-se a RB867515 (Figura 2A), variedade mais plantada no Brasil com boa adaptabilidade e tolerância a estresses ambientais, e a variedade RB041443 (Figura 2B) com características similares a

RB867515. Na tabela 1 estão descritas as características das variedades supracitadas.

Figura 2 – Variedades de cana-de-açúcar. A: RB867515; B: RB041443.



Fonte: Ridesa (2010)

Apesar de diversas variedades de cana-de-açúcar serem produzidas, principalmente pela técnica de cruzamento entre variedades (melhoramento clássico), a produtividade da cana-de-açúcar representa apenas 20 % do seu potencial teórico-experimental (WACLAWOVSKY et al. 2010), dando condições para que novas abordagens sejam utilizadas para alcançar maior produtividade.

Dentre estas abordagens, surge a utilização de ferramentas moleculares, visando a identificação de marcadores moleculares funcionais. Entretanto, devido alta complexidade e poliploidia do genoma das variedades atuais, o sequenciamento genético de cana-de-açúcar tem sido priorizado recentemente.

Tabela 1 – Características agrícolas das variedades de cana-de-açúcar.

Características	RB867515	RB111443
Produtividade agrícola	Alta	Alta
Colheita	Jul./Set.	Set./Nov. e Dez./Fev.
Perfilhamento	Cana planta	Médio
	Cana soca	Médio
Brotação da soca	Queimada	Muito boa
	Crua	Boa
Fechamento de entrelinhas	Bom	Bom
Velocidade de crescimento	Rápida	Rápida
Porte	Alto	Alto
Hábito de crescimento	Ereto	Ereto
Tombamento	Eventual	Eventual
Florescimento	Eventual	Baixo
Chochamento	Médio	Ausente
Maturação	Média/Tardia	Precoce/Média
Despalha	Média	Média
PUI	Médio	Longo
Exigência em ambientes	Média restrição	Média restrição
Teor de sacarose	Alto	Alto
Teor de fibra	Médio	Médio
Carvão	Tolerante	Resistente
Ferrugem marrom	Resistente	Resistente
Escaldadura	Tolerante	Resistente
Mosaico	Tolerante	Resistente

Fonte: O autor, adaptada da Ridesa (2010)

Outras técnicas foram utilizadas para compreender o intrincado genoma e, especialmente, o transcriptoma desta gramínea, como mapas genéticos, análise cromossômica, etiquetas de sequência expressa - (EST – *expressed sequence tags*) (VETTORE et al., 2001; THIRUGNANASAMBANDAM et al. 2018), e sequenciamento do genoma cloroplastidial (CALSA JR. et al, 2004; CALSA e FIGUEIRA, 2007) e mitocondrial (SHEARMAN et al. 2016). Recentemente, foi realizado o sequenciamento completo do genoma de cana-de-açúcar (var. SP80-3280) (SOUZA et al. 2019), no qual foram identificados genes principalmente envolvidos com a síntese de carboidratos.

Outra abordagem é a compreensão da microbiota associada as plantas, bem como análise de sua diversidade, visto que a associação das plantas com

microrganismos pode contribuir com o aumento do crescimento, da produtividade e da tolerância às condições edafoclimáticas adversas (MIRSHAD e PUTHUR, 2016) e fitopatógenos (MEHNAZ, 2013). A simbiose entre plantas e microrganismos pode também reduzir o uso de defensivos e adubação química. Suas interações ativam vias moleculares relacionadas à síntese de hormônios (MOLLAVALI et al. 2018; SUN et al. 2018), expressão de genes e acúmulo de proteínas envolvidas com a tolerância a estresses bióticos e abióticos (BERNARDO et al. 2017), bem como envolvidos na obtenção de água e nutrientes (FERREIRA et al. 2018).

Portanto, o uso destas outras abordagens de forma associada pode contribuir na identificação de marcadores funcionais relacionados a maior interação das plantas com microrganismos benéficos e a maior tolerância a estresses, sem ocasionar maiores impactos ambientais, desta forma, promovendo a obtenção de novas variedades e impulsionando a produtividade dos canaviais.

2.2 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DAS PLANTAS SOB ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

As plantas, bem como os demais seres vivos, estão expostas as diversas condições edafoclimáticas, que podem ser muitas vezes consideradas adversas para estes organismos. Salinidade, radiação ultravioleta, inundação, variações de temperatura, poluição e seca, são alguns fatores abióticos que podem comprometer o desenvolvimento dos vegetais. Estima-se que 50 a 70% das perdas agrícolas no mundo é ocasionada por algum estresse abiótico (MITTLER, 2006), e apenas 10 a 20% por patógenos (KREPS et al. 2002).

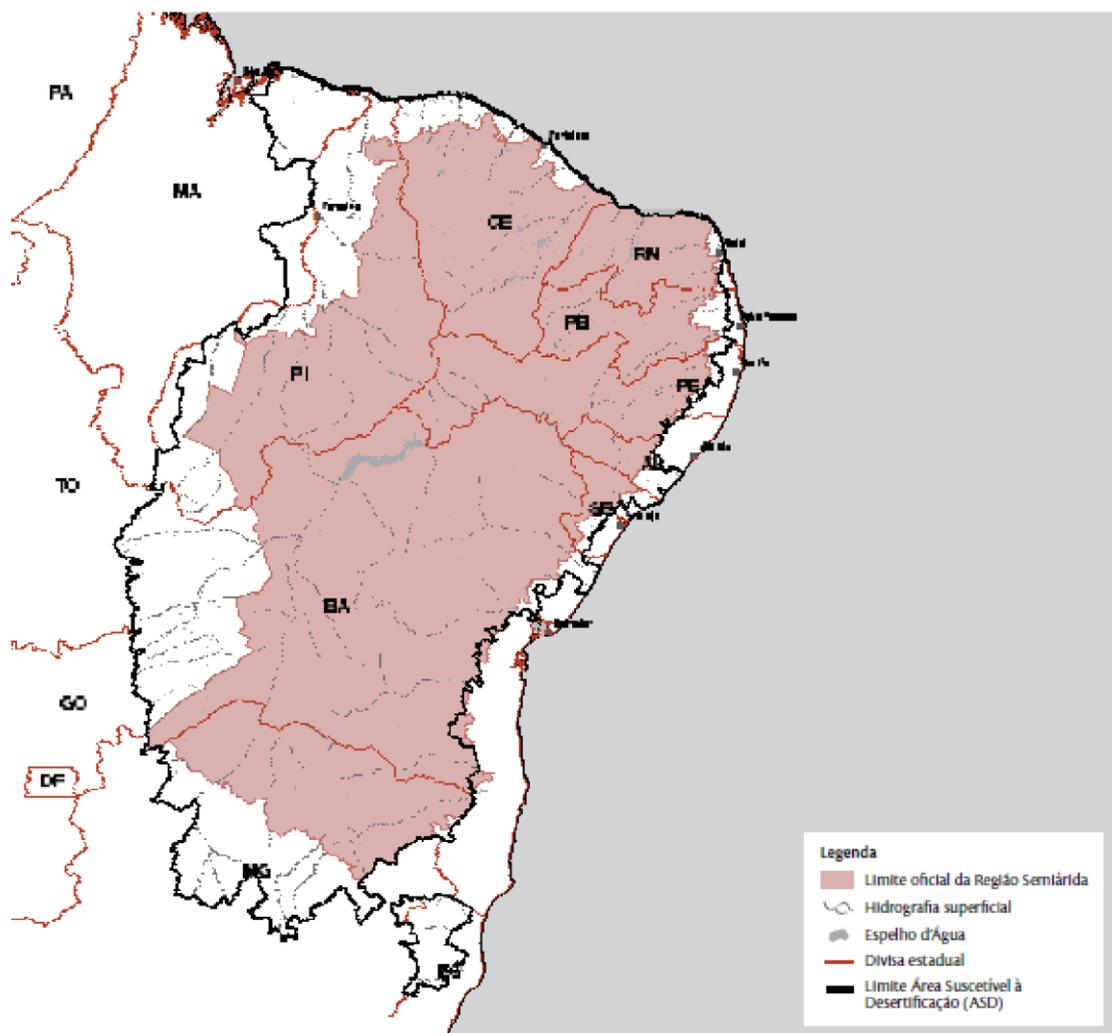
A seca é o estresse ambiental mais relevante no mundo (ALI e ANJUM 2016), podendo ser de origem natural, devido as condições geológicas e climáticas,

ou pela ação antrópica. A partir da década de 1950, com o rápido aumento da temperatura terrestre e do acúmulo de CO₂ atmosférico, e redução no nível de precipitação em todos os continentes (DAI, 2011), houve aumento gradativo das áreas de desertificação ou em processo de desertificação, com isso reduzindo as potenciais áreas de cultivo, comprometendo assim a produção de alimentos (GOHARI et al. 2013).

No Brasil, cerca de 15% do território é formado por solos secos, degradados e em processo de desertificação, em áreas consideradas susceptíveis à desertificação (ASD; CGEE, 2016). A maioria das ASD está presente na região Nordeste e corresponde a aproximadamente 74% de todo o território nordestino (Figura 3). Nestas áreas, plantas adaptadas a condições adversas apresentam características morfoanatômicas e fisiológicas que garantem sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução. Entretanto, plantas exóticas, tendem a apresentarem maior susceptibilidade nestas condições, gerando assim, perdas para os produtores.

Neste contexto, a seca se configura como uma das principais limitantes da expansão e produtividade da cana-de-açúcar, sendo responsável por grandes perdas na produção (NOVA CANA, 2018a; NOVA CANA, 2021) e na produtividade, principalmente na região Nordeste (DIAS e SENTELHAS, 2018).

Figura 3 – Mapa das Áreas Susceptíveis à Desertificação no Brasil.



Fonte: CGEE (2016).

2.2.1 Respostas Fisiológicas

As plantas, quando submetidas ao déficit hídrico, podem recorrer a um dos três eventos de resposta, classificados em escape, evitação e tolerância. O escape é um mecanismo utilizado por algumas plantas, que ao perceber o estresse encurtam seu ciclo de vida, acelerando os processos de florescimento, maturação e produção de sementes (YADAV and SHARMA, 2016). Os organismos que utilizam os mecanismos de evitação quando submetidos ao estímulo estressor tendem a gerar respostas de curto prazo como redução da área foliar, abscisão foliar e crescimento radicular como forma de evitar potenciais danos (FAROOQ et

al. 2009; HOSSAIN et al. 2016). As plantas consideradas tolerantes são capazes de manter sua homeostase com baixo potencial hídrico, além de utilizar os mesmos mecanismos das plantas de evitação, apresentam alterações morfofisiológicas como espinhos e pelos radiculares, além de realizar ajustes bioquímicos e fisiológicos para suportar o estresse (AKHTAR e NAZIR, 2013).

Em condições de déficit hídrico, as raízes são os primeiros órgãos a perceberem o estresse, visto que ocorre a redução do potencial hídrico, dificultando absorção de água (AHMAD et al. 2016). Adicionalmente, com o fechamento estomático para reduzir a perda de água por transpiração, os gradientes de pressão radicular são mantidos iguais ou superiores ao do solo. Com estas alterações, diversos processos metabólicos são ajustados, principalmente os relacionados a fotossíntese.

O fechamento estomático ocasionado pela escassez hídrica reduz as trocas gasosas, principalmente o influxo de dióxido de carbono (CO_2), ocasionando redução na concentração deste gás no mesófilo, estimulando atividade de oxigenase da RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase), principalmente em plantas C3, reduzindo a eficiência fotossintética (LISAR et al. 2012). Em plantas C4, esta situação é mais rara devido à localização dos tecidos fotossintetizantes serem mais internos, mantendo o nível de CO_2 mais alto próximos aos sítios da RuBisCO (LOPES et al. 2011). Conjuntamente a isto, a redução dos níveis hídricos, inibe a fotólise da água, acarretando redução na produção de NADPH e ATP, essenciais na fase química para síntese de carboidratos (BASU et al. 2016). Além disso, o excesso de elétrons gerados pode ser dissipado em formas alternativas, promovendo o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e

oxigênio singleto (O_2) (CRUZ DE CARVALHO, 2008), ocasionado um segundo estresse, o estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas produzidas naturalmente e participam de diversos processos biológicos, principalmente envolvidos com sinalização, crescimento radicular, maturação e florescimento (MABUCHI et al. 2018; CHOUDHARY et al. 2020). Contudo, o excesso de EROs ocasiona diversos danos celulares, como desnaturação proteica, peroxidação dos lipídios, oxidação dos aminoácidos e danos ao DNA. Com o intuito de evitar ação danosa das EROs, os vegetais possuem dois mecanismos: os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis pelo processo de detoxificação. Dentre as enzimas que compõem os mecanismos enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), responsável por converter O_2^- em H_2O_2 , composto menos reativo, e ascorbato peroxidase (APx) que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, eliminando os compostos tóxicos. Além das enzimas, outros compostos como carotenoides, polifenóis, prolina, ácido ascórbico, flavonoides e isoflavonoides e antocianinas, conhecidos como antioxidantes não-enzimáticos, agem como aceptores de elétrons, reduzindo os danos (ANJUM *et al.* 2016; THABIT, 2019).

Além das modulações enzimáticas e não-enzimáticas, o déficit hídrico e outros estresses desencadeiam nas plantas alterações hormonais, envolvidas em diversos processos fisiológicos e ajustes metabólicos frente ao estresse em questão. Dentre os hormônios vegetais, o ácido abscísico (ABA) é um dos principais fitohormônios envolvidos em resposta ao déficit hídrico, provavelmente, devido ao fato de ser sintetizado principalmente nas raízes, primeiro órgão a perceber o estresse. O ABA ao ser translocado para as folhas, age induzindo o fechamento

estomático, comprometendo a transpiração e diminuindo a eficiência fotossintética, além disso, também atua nas raízes promovendo o crescimento radicular, com o intuito de alcançar áreas mais profundas do solo em busca de água.

Além do ABA, outros hormônios também estão envolvidos em respostas ao déficit hídrico, como ácido jasmônico (JA), etileno e citocininas. O JA está relacionado ao processo de sinalização e no fechamento estomático podendo agir ou não de forma conjunto com ABA em plantas sob estresse. O etileno é um hormônio normalmente relacionado com inibição do crescimento, contudo em plantas tolerantes a estresse tem sua síntese regulada positivamente e promove o aumento no crescimento da planta, como também, participa do controle de abertura estomática. As citocininas (CKs) são um grupo de moléculas relacionadas com a indução da divisão mitótica, principalmente nas regiões apicais. Durante o estresse prolongado a concentração de CKs é reduzida promovendo o crescimento radicular, desta forma, contribuindo na busca de água no solo (HAI et al, 2020)

2.2.2 Respostas Moleculares

Fatores estressantes desencadeiam alterações morfológicas e fisiológicas, bem como os ajustes metabólicos nas plantas. Tais alterações são orquestradas e reguladas por diversos mecanismos moleculares que tem sido alvos de diversos estudos, visando principalmente o melhoramento genético vegetal.

Dentre os alvos estudados, os hormônios reguladores como ácido abscísico, etileno, ácido jasmônico e citocininas estão entre os principais. O ABA é o principal hormônio responsivo ao déficit hídrico, e as oscilações nos níveis deste hormônio nas plantas está relacionado a regulação de fatores de transcrição e receptores

hormonais, envolvidos principalmente como as alterações fenotípicas nas raízes e folhas (OSAKABE *et al.* 2014; BASU *et al.* 2016).

Os mecanismos de sinalização relacionados ao ABA, podem ser de dois tipos: os dependentes de ABA e os independentes de ABA. Com alteração nos níveis de ABA nas plantas, os receptores do tipo PYR (*Pyrabactin Resistance*) e PYL (*Pyrabactin Resistance-Like*) interagem com hormônio e forma um heterodímero com a fosfatase tipo 2C (PP2C), inibindo atividade da mesma sobre a quinase SnRK2 [*Snf1(Sucrose-non-fermentation1) related kinases subfamily 2*] (ZHANG *et al.* 2015). A autofosforilação da quinase SnRK2 promove sua ativação, que passa a atuar sobre quinases citoplasmáticas, como as quinases dependentes de cálcio e os canais iônicos de Ca^{2+} e K^{+} , além de ativar por fosforilação fatores de transcrição do tipo ABF (*ABRE binding factors*), como bZIP, que medeiam a expressão de genes com sequência promotora do tipo ABRE (*ABA binding responsive elements*) (KLINGLER *et al.* 2010). Por outro lado, os genes independentes de ABA, como aqueles que possuem sequência promotora do tipo DRE (*Dehydration responsive elements*) são responsivos aos estresses abióticos, como a escassez hídrica, mas não são regulados pelo ABA, sendo ativados pelo etileno que por sua vez é mediado pela proteína DREB (*Dehydration responsive elements binding*).

2.3 AS INTERAÇÕES SIMBIÓTICAS: PLANTAS-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

2.3.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares

A maioria das espécies de plantas se encontram associadas a determinados microrganismos, como os fungos, numa relação ecológica mutualística do tipo micorrízicos, ou seja, fungos associados a raízes de plantas, com etimologia de

origem grega, *mukes* – cogumelo e *rhiza* – raiz. Mas essas relações ecológicas estabelecidas entre plantas e fungos vai muito além da associação entre organismos mutualistas, ela denota o resultado de competitividade e sucessão de plantas evolutivamente beneficiadas, e dependentes dessas interações (MATHIEU, 2018).

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) pertencem a uma das 300 espécies do filo fúngico de Glomeromycota e são simbioses radiculares obrigatórios onde se estima que estejam presentes em mais de 80% das espécies de plantas terrestres (MAARJA, 2016). Sua morfologia caracteriza-se pela presença das hifas, que funcionam como prolongamentos das raízes das plantas, e no solo realizam a obtenção de compostos minerais e água. A identificação dos FMAs apenas é possível com auxílio da microscopia, na qual é possível visualizar a presença das hifas, vesículas ou arbúsculos. As vesículas são corpos globosos que podem estar localizados intra ou intercelular, e são estruturas ricas em lipídeos, o que indica se tratar de um órgão de reserva. Os Arbúsculos por sua vez são formados pela penetração de células das hifas na estrutura da membrana plasmática (IVANOV, 2019).

Os FMAs são organismos biotróficos, que completam seu desenvolvimento e ciclo de vida, num hospedeiro vivo, nesse caso a planta. Algumas características do sucesso da associação de FMA com plantas se deve ao fato da planta reconhecer certos microrganismos que poder ser prejudiciais ou benéficos a planta, assim, permitindo a simbiose apenas, dos que podem beneficiá-las (SOUZA *et al.* 2010). A adesão de FMA pelas plantas ocorre graças a uma reestruturação intracelular na rizosfera, com migração de organelas e microtúbulos no interior da

célula, abrindo assim, caminho para a entrada da hifa nos tecidos. (OPLDROYD, 2013).

A reprodução de FMA está diretamente ligada a organização da variação genética desses organismos, discussão esse que é amplamente debatida pela comunidade científica. Os esporos assexuados contêm centenas de núcleos e abrigam sequências polimórficas incomum de genes codificadores de RNAr, que dificulta e confunde a composição genética desses organismos. Compreender os processos genéticos de sua reprodução ajudam a: esclarecer os mecanismos pela qual a interação entre fungo-planta acontece; desenvolvimento de produtos comerciais com fungos micorrízicos para melhoramento vegetal (PAWLOWSKA).

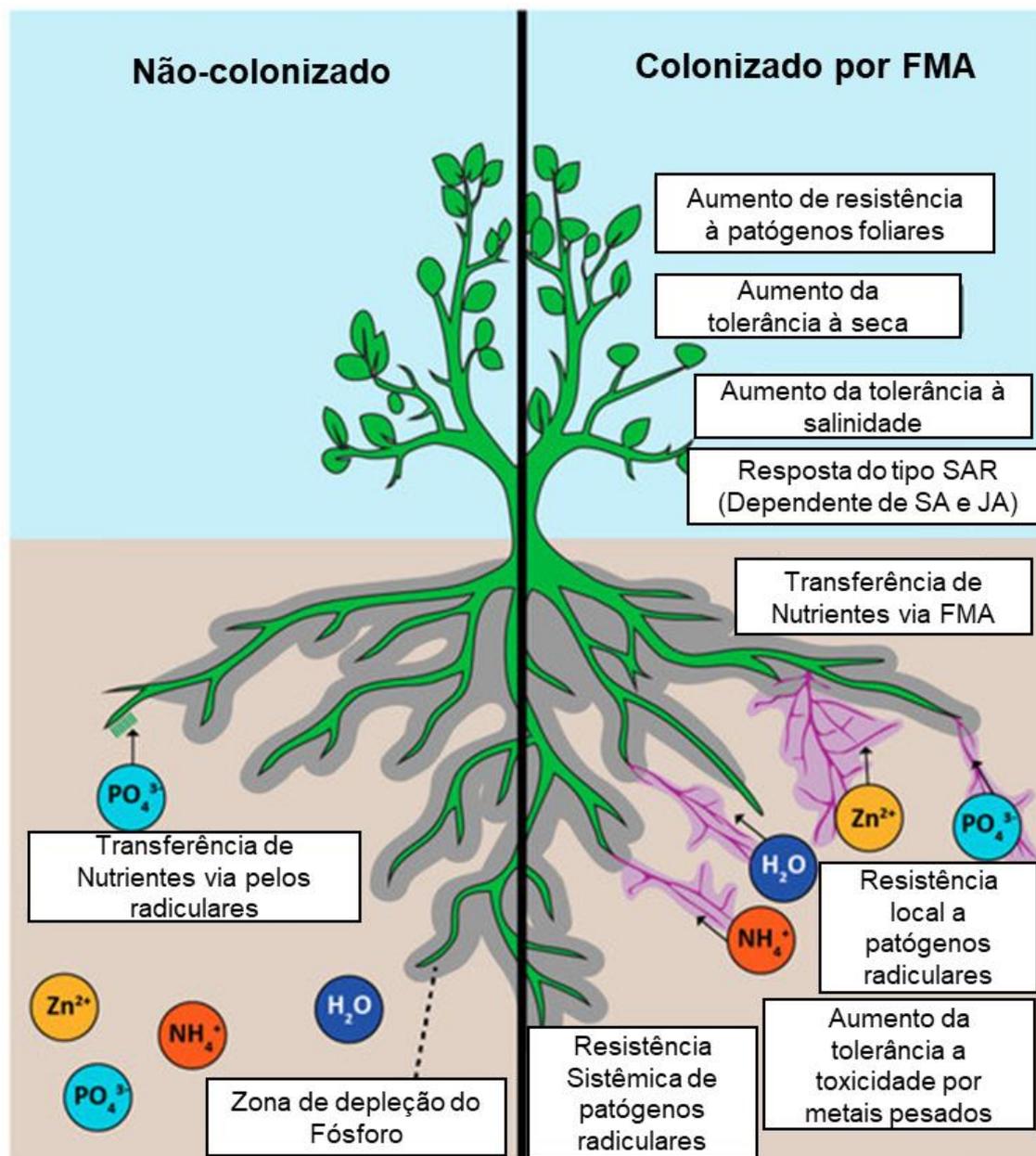
2.3.2 Interação Planta-FMA

A interação simbiótica do tipo micorrízica arbuscular é considerada a micorriza mais ancestral dentre todos os tipos de micorrizas conhecidos. Pode ser encontrada em quase todas as latitudes e em praticamente todos os ecossistemas terrestres, além de serem cosmopolitas (REDECKER et al, 2000).

Fungos micorrízicos Arbusculares (FMA) são encontradas na grande maioria de plantas terrestres, associadas, normalmente, de forma mutualística, onde ocorre a transferência de açúcares da planta para o fungo e alguns nutrientes derivados do solo, geralmente Fósforo (P), Zinco (Zn) e compostos nitrogenados do fungo para a planta. Algumas características dessa simbiose podem melhorar o desempenho da planta no ambiente, sendo eles: maior tolerância ou resistência a algumas doenças; relações hídricas, como condução de água, melhorada; mudança no tamanho e espessura da raiz; estabilidade estrutural da planta;

estrutura química da parede celular; ganho de biomassa (Figura 4) (LI, 2021; BASYAL, 2020; JACOTT et al, 2017).

Figura 4 – Benefícios da interação planta-FMA.



Fonte: JACOTT et al, adaptada (2017).

Os FMA podem agir de diferentes formas, melhorando a nutrição vegetal (biofertilizantes), interferindo na produção de fito-hormônios (biorreguladores) e mitigando os efeitos do estresse ambiental (bioprotetores) (BEN-LAOUANE *et al.*

2020; TOUBALI *et al.* 2020). Levando a um aumento de biomassa e do rendimento, além de mudanças em diferentes parâmetros de qualidade (ANTUNES *et al.* 2012).

A importância dos FMA tem sido reportada devido, principalmente ao fato de conseguirem, de maneira mais eficiente, obterem nutrientes para a planta. Em especial o fósforo (P), que é considerado o nutriente que mais limita a produtividade vegetal nos trópicos, isso se deve a composição dos solos nessas áreas, ricas em alumínio e ferro, que formam ligações com fósforo complexando-o e impedindo que seja absorvido pelas plantas (SOUZA, 2010). Os FMA são altamente especializados em absorver fósforo, graças a transportadores de fósforo inorgânico especializados, localizados nas hifas. Em adição a esse fato, o arbúsculo do FMA realiza a hidrólise de fosfato e então, através de mediadores da própria planta, o fósforo é absorvido (CARRINO-KIKER, *et al.* 2017). Vale salientar que o fósforo não é apenas importante para a planta, sem essa função haveria morte arbuscular, rompendo assim a simbiose (JAVOT *et al.* 2007).

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA VEGETAL

As plantas, pela sua natureza sésil, estão em constantes desafios ambientais onde diversos fatores bióticos e abióticos interferem no desenvolvimento vegetal, o que resulta em perda substancial de rendimento. Entretanto, as plantas desenvolveram ao longo da evolução estratégias de adaptação que envolvem modificações em sua estrutura morfológica, bioquímica e principalmente molecular. Tal conhecimento, impulsionado pelos avanços tecnológicos dos últimos anos, tornou possível a compreensão de respostas moleculares de plantas à estímulos ambientais.

Isso só foi possível graças aos avanços no campo de estudo relacionado a Proteômica, impulsionado pelas técnicas em espectrometria de massas, avanços em sequenciamento, depósito em banco de dados e novas ferramentas de bioinformática (KOMATSU, 2017). Portanto, como as proteínas regulam o funcionamento celular, entender as modulações proteicas é essencial, do ponto de vista molecular, devido sua proximidade ao fenótipo analisado.

O proteoma é entendido como o conjunto de proteínas de um determinado organismo, órgão, tecido ou célula, em uma determinada condição (tempo-espço). Atualmente a Análise Proteômica é considerada uma das principais áreas da Genômica funcional e se ancora em diferentes técnicas e abordagens, como por exemplo, uso ou não de géis de separação, e espectrometria de massas associadas a cromatografia líquida (LC-MS) (MUSTAFA, 2021).

Dentre as diferentes estratégias proteômicas que surgiram nas últimas décadas, todas tem em comum a busca por diferentes perfis de proteínas, avaliação de modificações pós-traducionais e interação entre os dados obtidos. Entretanto, o sucesso na exploração de proteínas depende de fatores essenciais, como extração, quantificação, separação, visualização e sua correta caracterização. Apesar dos avanços, existem barreiras que dificultam o trabalho, como o tamanho das proteínas, sua solubilidade, hidrofobicidade e abundância (KOMATSU, 2021).

A análise de expressão gênica, não reflete, necessariamente, a complexidade das respostas moleculares observadas em plantas. Sendo assim, nem sempre o padrão de transcritos correlaciona-se com as proteínas expressas. Desta forma, torna-se impossível elucidar com clareza os aspectos moleculares apenas levando em consideração os genes (GRAVES, 2002). Existem inúmeros mecanismos regulatórios que podem modificar, potencializar ou mesmo destruir um

transcrito, antes mesmo de ser traduzido em proteína. Portanto, proteínas identificadas por espectrometria de massas vêm ganhando cada vez mais espaço para o entendimento dos mecanismos moleculares (PAPPIREDDI, 2019).

2.4.1 Proteômica da interação Planta-FMA

Diversos trabalhos proteômicos envolvendo a interação de plantas com FMAs vem ganhando destaque no cenário atual, em partes, devido aos benefícios que alguns cultivares adquirem ao estabelecer esta associação. Porém, para entendermos estes benefícios que alguns cultivares adquirem ao associar-se com FMA é fundamental entender os mecanismos moleculares subjacentes.

Os FMAs podem atuar de maneira a potencializar, direta ou indiretamente, a produtividade de diversas variedades de plantas. Foi possível compreender, através de análises proteômicas, como os FMAs interferem desde a eficiência da fotossíntese, aumentando a quantidade de clorofilas, como também auxiliando plantas fitorremediadoras a serem mais eficientes (XI L, 2022).

Plantas com FMA podem ativar diversos mecanismos de contenção de estresses, como a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), transdução de sinais, fatores de transcrição e metabolismo em geral. Estudos proteômicos indicam uma modulação positiva no acúmulo de proteínas relacionadas à estresse salino, quando associadas ao FMA (JIA T, 2019).

Os FMAs contribuem com o aumento da tolerância das plantas ao estresse por déficit hídrico, possuem atuação direta e indiretamente na modulação de proteínas responsivas a danos oxidativos, provenientes de EROs, mais precisamente em proteínas sequestradoras, além de estudos identificarem proteínas de defesa da planta contra a patogênese (ZOU YN, 2020).

Os FMAs modulam o proteoma de plantas em diferentes vias metabólicas, como observado por OLALDE-PORTUAL (2020) que identificaram modulações nas vias fotossintéticas, metabolismo de carbono, fosforilação oxidativa e metabolismo de enxofre, que denota uma ampla gama de mudanças fisiometabólicas. Além disso, potencializa a defesa contra outros patógenos na planta, ativa sistemas de contenção, semelhante a um sistema “imune” e está envolvido diretamente com a produção de ácido jasmônico (VANNINI, 2021).

Diversos estudos buscam compreender a resposta proteômica da cana-de-açúcar sob estresses abióticos e bióticos, no entanto o mesmo não se aplica com trabalhos envolvendo FMA associados à cana-de-açúcar, o que dificulta a busca por pesquisas direcionadas. Dessa forma o presente trabalho busca, de forma inovadora, realizar a prospecção e caracterização de proteínas responsivas à FMA em cana-de-açúcar, sob déficit hídrico, haja vista o potencial biotecnológico implicado na descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos nessa interação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas diferencialmente acumuladas em cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e submetidas ao déficit hídrico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as respostas fisiológicas de duas variedades de cana-de-açúcar associadas à FMA em resposta à seca.
- Estabelecer o perfil proteômico total de raízes de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) submetidas ou não ao déficit hídrico.
- Identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em duas variedades de cana-de-açúcar relacionadas à inoculação micorrízica em resposta ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- Ahmad N, Malagoli M, Wirtz M and Hell R (2016) Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. *BMC Plant Biol* 16:247. doi:10.1186/s12870-016-0940-z
- Akhtar I and Nazir N (2013) Effect of Waterlogging and Drought Stress in Plants. *Env Sci* 7.
- Ali N and Anjum M (2016) Drought Stress: Major Cause of Low Yield and Productivity. *Austin Environ Sci* 1:1.
- Andreou, AZ., Hornung, E., Kunze, S. et al. On the Substrate Binding of Linoleate 9-Lipoxygenases. *Lipids* 44, 207 (2009)
<https://doi.org/10.1007/s11745-008-3264-4>
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS, et al. Catalase and ascorbate peroxidase representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(19):19002-19029. doi:10.1007/s11356-016-7309-6.
- Anli M, Baslam M, Tahiri A, Rklami A, Symanczik S, Boutasknit A, Ait-El-Mokhtar M, Ben-Laouane R, Toubali S, Ait Rahou Y, Ait Chitt M, Oufdou K, Mitsui T, Hafidi M, Meddich A (2020) Biofertilizers as strategies to improve photosynthetic apparatus, growth, and drought stress tolerance in the date palm. *Front Plant Sci* 11:1–21.
- Barkan A, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65:415-42. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040159. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24471833
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A and Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. *F1000Research* 5:1554. doi: 10.12688/f1000research.7678.1
- Basyal B, Emery SM. An arbuscular mycorrhizal fungus alters switchgrass growth, root architecture, and cell wall chemistry across a soil moisture gradient. *Mycorrhiza.* 2021 Mar;31(2):251-258. doi: 10.1007/s00572-020-00992-6. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33105490.
- Bernardo L, Morcia C, Carletti P, Ghizzoni R, Badeck FW, Rizza F, Lucini L and Terzi V (2017) Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *J Proteomics* 169:21–32. doi: 10.1016/j.jprot.2017.03.024.
- Calsa Júnior, T., Carraro, D.M., Benatti, M.R. et al. Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. *Curr Genet* 46, 366–373 (2004).
- Calsa T and Figueira A (2007) Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C₄ metabolism and putative antisense transcripts. *Plant Mol Biol* 63:745–762. doi: 10.1007/s11103-006-9121-z
- Carrino-Kyker, S. R. Et al. Detection of phosphate transporter genes from arbuscular mycorrhizal fungi in mature tree roots under experimental soil pH manipulation. *Symbiosis*, v. 72, n. 2, p. 123 – 133, 2017
- CGEE (2016) Desertificação, degradação da terra e secas no Brasil. Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bessalho Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, de Oliveira Figueira AV, de Sousa Filgueiras T et al. (2011a) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol* 4:62–89. doi: 10.1007/s12042-011-9068-3

- Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bespalhok Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, de Oliveira Figueira AV, de Sousa Filgueiras T et al. (2011b) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol* 4:62–89. doi: 10.1007/s12042-011-9068-3
- Choudhary A, Kumar A and Kaur N (2020) ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Divers* 42:33–43. doi: 10.1016/j.pld.2019.10.002
- Christenhusz MJM and Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261:201. doi: 10.11646/phytotaxa.261.3.1
- CONAB (2020) Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.
- Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav* 3:156–165. doi: 10.4161/psb.3.3.5536
- D’Hont A, Grivet L, Feldmann P, Glaszmann JC, Rao S and Berding N (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet MGG* 250:405–413. doi: 10.1007/BF02174028
- Dai A (2011) Drought under global warming: a review: Drought under global warming. *Wiley Interdiscip Rev Clim Change* 2:45–65. doi: 10.1002/wcc.81
- Daniels J and Roach BT (1987) Taxonomy and Evolution. *Developments in Crop Science*. Elsevier, pp 7–84
- de Moraes LK, de Aguiar MS, de Albuquerque e Silva P, Câmara TMM, Cursi DE, Júnior ARF, Chapola RG, Carneiro MS and Bespalhok Filho JC (2015) Breeding of Sugarcane. In: Cruz VMV and Dierig DA (eds) *Industrial Crops*. Springer New York, New York, NY, pp 29–42
- Dias HB and Sentelhas PC (2018) Sugarcane yield gap analysis in Brazil – A multi-model approach for determining magnitudes and causes. *Sci Total Environ* 637–638:1127–1136. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.017
- FAO (2019) World food and agriculture statistical pocketbook 2019.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D and Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212. doi: 10.1051/agro:2008021
- Ferreira PAA, Tiecher T, Tiecher TL, Rangel W de M, Soares CRFS, Deuner S, Tarouco CP, Giachini AJ, Nicoloso FT, Brunetto G et al. (2018) Effects of *Rhizophagus clarus* and P availability in the tolerance and physiological response of *Mucuna cinereum* to copper. *Plant Physiol Biochem* 122:46–56. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.11.006
- Göbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S: Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1584: 55-64.
- Gohari A, Eslamian S, Abedi-Koupaei J, Massah Bavani A, Wang D and Madani K (2013) Climate change impacts on crop production in Iran’s Zayandeh-Rud River Basin. *Sci Total Environ* 442:405–419. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.029
- Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI and Sentíes-Herrera HE (2014) Sugarcane as a Novel Biofactory: Potentialities and Challenges. In: Guevara-Gonzalez R and Torres-Pacheco I (eds) *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. Springer International Publishing, Cham, pp 129–149.
- Graves PR, Haystead TA. *Molecular biologist's guide to proteomics*.

- Hai NN, Chuong NN, Tu NHC, Kisiala A, Hoang XLT, Thao NP. Role and Regulation of Cytokinins in Plant Response to Drought Stress. *Plants (Basel)*. 2020 Mar 31;9(4):422. doi: 10.3390/plants9040422.
- Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ and Tran L-SP (2016). Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2. doi: 10.1007/978-3-319-32423-4
- Humberto H. Carvalho, Priscila A. Silva, Giselle C. Mendes, Otávio J.B. Brustolini, Maiana R. Pimenta, Bianca C. Gouveia, Maria Anete S. Valente, Humberto J.O. Ramos, Juliana R.L. Soares-Ramos, and Elizabeth P.B. Fontes * Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. *Plant Physiology*, February 2014, Vol. 164, pp. 654–670.
- Hwang IS, Hwang BK: The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol*. 2010, 152: 948-967. 10.1104/pp.109.147827.
- Iqbal MA, Iqbal A, Ali K, Ali H, Khan RD, Ahmad B, Nabeel F and Raza A (2015) Integration of Forage Sorghum and By-Products of Sugarcane and Sugar Beet Industries for Ruminant Nutrition: A Review. 10.
- Ivanov, S., Austin, J., Berg, RH et al. Extensos sistemas de membranas na interface hospedeiro-fungo micorrízico arbuscular. *Nature Plants* 5, 194-203 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>.
- Jacott, C. N.; Murray, J. D.; Ridout, C. J. Trade-Offs in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Disease Resistance, Growth Responses and Perspectives for Crop Breeding. *Agronomy*, v. 7, n. 4, p. 75, 1 dez. 2017.
- Jaiswal D, De Souza AP, Larsen S, LeBauer DS, Miguez FE, Sparovek G, Bollero G, Buckeridge MS and Long SP (2017) Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. *Nat Clim Change* 7:788–792. doi: 10.1038/nclimate3410
- Jia T, Wang J, Chang W, Fan X, Sui X, Song F. Proteomics Analysis of *E. angustifolia* Seedlings Inoculated with Arbuscular Mycorrhizal Fungi under Salt Stress. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 12;20(3):788. doi: 10.3390/ijms20030788. PMID: 30759832; PMCID: PMC6386820.
- Kellogg EA (2013) C4 photosynthesis. *Curr Biol* 23:R594–R599. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.066
- Kline KL, Msangi S, Dale VH, Woods J, Souza GM, Osseweijer P, Clancy JS, Hilbert JA, Johnson FX, McDonnell PC et al. (2017) Reconciling food security and bioenergy: priorities for action. *GCB Bioenergy* 9:557–576. doi: 10.1111/gcbb.12366
- Klingler JP, Batelli G and Zhu J-K (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot* 61:3199–3210. doi: 10.1093/jxb/erq151
- Komatsu S, Hossain Z. Preface-Plant Proteomic Research. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 4;18(1):88. doi: 10.3390/ijms18010088. PMID: 28054969; PMCID: PMC5297722.
- Komatsu S, Jorin-Novo JV. Plant Proteomic Research 3.0: Challenges and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 14;22(2):766. doi: 10.3390/ijms22020766. PMID: 33466599; PMCID: PMC7828657.
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X and Harper JF (2002) Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol* 130:2129–2141. doi: 10.1104/pp.008532
- Langdale JA (2011) C 4 Cycles: Past, Present, and Future Research on C 4

- Photosynthesis. *Plant Cell* 23:3879–3892. doi: 10.1105/tpc.111.092098
- Li Y, Duan T, Nan Z, Li Y. Arbuscular mycorrhizal fungus alleviates alfalfa leaf spots caused by *Phoma medicaginis* revealed by RNA-seq analysis. *J Appl Microbiol*. 2021 Feb;130(2):547-560. doi: 10.1111/jam.14387. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31310670.
- Lim CW, Han SW, Hwang IS, Kim DS, Hwang BK, Lee SC. The Pepper Lipoyxygenase CaLOX1 Plays a Role in Osmotic, Drought and High Salinity Stress Response. *Plant Cell Physiol*. 2015 May;56(5):930-42. doi: 10.1093/pcp/pcv020. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25657344.
- Lisar SYS, Motafakkerazad R, Hossain MM and Rahman IMM (2012) Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. *Water Stress* 16.
- Long SP, Karp A, Buckeridge MS, Davisd SC, Jaiswala D, Mooree PH, Moosea SP, Murphy DJ, Onwona-Agyemang S and Vonshakh A (2015) Feedstocks for biofuels and bioenergy. *Bioenergy Sustain. Bridg. Gaps*
- Lopes MS, Araus JL, van Heerden PDR and Foyer CH (2011) Enhancing drought tolerance in C4 crops. *J Exp Bot* 62:3135–3153. doi: 10.1093/jxb/err105
- Lv G-Y, Guo X-G, Xie L-P, Xie C-G, Zhang X-H, Yang Y, Xiao L, Tang Y-Y, Pan X-L, Guo A-G and Xu H (2017) Molecular Characterization, Gene Evolution, and Expression Analysis of the Fructose-1, 6-bisphosphate Aldolase (FBA) Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci*. 8:1030. doi: 10.3389/fpls.2017.01030
- Maarja Öpik, John Davison, Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity, *Fungal Ecology*, Volume 24, Part B, 2016, Pages 106-113, ISSN 1754-5048, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.07.005>.
- Mabuchi K, Maki H, Itaya T, Suzuki T, Nomoto M, Sakaoka S, Morikami A, Higashiyama T, Tada Y, Busch W et al. (2018) MYB30 links ROS signaling, root cell elongation, and plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 115:E4710–E4719. doi: 10.1073/pnas.1804233115
- Maria Anete S. Valente¹, Jerusa A. Q. A. Faria¹, Juliana R. L. Soares-Ramos¹, Pedro A. B. Reis¹, Guilherme L. Pinheiro¹, Newton D. Piovesan¹, Ange´lica T. Morais², Carlos C. Menezes³, Marco A. O. Cano⁴, Luciano G. Fietto¹, Marcelo E. Loureiro⁴, Francisco J. L. Araga˜o² and Elizabeth P. B. Fontes¹, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 2, pp.533–546, 2009 doi:10.1093/jxb/ern296
- Marin F and Nassif DSP (2013) Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. *Rev Bras Eng Agríc E Ambient* 17:232–239. doi: 10.1590/S1415-43662013000200015
- Mathieu, S., Cusant, L., Roux, C. e Corradi, N. (2018), Fungos micorrízicos arbusculares: diversidade intraespecífica e pangenomas. *Novo Phytol*, 220: 1129-1134. <https://doi.org/10.1111/nph.15275>
- Mehnaz S (2013) Microbes - friends and foes of sugarcane: Microbes and sugarcane. *J Basic Microbiol* 53:954–971. doi: 10.1002/jobm.201200299
- Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):39-63. doi:10.1128/mubr.66.1.39-63.2002
- Ming R, Moore PH, Wu K-K, D'hont A, Glaszmann JC, Tew TL, Mirkov TE, da Silva J, Jifon J, Rai M et al. (2010) Sugarcane Improvement through

- Breeding and Biotechnology. In: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, pp 15–118
- Mirshad PP and Puthur JT (2016) Arbuscular mycorrhizal association enhances drought tolerance potential of promising bioenergy grass (*Saccharum arundinaceum* retz.). *Environ Monit Assess* 188:425. doi: 10.1007/s10661-016-5428-7
- Mita G, Fasano P, De Domenico S, Perrone G, Epifani F, Iannacone R, Casey R, Santino A: 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/*Aspergillus carbonarius* interaction. *J Exp Botany*. 2007, 58: 1803-1811. 10.1093/jxb/erm039
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11:15–19. doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.002
- Mollavali M, Perner H, Rohn S, Riehle P, Hanschen FS and Schwarz D (2018) Nitrogen form and mycorrhizal inoculation amount and timing affect flavonol biosynthesis in onion (*Allium cepa* L.). *Mycorrhiza* 28:59–70. doi: 10.1007/s00572-017-0799-3
- Mustafa G, Komatsu S. Plant proteomic research for improvement of food crops under stresses: a review. *Mol Omics*. 2021 Dec 6;17(6):860-880. doi: 10.1039/d1mo00151e. PMID: 34870299.
- Nosratpour MJ, Karimi K and Sadeghi M (2018) Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. *J Environ Manage* 226:329–339. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.058
- Nova Cana (2018a) Longa estiagem ameaça reduzir produção de cana no centro-sul do Brasil | novaCana.com. <https://www.novacana.com/n/cana/safra/longa-estiagem-ameaca-reduzir-producao-cana-centro-sul-brasil-280818>. Accessed 30 Apr 2019
- Nova Cana (2018b) Seca reduzirá safra de cana-de-açúcar no Brasil, prevê Cofco | novaCana.com. <https://www.novacana.com/n/cana/safra/seca-safra-cana-de-acucar-brasil-cofco-210618>. Accessed 30 Jun 2018
- Nova Cana (2020) Seca reduz produtividade da cana em outubro, mas safra 2020/21 deve acumular alta | novaCana.com. <https://www.novacana.com/n/cana/safra/seca-reduz-produtividade-cana-outubro-safra-2020-21-acumular-alta-241120>. Accessed 24 Nov 2020
- Nova Cana (2021) Falta de chuvas em Alagoas afeta produção da cana-de-açúcar | novaCana.com. <https://www.novacana.com/n/cana/safra/falta-chuvas-alagoas-afeta-producao-cana-de-acucar-170221>. Accessed 17 Feb 2021
- Olalde-Portugal V, Cabrera-Ponce JL, Gastelum-Arellanez A, Guerrero-Rangel A, Winkler R, Valdés-Rodríguez S. Proteomic analysis and interactions network in leaves of mycorrhizal and nonmycorrhizal sorghum plants under water deficit. *PeerJ*. 2020 Apr 23;8:e8991. doi: 10.7717/peerj.8991. PMID: 32351787; PMCID: PMC7183753.
- Oldroyd, G. E. D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Reviews*, v. 11, p. 252 – 263, 2013.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K and Tran L-SP (2014) Response of plants to water stress. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- Pappireddi N, Martin L, Wühr M. A Review on Quantitative Multiplexed

- Pawlowska TE. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Oct 15;251(2):185-92. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.007.
- Proteomics. *Chembiochem.* 2019;20(10):1210-1224. doi:10.1002/cbic.201800650
- Raklami A, Bechtaoui N, Tahiri A-I, Anli M, Meddich A, Oufdou K (2019) Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility. *Front Microbiol* 10:1–11.
- Redecker, D.; Morton, J.B. & Bruns, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molec. Phylog. Evol.*, 14:276-284, 2000
- Sayed N, Wink M. *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott Fruits Increase Stress Resistance and Exert Antioxidant Properties in *Caenorhabditis elegans* and Mouse Models. *Molecules.* 2019;24(14):2633. Published 2019 Jul 19. doi:10.3390/molecules24142633.
- Shearman JR, Sonthirod C, Naktang C, Pootakham W, Yoocha T, Sangsrakru D, Jomchai N, Tragoonrung S and Tangphatsornruang S (2016) The two chromosomes of the mitochondrial genome of a sugarcane cultivar: assembly and recombination analysis using long PacBio reads. *Sci Rep* 6:31533. doi: 10.1038/srep31533
- SIAMIG (2019) Setor sucroenergético representa 2% do PIB brasileiro, afirma diretor do ITC — Siamig. <http://www.siamig.com.br/noticias/setor-sucroenergetico-representa-2-do-pib-brasileiro-afirma-diretor-do-itc>. Accessed 7 Aug 2019
- Souza GM, Van Sluys M-A, Lembke CG, Lee H, Margarido GRA, Hotta CT, Gaiarsa JW, Diniz AL, Oliveira M de M, Ferreira S de S et al. (2019) Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. *GigaScience* 8:giz129. doi: 10.1093/gigascience/giz129
- Souza, F. A. de; Stürmer, S. L.; Carenho, R. C.; Trufem, S. F. B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: Siqueira, J. O.; Souza, F. A.; Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. (Eds). *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 16 – 73.
- Stefan Fuchs, Erwin Grill, Irute Meskiene and Alois Schweighofer. Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal* 280 (2013) 681–693
- Sun Z, Song J, Xin X, Xie X and Zhao B (2018) Arbuscular Mycorrhizal Fungal 14-3-3 Proteins Are Involved in Arbuscule Formation and Responses to Abiotic Stresses During AM Symbiosis. *Front Microbiol* 9:91. doi: 10.3389/fmicb.2018.00091
- Tahiri, Ai., Raklami, A., Bechtaoui, N. et al. Beneficial Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Compost on Lettuce (*Lactuca sativa*) Growth Under Field Conditions. *Gesunde Pflanzen* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10343-021-00604-z>
- Telles MR, Saran LM and Unêda-Trevisolli SH (2011) Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. 2:52–63.
- Thirugnanasambandam PP, Hoang NV and Henry RJ (2018) The Challenge of Analyzing the Sugarcane Genome. *Front Plant Sci* 9:616. doi: 10.3389/fpls.2018.00616
- Toubali S, Tahiri A, Anli M, Symanczik S, Boutasknit A, Ait-El-Mokhtar M, Ben-Laouane R, Oufdou K, Ait-Rahou Y, Ben-Ahmed H, Jemo M, Hafidi M, Meddich A (2020) Physiological and biochemical behaviors of date palm

- vitroplants treated with microbial consortia and compost in response to salt stress. *Appl Sci* 10(23):8665. <https://doi.org/10.3390/app10238665>
- UNICA (2013) Usina pioneira de etanol celulósico coloca Brasil entre líderes UNICA. <https://unica.com.br/noticias/usina-pioneira-de-etanol-celulsico-coloca-brasil-entre-lderes-globais-no-uso-da-nova-tecnologia/>. Accessed 6 May 2020
- Vannini C, Domingo G, Fiorilli V, Seco DG, Novero M, Marsoni M, Wisniewski-Dye F, Bracale M, Moulin L, Bonfante P. Proteomic analysis reveals how pairing of a Mycorrhizal fungus with plant growth-promoting bacteria modulates growth and defense in wheat. *Plant Cell Environ.* 2021 Jun;44(6):1946-1960. doi: 10.1111/pce.14039. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33675052.
- Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Arruda P. (2001) The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.* 24 (1-4) • Dec 2001. Viswanath, K.K., Varakumar, P., Pamuru, R.R. et al. Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. *J. Plant Biol.* 63, 83–95 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09241-x>
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH and Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8:263–276. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00491.x
- Woiciechowski AL, Medeiros ABP, Rodrigues C, de Souza Vandenberghe LP, de Andrade Tanobe VO, Dall'Agnol A, Gazzoni DL and Soccol CR (2016) Feedstocks for Biofuels. In: Soccol CR, Brar SK, Faulds C and Ramos LP (eds) *Green Fuels Technology*. Springer International Publishing, Cham, pp 15–39
- Xi L, Shen Y, Zhao X, Zhou M, Mi Y, Li X, Chen H, Wei Y, Su H, Hou H. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on frond antimony enrichment, morphology, and proteomics in *Pteris cretica* var. *nervosa* during antimony phytoremediation. *Sci Total Environ.* 2022 Jan 15;804:149904. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149904. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34508929.
- Yadav S and Sharma KD (2016) Molecular and Morphophysiological Analysis of Drought Stress in Plants. *Plant Growth*. doi: 10.5772/65246
- Zakaria ZA, Aguilar CN, Kusumaningtyas RD and Binod P (2020) Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume II: Non-Biological Approaches. doi: 10.1007/978-3-030-39208-6
- Zhang XL, Jiang L, Xin Q, Liu Y, Tan JX and Chen ZZ (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2015.00088
- Zou YN, Wu QS, Kuča K. Unravelling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. *Plant Biol (Stuttg)*. 2021 May;23 Suppl 1:50-57. doi: 10.1111/plb.13161. Epub 2020 Oct 12. PMID: 32745347.

CAPÍTULO 1

**Manuscrito a ser submetido na revista Molecular & Cellular Proteomics,
qualis A1 na área CB1**

CAPÍTULO 1 - PROTEÔMICA LABEL-FREE DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR ASSOCIADA A FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES REVELA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO

Elton Pedro Nunes Pena ^{1,6}; Lucas Carvalho de Freitas ^{1,6}; José Mogahid Fachine ^{1,6}; José de Paula Oliveira ²; Rafael Borges da Silva Valadares³; Felipe Trindade³; Fabiana Aparecida Cavalcante Silva⁴; Tercilio Calsa Junior ^{5,6*}

¹ Discente do Programa de Pós-Graduação em Genética – Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco; ²Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA; ³Instituto Tecnológico Vale – ITV; ⁴Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Fidelidade Genética – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE; ⁵Docente do Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco; ⁶ Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas – Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco.

* Autor para correspondência: Tercilio Calsa Junior. E-mail: tercilio.calsaj@ufpe.br

Destaques:

As diferentes variedades de cana-de-açúcar interagiram de formas diferentes com as espécies de fungo;

A presença dos FMAs mitigou o estresse nas plantas;

Foram identificadas 29 proteínas diferencialmente acumuladas;

As proteínas indetificadas na condição submetida a déficit hídrico colonizada por FMADH estão relacionadas ao processo de crescimento radicular, lignificação e respostas induzidas por hormônios.

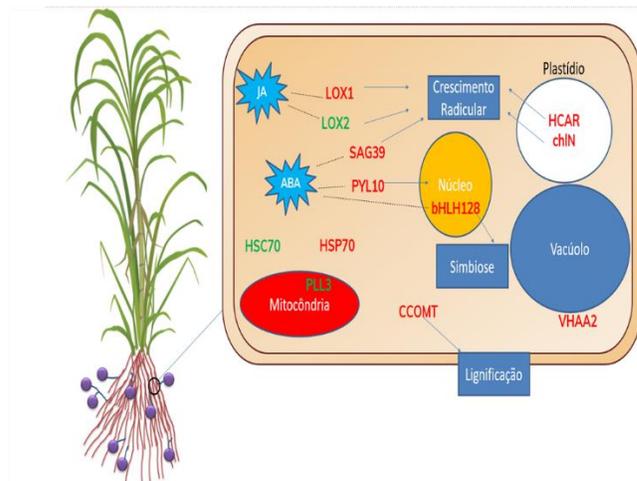
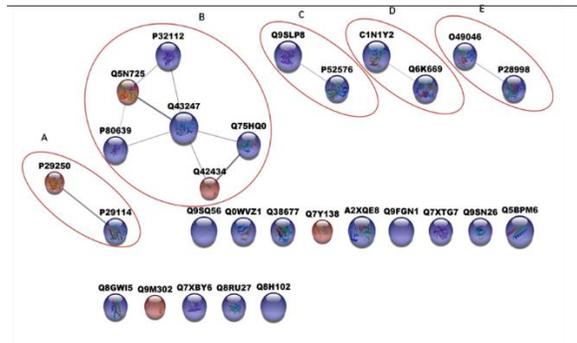
RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais fatores limitantes da produtividade da cana-de-açúcar, principalmente na região Nordeste do Brasil. A associação simbiótica de plantas com microrganismos como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem mitigar os efeitos do déficit hídrico através da modulação da expressão de genes e acúmulo de proteínas e metabólitos específicos. Neste trabalho foram analisadas as alterações fisiológicas, morfométricas e proteômicas em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) associadas a FMAs e submetidas ao déficit hídrico. As plantas foram propagadas em vasos inoculados ou não com esporos de *Dentiscutata heterogama* (FMADH) ou *Claroideoglossum etunicatum* (FMACG) e, quatro meses após a inoculação, os vasos foram submetidos ao déficit hídrico por sete dias. Em seguida, foi retomada a hidratação. Os dados fisiológicos e morfométricos indicaram a variedade RB867515 com maior taxa de colonização por FMADH, e, nesta condição, maior tolerância ao estresse por déficit hídrico e resposta de recuperação. A análise proteômica, aplicada a plantas de RB867515 submetidas ao déficit hídrico e inoculadas ou não por FMADH, permitiu a identificação de 399 proteínas, das quais 29 mostraram acúmulo significativamente variável entre tratamentos, sendo cinco mais acumuladas no controle não-inoculado e 24 mais acumuladas em plantas inoculadas com FMADH. Dentre as proteínas identificadas, destaca-se o receptor de ácido abscísico PYL10, potencialmente mais acumulado em resposta à micorrização. Os dados obtidos poderão auxiliar na elucidação dos mecanismos de simbiose na interação cana-de-açúcar x micorriza, assim como de tolerância ao déficit hídrico, úteis no desenvolvimento de novas variedades.

Palavras-chave: *Saccharum*; FMA; Proteoma; Estresse abiótico; LC-MS/MS.

RESUMO GRÁFICO

Parâmetros	RB867515		RB111443	
	FMADH	FMACG	FMADH	FMACG
Comprimento Radicular	+++	++	++	+++
Comprimento Foliar	++	+	++	+
Largura Foliar	++	++	+	+
Colonização	+++	+++	++	++
Carotenoides	+++	+++	+	+
Teor Relativo de água	++	++	+	+
Comprimento do Colmo	++	++	+	++



INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos configuram-se como os principais responsáveis por ocasionar de 50 a 70 % das perdas na agricultura, conjuntamente com as ações antrópicas, interferindo na produtividade e na expansão das culturas (1). Dentre eles destaca-se o estresse por déficit hídrico que se configura como um dos principais fatores limitantes para a indústria canavieira, sendo responsável por grandes perdas na produção, principalmente na região Nordeste.

O estresse por déficit hídrico interfere no desenvolvimento da planta por prejudicar o crescimento das raízes, a assimilação de nutrientes, a captação de CO₂ devido ao fechamento dos estômatos, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem oxidar as membranas e as proteínas presentes nos fotossistemas, com isso comprometendo a fotossíntese (2).

Com o intuito de reduzir as perdas ocasionadas pelo déficit hídrico no setor canavieiro, diversos cultivares foram desenvolvidos por meio do melhoramento clássico, como o cultivar RB867515 e RB041443, variedades consideradas tolerantes ao déficit hídrico. Contudo, com avanço nas mudanças climáticas, aumento nas áreas de desertificação no mundo e demora para obtenção de novas cultivares por meio do melhoramento clássico, surge a necessidade de pesquisas envolvendo uso de microrganismos, como FMAs, frente a estresses ambientais.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são microrganismos endofíticos que colonizam os tecidos vegetais e contribuem para o crescimento das plantas. Os vegetais fornecem carbono para o desenvolvimento dos endofíticos, por conseguinte esse simbiote promove melhor captação de água e nutrientes (3), como fósforo e nitrogênio (4), aumento na produção de metabólitos secundários (5), confere defesa contra patógenos, ajustamento osmótico e tolerância a estresses abióticos (5, 6, 7). Esta tolerância é, em parte, observada pelo aumento de enzimas antioxidantes e de osmoprotetores em plantas submetidas à seca inoculadas com FMA em relação a plantas não inoculadas (6, 8).

A interação planta-simbiote em resposta ao déficit hídrico gera alterações nos mecanismos de resposta das plantas, que podem ser analisadas por diversas ferramentas moleculares. Dentre estas, destaca-se a análise proteômica, que visa

identificar de forma quali-quantitativa proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) presentes no proteoma de um organismo sob diferentes condições biológicas, fornecendo assim descrições detalhadas das modificações que a interação endossimbiótica causa no metabolismo da planta (9, 10).

Apesar da literatura referente aos mecanismos moleculares da interação planta-FMA não ser abrangente, principalmente, quando associado ao déficit hídrico, os benefícios já descritos dessa interação incluem a ativação de vias moleculares relacionadas com síntese de hormônios (11, 12, 13), acúmulo de proteínas envolvidas com a tolerância a estresses bióticos e abióticos, sobretudo, enzimas antioxidantes como as peroxidases (14), assim como proteínas envolvidas na obtenção de água e nutrientes (principalmente N e P), como aquaporinas e fosfatases (15).

Portanto, além do entendimento das respostas moleculares associadas aos benefícios da interação endossimbiótica, a análise proteômica pode contribuir na identificação de marcadores funcionais relacionados a maior interação das plantas com microrganismos benéficos e a maior tolerância a estresses, promovendo assim a obtenção de novas variedades e impulsionando a atividade canavieira. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo analisar as alterações fisiológicas e proteômicas das raízes de cana-de-açúcar associados a FMAs e submetidas ao déficit hídrico.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1. Material biológico e delineamento experimental

Foram utilizados segmentos de colmo de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB041443 gentilmente fornecidos pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Os inóculos de fungos micorrízicos arbusculares utilizados foram *Dentiscutata heterogama* e *Claroideoglossum etunicatum*, gentilmente fornecido pelo Laboratório de Biologia dos Solos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (8°03'49.1"S 34°55'30.3"W).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no IPA. Segmentos de colmo de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB041443, foram tratados termicamente para desinfecção segundo conforme a metodologia de Tokeshi (16). Em seguida, foram propagados em bandejas contendo subsolo de argissolo vermelho-amarelo autoclavado. Após dez dias do plantio, as plântulas brotadas foram transplantadas para 72 vasos, cada um contendo 8 kg do mesmo subsolo autoclavado. No momento do transplante, 36 vasos foram inoculados com 200 esporos de FMA sendo 18 vasos com *Dentiscutata heterogama* (FMADH) e 18 vasos com *Claroideoglossum etunicatum* (FMACG). As plantas foram regadas com solução de Hoagland (1/2 x) com ausência de fósforo (17) e água destilada em dias alternados. Após 110 dias do transplante, metade das plantas foram submetidas à supressão de rega por 7 dias. Plantas controle permaneceram com irrigação constante, a 70% da capacidade de pote. Após 117 dias de transplante, foram realizadas as medidas morfométricas de folhas e raízes, e estas foram coletadas para as análises de fisiologia, colonização por micorriza e análise proteômica label free.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2x6, com seis tratamentos utilizando dois FMAs: 1- plantas irrigadas não inoculadas, 2- plantas irrigadas e inoculadas com FMA, 3- plantas submetidas ao déficit hídrico não inoculadas, 4- plantas submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com FMA; 5 – plantas reidratadas não inoculadas e 6 – plantas reidratadas inoculadas com FMA. Cada tratamento possuiu 3 repetições, totalizando 72 unidades experimentais.

2. Análises fisiológicas e morfométricas

Para o teor relativo de água (TRA) foram utilizados fragmentos radiculares coletados e imediatamente pesados para obtenção do peso da massa fresca (PMF). Em seguida, os fragmentos foram acondicionados em placas de Petri, com papel filtro, contendo 10 mL de água destilada e deixadas em geladeira por um período de 24 h. Após este período, foram novamente pesados para obtenção do peso da massa túrgida (PMT). Por fim, foram colocados em estufa por dois dias para secar,

e após, foram pesados obtendo-se a massa seca (PMS). O TRA radicular calculado conforme a fórmula de Barrs e Weatherley (18). A fim de certificar que as plantas estavam sobre déficit hídrico, foi avaliado o teor hídrico no solo (THS) conforme a metodologia de Robert et al (19).

Para análise do teor de carotenoides radiculares foram utilizados 100 mg de raízes da região do terço médio, e os pigmentos foram dosados conforme a metodologia Lichtenthaler (20).

As medidas morfométricas foram obtidas utilizando-se régua para mensuração do comprimento e largura foliar, comprimento radicular e altura do colmo, e contagem do número de entrenós. Para determinação da colonização micorrízica (CM), as raízes foram tratadas e coradas pelo método de Vierheilig et al (21) e analisadas conforme metodologia de Giovannetti & Mosse (22).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5 % probabilidade, através do programa estatístico GraphPadPrism 8 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

3. Análise Proteômica

3.1. Preparação das proteínas e digestão trípica

As proteínas solúveis totais radiculares da variedade RB867515 submetida ao déficit hídrico e inoculação com FMDH foram extraídas pelo método fenólico de Wang et al (2006) com modificações. Em seguida as amostras foram quantificadas em fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante e em seguida submetidas à eletroforese em géis SDS-PAGE (12,5 % de poliacrilamida) para certificação da integridade das proteínas extraídas. O processo de digestão trípica (TrypsinGold, Promega, WI, USA) seguida de dessalinização em coluna C18Sep-Pack (Oasis) para extração em fase sólida foi realizado conforme metodologia de Nascimento et al (2018).

3.2. Espectrometria de massas UPLC-MS e identificação das proteínas

As amostras obtidas foram injetadas em cromatógrafo Nano ACQUITY UPLC® (Waters Corp.) equipado com tecnologia de diluição online 2D e acoplado ao espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters), do Instituto Tecnológico Vale – ITV (Belém, PA, Brasil).

A primeira dimensão cromatográfica foi realizada a partir de uma alíquota de 4,5 µg de cada amostra em coluna de fase reversa BEH C18 300 Å, 5 µM 300 µm x 50 mm (XBridge™, Waters Corp.) e taxa de fluxo de 2 µL.min⁻¹. A segunda dimensão cromatográfica foi realizada em coluna C18 de 100 µm x 10 mm empacotada com partículas híbridas de superfície alterada (CSH) de 1,8 µm (Acquity UPLC M-Class CSH C18, Waters Corp., Milford, MA). Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Synapt G2-S equipado com fonte de ionização por *electrospray* padrão (ESI, Waters) e operado no modo de resolução de íons positivos para todas as medições. Os espectros de massa foram adquiridos em modo contínuo em faixa de *m/z* 50-1200 Da, usando tensão capilar de 2,6 KV, temperatura da fonte 100°C, tensão de compensação da fonte 100 V, fluxo de gás do cone de 50 L.h⁻¹ e cone tensão de 40 V. O tempo de aquisição espectral em cada ajuste de energia foi de 0,5 s. Foi usada solução a 0,2 µM Glu1-fibrinopeptídeo (785,8427 Da) como massa fixa, fornecida a uma taxa de fluxo de 0,5 µL.min⁻¹ usando bomba auxiliar do sistema de cromatografia líquida. A massa de bloqueio foi amostrada a cada 30 s em varreduras de 0,1 s na mesma faixa de massa.

Para a identificação presumível das proteínas, os dados brutos de MS foram processados no software Progenesis QI for Proteomics (QI) utilizando os bancos de dados via Protein Lynx Global Server (PLGS) 3.0.2 (Waters Corp, Milford, MA, EUA) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Foram utilizados os seguintes parâmetros: i) modificação fixa: carbamidometilação (C), ii) modificações variáveis: oxidação (M) desaminação (N), amidação (C-terminal) e fosforilação (STY), e iii) taxa de falsa descoberta de peptídeos (FDR) de 1%. A seleção das proteínas para validação foi realizada com base no valor de ANOVA significativa maior que 95% ($p < 0,05$) e $\log_2(\text{FC}, \textit{fold change})$ na comparação entre plantas da variedade RB867515 sob déficit hídrico inoculadas ou não com FMADH.

3.3. Ontologia gênica e interação proteína-proteína (PPI)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico no programa OmicsBox/Blast2GO (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), utilizando as ferramentas Blastp, InterProScan e GO-Slim (25). A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto das DAPs de cada tratamento foram utilizadas em todas as comparações.

As análises de PPI foram realizadas usando StringApp na plataforma Cytoscape (versão: 3.8.0) (26). No software foi importada a rede do banco de dados STRING v. 11.0 (<https://string-db.org/>) utilizando os seguintes parâmetros: i) Banco de dados: STRING: protein query, ii) Espécie: *Arabidopsis thaliana*, iii) cutoff: confiança média (0,4) e métodos de previsão: vizinhança conservada, coocorrência, fusão, coexpressão, experimentos, bancos de dados e mineração de texto. Adicionalmente, foi importada a tabela com os dados $\log_2(\text{FC})$ dos tratamentos. Cada tratamento foi identificado por duas cores diferentes e cada proteína mapeada foi diferenciada conforme o $\log_2(\text{FC})$.

RESULTADOS

Os tratamentos hídricos (Irrigado, déficit hídrico e recuperação) e espécies de FMA avaliados afetaram de forma distinta as variáveis fisiológicas e de desenvolvimento. Do ponto de vista fisiológico, foi observado que houve redução significativa do TRA nas raízes sob déficit hídrico em ambas as variedades e FMAs. A variedade RB867515 demonstrou melhor capacidade de recuperação após o estresse em relação a RB041443 uma vez que houve redução do conteúdo hídrico da raiz durante o estresse e maior eficiência na recuperação (Figura 1). A existência do déficit hídrico nas plantas avaliadas foi comprovada a partir da análise do Teor hídrico do Solo que apresentou redução nos tratamentos sob seca enquanto aqueles irrigados mantiveram-se estáveis (Figura 2).

O teor de carotenoides radiculares foi altamente responsivo a associação simbiótica entre as variedades de cana-de-açúcar RB867515 e ambos os FMAs. O FMADH foi estatisticamente similar à condição irrigada enquanto sob recuperação não apresentou resposta significativa. O FMACG por sua vez induziu produção de carotenoides nas três condições hídricas com resposta similar ao FMADH sob déficit hídrico, porém, revelou índice superior com a planta em recuperação. Na variedade RB041443 o teor de carotenoides se manteve constante exceto por uma redução significativa em FMADH sob déficit hídrico (Figura 3).

Considerando os parâmetros morfométricos de forma geral os FMAs induziram alterações morfológicas nas plantas uma vez que em ambas houve desenvolvimento superior ao tratamento sem FMA. A variedade RB867515, associada a ambos os FMAs, foi notadamente superior em relação a RB041443 na avaliação dos parâmetros comprimento radicular (Figura 4) e largura e comprimento foliar (Figura 5). A variedade 1443 apresentou discreta superioridade quanto ao número de entrenós (NE) e comprimento do colmo (CC) quando em associação com FMACG.

O Teste de Colonização Micorrízica (CM) demonstrou a forte influência da presença de FMA sobre ambas as variedades de cana-de-açúcar, havendo maior índice de multiplicação de esporos na associação entre RB867515 e FMADH, em relação a RB11443 com FMADH (Figura 6).

Com base nos dados fisiológicos, morfométricos e índice de colonização para a análise proteômica foi selecionada a variedade RB867515 de cana-de-açúcar, que apresentou maior adaptação à colonização e melhor desenvolvimento em condições de déficit hídrico. Da mesma forma foi selecionado o isolado *Dentiscutata heterogama* de FMA que demonstra maior adaptabilidade à simbiose com RB867515 (Tabela 1).

Foram identificadas 29 DAPS na variedade RB867515 sob déficit hídrico, sendo 5 identificadas na condição controle (não-colonizadas por *Dentiscutata heterogama*) e 24 após inoculação com DH (Tabela 2 e 3). A análise de ontologia genica das DAPs identificadas revelou que as proteínas do tratamento não-

inoculado com FMADH e inoculado foram distribuídas em 16 e 30 categorias, respectivamente (Figura 7).

Com relação a rede de interação proteína-proteína foi observado a presença de 5 clusters (Figura 8). No cluster A foi observado a presença de duas isoformas da Linoleico 9S-lipoxigenase (LOX), a LOX1(mais acumulada no tratamento com FMA) e LOX2 (menos acumulada no tratamento com FMA) envolvidas com síntese de ácidos graxos. No cluster B foi observado a presença de 6 proteínas relacionadas a biossíntese de carboidratos proteínas, Frutose-bisfosfato aldolase 3 e HSC70 (menos acumulados no tratamento com FMA), e Adenosilhomocisteinase, HSP70, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 e Fator de tradução IE5A (mais acumuladas no tratamento com FMA). No cluster C foi observado apenas proteínas mais acumuladas na presença do FMADH, a Isoflavona reductase e Caffeoyl-CoA O-metiltransferase que estão relacionadas a biossíntese de flavonoides e lignina. No cluster D foi observado a interação entre duas proteínas plastidiais, a Leucina aminopeptidase 2 e Factor de tradução similar GUF1, envolvidas com a metabolismo de proteínas. No cluster E foram agrupadas duas proteínas uma plastidial, a glutamato desidrogenase - NADP(Fragmento) e a outra mitocondrial, Arginase, relacionadas com metabolismo de aminoácidos.

DISCUSSÃO

O estresse por déficit hídrico é responsável por reduzir de forma drástica a produtividade das culturas. Isso ocorre por influenciar no metabolismo geral da planta como fechamento dos estômatos, aceleração da senescência e abscisão das folhas. Nesse sentido diversos mecanismos vêm sendo estudados como forma de reduzir estes efeitos, dentre eles o uso de microrganismos simbióticos como os fungos micorrízicos arbusculares. Os FMAs são conhecidos por sua capacidade de promover o crescimento das plantas, mesmo sob estresses bióticos e abióticos, uma vez que eles atuam em nível radicular auxiliando a absorção de água e nutrientes, incremento da atividade fotossintética, acúmulo de osmoprotetores e ativação do sistema antioxidante (27, 28; 29).

A exposição das plantas ao estresse hídrico desencadeia uma série de respostas fisiológicas e em seu desenvolvimento geral, visando desde a conservação do conteúdo relativo de água favorável até a manutenção dos processos metabólicos (30). A partir a percepção do declínio do potencial hídrico ocorre perda de turgor celular, seguido da redução de crescimento; limitações no metabolismo de aminoácidos e proteínas com reflexo na divisão celular, alterações no funcionamento do aparato estomático, redução das trocas de dióxido de carbono (CO₂), antecipação do processo reprodutivo e aceleração da senescência. Também, baixos valores de potencial hídrico impedem o processo fotossintético, tanto por prejuízo causado ao transporte de elétrons e à fotofosforilação acíclica, como pelo fechamento dos estômatos (31).

Análises fisiológica e morfométrica

Os resultados obtidos demonstraram o forte impacto do déficit hídrico na cana-de-açúcar em ambas a variedades. Do ponto de vista fisiológico os parâmetros TRA na planta e no solo confirmaram a condição de déficit hídrico devido à redução destas medidas em todas as plantas em relação a condição irrigado. O TRA radicular na variedade RB867515 e variedade RB041443 em todos os tratamentos reduziu em média 23 % e 28 %, respectivamente, caracterizando um estresse severo. Entretanto, foi observado que as plantas em todos os tratamentos apresentam recuperação dos status hídrico, principalmente aquelas que estavam colonizadas pelos FMAs, evidenciando a capacidade de FMAs de mitigar os efeitos dos estresses abióticos sobre as plantas por ocasionar alterações no ajustamento osmótico da planta como foi observado Mirshad e Puthur (6) em estudo com cana-de-açúcar sobre déficit hídrico colonizada com FMA.

Com relação aos teores de carotenoides, foi observado que apenas na variedade RB867515 a interação dos FMAs promoveu o aumento do significativo do teor de carotenoides radiculares. Situação não observada na variedade RB041443 nas plantas colonizadas pelo FMAs em todos os tratamentos. O aumento nos teores de carotenoides pode estar relacionado a sua atividade antioxidante, desta forma, evitando a degradação de moléculas como proteínas e lipídios, pelas

EROs. Além disso, os carotenoides são precursores de hormônios como ABA, principal hormônio envolvidos em respostas ao déficit hídrico (32), e estrigolactonas, compostos que favorecem o crescimento secundário radicular e a simbiose com micorrizas.

Considerando a análise morfométrica observou-se redução em todos os parâmetros avaliados (largura foliar, comprimento foliar, comprimento radicular, número de entrenós e comprimento do colmo) no tratamento sem FMA. Comparativamente observou-se a impacto positivo da presença de FMA auxiliando a planta a melhor se adaptar às condições estressantes e se recuperar após o déficit hídrico. Diversos estudos relatam que os FMAs promovem o desenvolvimento vegetal devido a diversos mecanismos promotores de crescimento empregados por estes microrganismos como produção de fitohormônios e solubilização de minerais (33, 34, 35).

Quanto às análises microbiológicas do solo, observou-se que a densidade de esporos (%) de FMAs foi maior no tratamento com *C. etunicatum* juntamente com o estresse hídrico (0,81%) (T4). Essa alta densidade de esporos encontrada nesse tratamento pode ter ocorrido possivelmente em função da condição atípica em o fungo *C. etunicatum* se encontrava, estimulando-o a se reproduzir. O índice de colonização radicular (%) diferiu estatisticamente entre os tratamentos inoculados com FMAs (T3 e T4), no qual no tratamento com *C. etunicatum* e estresse hídrico (T4) a porcentagem de colonização foi de aproximadamente 14,41% maior do que a inoculação na ausência do estresse (T3). Os resultados obtidos corresponderam ao esperado, uma vez que os FMAs aumentam a sua esporulação e a sua colonização sob condições de estresse, com o intuito de buscar água e nutrientes. O micélio extra-radicular das FMAs capta água diretamente nas pontas das hifas da matriz do solo e, em seguida, transfere essa água através do citoplasma do fungo ou camadas da parede interna para a célula cortical da raiz, sem qualquer obstrução da membrana (36). A água dentro das hifas não é perdida por causa do paredes hidrofóbicas. Desta forma, esse micélio micorrízico desempenha um papel importante na absorção e transferência de água para o vegetal sob condições adversas. Segundo Moreira e Siqueira (37), a restrição de disponibilidade hídrica

induz nos microrganismos associados à planta a manifestação de mecanismos de adaptação, como a elevação da esporulação e da colonização, pelo fato de estar sob uma situação de estresse.

A variedade RB867515 em associação com o FMADH demonstrou melhor adaptabilidade em relação às demais associações o que pode ser explicado pela reconhecida tolerância a seca desta variedade, no entanto, este é o primeiro estudo que revela sua receptividade à colonização com FMADH levando à planta a níveis superiores de desenvolvimento nestas condições (Tabela 1).

Análise proteômica

A análise diferencial do proteoma das raízes de cana-de-açúcar variedade RB867515, associadas ou não ao FMADH e submetidas ao déficit hídrico, demonstrou que várias proteínas foram responsivas aos tratamentos, revelando possíveis mecanismos moleculares associados a melhor performance de crescimento dessa variedade por meio da sua interação endossimbiótica com o FMADH.

No cluster A observasse as proteínas linoleate 9S- lipoxigenase 2 (P29250) e linoleate 9S-lipoxigenase 1 (P29114), que se diferenciam pela preferência no sítio de oxidação, LOX1 atua sobre o carbono 9 e a LOX2 sobre o carbono 13. Estas isoformas proteicas pertencem à família das dioxigenases que estão envolvidas em diversos aspectos da fisiologia vegetal, atuando no crescimento e desenvolvimento, senescência e em respostas a fatores abióticos e, principalmente, bióticos como fitopatógenos, gerando respostas de hipersensibilidade na planta (38, 39). O maior acúmulo de LOX1 e redução LOX2 nas plantas micorrizadas pode estar relacionada atividade oxilipinas (40) geradas por estas isoformas, pois estas moléculas podem tanto contribuir como inibir a colonização/infecção das plantas por fungos como foi observado por (41) em sementes de amendoim infectadas por *Aspergillus parasiticus*. Além disso, LOX está envolvida com a produção de ácido jasmônico (JA), hormônio vegetal que contribui para o estabelecimento e interação da simbiose com FMA (42, 43). Portanto, o maior acúmulo de LOX1 na cana-de-açúcar

colonizada por FMADH deve estar regulando a processo simbiótico sem inibir a colonização (44), situação similar observada por Trindade et al (45), no qual colonização por FMA favoreceu atividade enzimática da LOX em raízes de *Piper nigrum* L. 'Bragantina'.

O cluster B revelou uma rede tendo como DAP central a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3, citoplasmática (GAPDH) (Q43247), proteína envolvida nos processos de glicólise e gliconeogênese, sendo de suma importância para o crescimento e desenvolvimento da planta. O acúmulo desta proteína pode esta relaciona a sua participação para produção de ATP para o crescimento radicular induzido pelo déficit hídrico e pela colonização do FMA como foi observado nas análises morfométricas (Figura 4). Esta hipótese pode ser corroborada pela interação desta proteína com a proteína Fator de tradução eIF5A (P80639), que está envolvida com o processo de xilogênese (46), formação dos vasos condutores de xilema, e pelas proteínas plastidiais 7-hidroximetil clorofila a redutase (Q7XTG7) e protoclorofila redutase sub. N independente de luz (Q1KVX6) que estão relacionadas com crescimento radicular como foi observado por Nazir and Khan (47), em raízes de *Pinus thunbergii*. Outra possibilidade está relacionada com oxidação reversível dos grupos tiol da GAPDH pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (48), uma espécie reativa de oxigênio naturalmente produzida, mas que tem sua produção aumentada em condições de estresse, principalmente ao déficit hídrico. No qual, a GAPDH funciona com uma molécula receptora do H_2O_2 , evitando a degradação de outras moléculas (49). Esta hipótese pode ser corroborada pelo complexo multimérico da proteína GAPDH com a HSP70 (BiP4) (50) (Q75HQ0). A HSP70 é uma chaperona envolvida com mecanismo de reparo proteico que pode estar restaurando a conformação da GAPDH tornando-a funcional.

No cluster C observa-se a interação das proteínas isoflavona redutase (P52576) e cafeoil-CoA O-metiltransferase (Q9SLP8). A cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAMT) é uma enzima de participa da via dos fenilpropanoides que incluem flavonoides, isoflavonoides e lignina, e estão diretamente relacionados a estresses abióticos (51) e aos processos simbióticos, favorecendo a colonização das plantas pelos FMAs (52). Acúmulo da CCoAMT pode estar relacionada ao processo de

lignificação da parede celular para reduzir perda hídrica nas células radiculares, está hipótese pode ser corroborada pelo aumento no acúmulo da proteína Adenosil-homocisteinase (SAHH), cuja atividade afeta diretamente os processos de lignificação da parede celular como foi observado por Bai et al (53) em colmos de *Panicum virgatum*. A isoflavona redutase é uma enzima que participa da síntese de fitoalexinas, que são compostos do metabolismo secundário das plantas, com atividade antimicrobiana e antioxidante, envolvidos em resposta a estresses bióticos e abióticos. A colonização micorrízica naturalmente induz as plantas a produção de metabolitos secundários, que provavelmente devem estar relacionados a regulação da colonização pela cana-de-açúcar, como a redução dos efeitos deletérios do déficit hídrico sobre as demais biomoléculas.

No cluster D foi observado a interação em as proteínas Leucina aminopeptidase 2 (LAP2) e Fator de tradução similar a GUF1. O fator de tradução similar a GUF1 é proteína uma plastidial envolvida com o processo de tradução, seu acúmulo deve estar relacionado a manutenção da síntese proteica mesmo sobre efeito deletério do déficit hídrico (54). A Leucina aminopeptidase é enzima responsável por remover a região N-terminal de alguns aminoácidos, com ênfase para leucina, participando do processamento e turnover proteico. O acúmulo desta proteína nas plantas colonizadas pode estar relacionado ação do JA, participando de mecanismo de defesa (55). Além disso, LAP2 pode estar exercendo a função de chaperona, em virtude do estresse hídrico, como foi observado por Scratton et al (56).

No cluster E uma plastidial, a glutamato desidrogenase - NADP(Fragmento) (GDH-NADP) e a outra mitocondrial, Arginase. Arginase (AG1) está envolvida com o metabolismo do nitrogênio e ciclo da ureia sendo responsável pela conversão de L-arginina em L-ornitina e ureia. Além disso, a AG1 está participa da biossíntese de poliaminas, dentre elas a putrescina relacionada em resposta a estresses (57, 58). A glutamato desidrogenase - NADP(Fragmento) assim como arginase participa do metabolismo do nitrogênio convertendo L-glutamato em L-oxuglutarato. Atividade GDH está relacionada diretamente ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Pesquisas com plantas micorrizadas evidenciam aumento da atividade de GDH-NADP em relação as plantas não-micorrizadas, desta forma, favorecendo absorção

de nitrogênio pelas plantas. Além disso, plantas que apresentam alta atividade da GDH-NADP possuem maior potencial hídrico e maior tolerância ao déficit hídrico, como foi relatado por Lightfoot et al (59) em milho que superexpressava o GDH-NADP.

Além das proteínas relacionadas ao interatoma, destacamos a proteína Receptor de ácido abscísico PYL10 mais acumulada no tratamento inoculado com FMA. Esta proteína é um receptor de ABA, envolvida com respostas a estresse, inibe a proteína fosfatase PP2C, permitindo que transcrição de genes que regulam inúmeras respostas na planta (60). Além disso, um estudo superexpressando o gene PYL10 em arroz evidenciou aumento da tolerância ao déficit hídrico e ao frio nas plantas transgênicas em relação as plantas não-transformadas, bem como a indução de genes envolvidos em respostas a estresse, como DREB (61).

CONCLUSÃO

De forma geral, a colonização pelo FMADH induziu alterações no proteoma da var. R867515 de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico, aumentando o acúmulo de proteínas relacionadas ao desenvolvimento da planta, ao crescimento radicular, defesa (chaperonas), simbiose e lignificação (Figura 9), sendo estes dados corroborados pelos dados morfométricos e colonização.

Dessa forma, e corroborando com diversos estudos sobre o efeito benéfico do FMA como bioinoculante, o presente trabalho demonstra que o FMADH foi mais eficiente em colonizar a variedade RB867515 submetidas ao déficit hídrico, sendo um isolado promissor em aplicações posteriores na resposta da cana-de-açúcar sob estresses bióticos e abióticos.

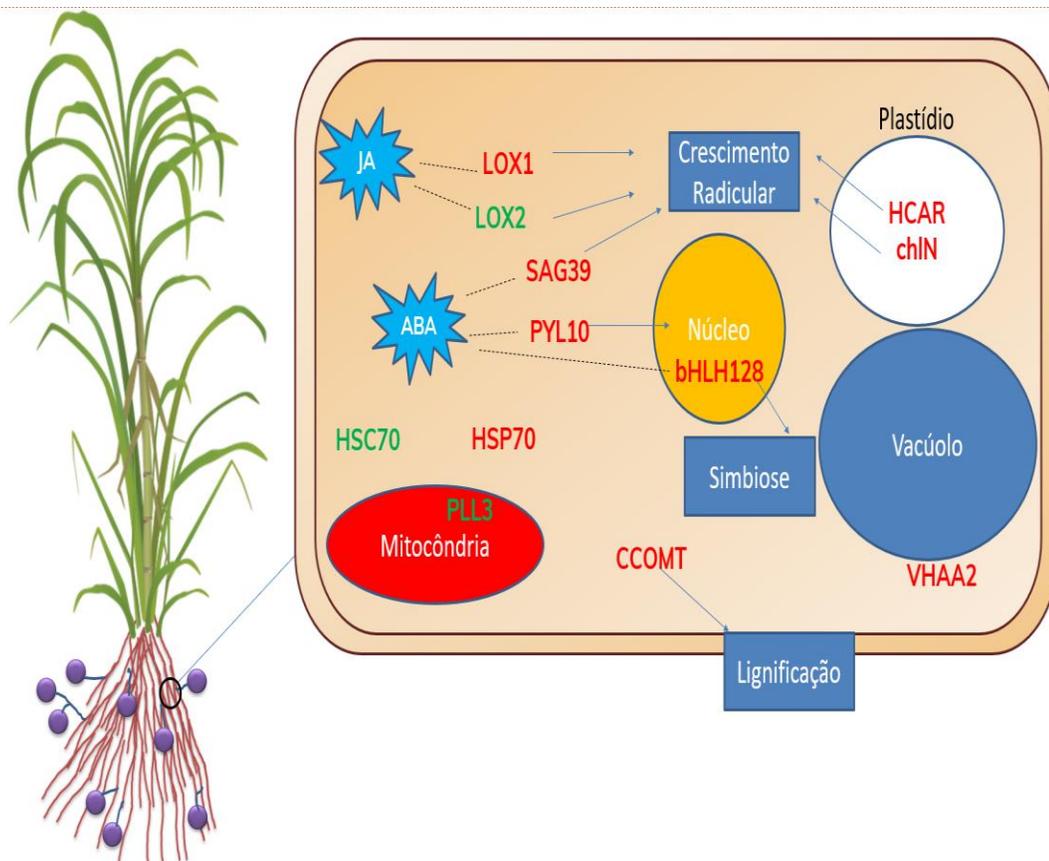


Figura 9 – Modelo biológico da interação entre FMADH e a variedade de cana-de-açúcar RB867515 na mitigação dos efeitos deletérios do déficit hídrico. As proteínas em vermelho referem-se as DAPs mais acumuladas no tratamento submetido ao déficit hídrico colonizado pelo FMADH. As proteínas em verde referem-se as DAPs mais acumuladas no tratamento submetido ao déficit hídrico não-colonizado pelo FMADH. As setas inteiras referem-se as prováveis funções das proteínas no modelo biológico.

Agradecimentos – Os autores agradecem à RIDESA/EECAC/UFRPE e ao Dr. Djalma Euzébio Simões Neto pelo fornecimento das variedades de cana-de-açúcar utilizadas; ao Laboratório de Biologia do Solo do IPA e ao Dr. José de Paula Oliveira pela estrutura e auxílio na montagem do experimento em casa de vegetação; ao IT-Vale e ao Dr. Rafael Borges da Silva Valadares do pelas análises em LC-MS/MS; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- 1-Waclawovsky, A.J., Sato, P.M., Lembke, C.G., Moore, P.H. and Souza, G.M. (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8:263–276.
- 2-Ferreira, T. H. S., Tsunada, M. S., Bassi, D., Araújo, P., Mattiello, L., Guidelli, G. V. et al. (2017). Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- 3-Mehnaz, S (2013) Microbes - friends and foes of sugarcane: Microbes and sugarcane. *J Basic Microbiol* 53:954–971.
- 4-Jacott, C. N.; Murray, J. D.; Ridout, C. J. (2017) Trade-Offs in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Disease Resistance, Growth Responses and Perspectives for Crop Breeding. *Agronomy*.7, 4, 75.
- 5-Oliveira, M. S., Campos, M. A., & Silva, F. S. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 522–528.
- 6-Mirshad PP and Puthur JT (2016) Arbuscular mycorrhizal association enhances drought tolerance potential of promising bioenergy grass (*Saccharum arundinaceum* retz.). *Environ Monit Assess* 188:425.
- 7-Abdelmoneim TS; Tarek AAM; Almaghrabi OA, Hassan SA and Abdelbagi I (2014) Increasing Plant Tolerance to Drought Stress by Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Life Sci J*; 11(1): 10-17.
- 8-Baslam M and Goicoechea N (2012) Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza* 22:347–359.
- 9- Komatsu S, Hossain Z. (2017) Preface-Plant Proteomic Research. *Int J Mol Sci*. 4;18;88.
- 10-Salvato F., Carvalho, M. C. C. G. (2010). Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40, 3, 727-734.
- 11-Mollavali M, Perner H, Rohn S, Riehle P, Hanschen FS and Schwarz D (2018) Nitrogen form and mycorrhizal inoculation amount and timing affect flavonol biosynthesis in onion (*Allium cepa* L.). *Mycorrhiza* 28:59–70.
- 12-Sun Z, Song J, Xin X, Xie X and Zhao B (2018) Arbuscular Mycorrhizal Fungal 14-3-3 Proteins Are Involved in Arbuscule Formation and Responses to Abiotic Stresses During AM Symbiosis. *Front Microbiol* 9:91.
- 13-Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in plant science*, 10, 1068.
- 14-Bernardo, L., Morcia, C., Carletti, P., Ghizzoni, R., Badeck, F. W., Rizza, F., Lucini, L., & Terzi, V. (2017). Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *Journal of proteomics*, 169, 21–32.

- 15-Ferreira PAA, Tiecher T, Tiecher TL, Rangel W de M, Soares CRFS, Deuner S, Tarouco CP, Giachini AJ, Nicoloso FT, Brunetto G et al. (2018) Effects of *Rhizophagus clarus* and P availability in the tolerance and physiological response of *Mucuna cinereum* to copper. *Plant Physiol Biochem* 122:46–56.
- 16-Tokeshi H. (1997). Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) *Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo, p. 207-225.
- 17-Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station. Circ. n.347*.
- 18-Barrs HD and Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science*, 15(3): 413-428.
- 20-Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- 21-Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., and Piche, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology*, 64,12, 5004–5007.
- 22-Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980), An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500.
- 25-Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45:D362–D368.
- 26-Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., & Natale, D. A. (2018). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351–D360.
- 27- Santander, C., Ruiz, A., García, S., Aroca, R., Cumming, J., & Cornejo, P. (2020). Efficiency of two arbuscular mycorrhizal fungal inocula to improve saline stress tolerance in lettuce plants by changes of antioxidant defense mechanisms. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(4), 1577–1587.
- 28- Mathur, S., Tomar, R.S. and Jajoo, A. (2018) Arbuscular mycorrhizal Fungi (AMF) Protects Photosynthetic Apparatus of Wheat under Drought Stress. *Photosynthetic Research*, 139, 227-238.
- 29- Al-Arjani, A. F., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi modulates dynamics tolerance expression to mitigate drought stress in *Ephedra foliata* Boiss. *Saudi journal of biological sciences*, 27(1), 380–394.
- 30- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 259.

- 31- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- 32-Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC and Pogson BJ (2015) Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant* 8:68–82.
- 33- Raklami A, Bechtaoui N, Tahiri A I, Anli M, Meddich A, Oufdou K (2019) Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility. *Front Microbiol* 10:1–11.
- 34-Anli M, Baslam M, Tahiri A, Raklami A, Symanczik S, Boutasknit A, Ait-El-Mokhtar M, Ben-Laouane R, Toubali S, Ait Rahou Y, Ait Chitt M, Oufdou K, Mitsui T, Hafidi M, Meddich A (2020) Biofertilizers as strategies to improve photosynthetic apparatus, growth, and drought stress tolerance in the date palm. *Front Plant Sci* 11:1–21.
- 35-Toubali S, Tahiri A, Anli M, Symanczik S, Boutasknit A, Ait-El-Mokhtar M, Ben-Laouane R, Oufdou K, Ait-Rahou Y, Ben-Ahmed H, Jemo M, Hafidi M, Meddich A (2020) Physiological and biochemical behaviors of date palm vitroplants treated with microbial consortia and compost in response to salt stress. *Appl Sci* 10(23):8665.
- 36-Allen, M. F. (2007). Mycorrhizal Fungi: Highways for Water and Nutrients in Arid Soils. *Vadose Zone Journal*, 6(2), 291–297.
- 37-Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. (2006). *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ed. UFLA. 626 p.
- 38-Gao X, Starr J, Göbel C, Engelberth J, Feussner I, Tumlinson J and Kolomiets M (2008) Maize 9-Lipoxygenase ZmLOX3 Controls Development, Root-Specific Expression of Defense Genes, and Resistance to Root-Knot Nematodes. *MPMI* 21:98–109. doi: 10.1094/MPMI-21-1-0098
- 39-Viswanath, K.K., Varakumar, P., Pamuru, R.R., Basha, S.J., Mehta, S. and Rao, A.D. (2020) Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. *J Plant Biol* 63:83–95.
- 40-Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M., & Rosahl, S. (2002). Oxylin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochimica et biophysica acta*, 1584(1), 55–64.
- 41-Müller V, Amé MV, Carrari V, Gioco J and Asis R (2014) Lipoxygenase Activation in Peanut Seed Cultivars Resistant and Susceptible to *Aspergillus parasiticus* Colonization. *Phytopathology*® 104:1340–1348.
- 42-Yan C and Xie D (2015) Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnol J* 13:1233–1240.
- 43-Pedranzani H, Rodríguez-Rivera M, Gutiérrez M, Porcel R, Hause B and Ruiz-Lozano JM (2016) Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels. *Mycorrhiza* 26:141–152.
- 44-de Oliveira JSF, Xavier LP, Lins A, Andrade EHA, Maia JGS, de Mello AH, Setzer WN, Ramos AR and da Silva JKR (2019) Effects of inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi on the composition of the essential oil, plant growth, and lipoxygenase activity of *Piper aduncum* L. *AMB Expr* 9:29.

- 45-da Trindade, Almeida, Xavier, Lins, Andrade, Maia, Mello, Setzer, Ramos, and da Silva (2019) Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonization Promotes Changes in the Volatile Compounds and Enzymatic Activity of Lipoxygenase and Phenylalanine Ammonia Lyase in *Piper nigrum* L. 'Bragantina.' *Plants* 8:442.
- 46-Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang T-W, Tshin R, Hopkins MT, McNamara L and Thompson JE (2008) Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 59:939–950.
- 47-Nazir S and Khan MS (2012) Chloroplast-encoded chlB gene from *Pinus thunbergii* promotes root and early chlorophyll pigment development in *Nicotiana tabacum*. *Mol Biol Rep* 39:10637–10646.
- 48-Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, Hughes J and Neill SJ (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:828–835.
- 49-Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD et al. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7:665–674.
- 50-Bustos DM and Iglesias AA (2003) Phosphorylated Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Heterotrophic Cells of Wheat Interacts with 14-3-3 Proteins. *Plant Physiology* 133:2081–2088.
- 51-Baxter HL and Stewart CN (2013) Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. *Biofuels* 4:635–650.
- 52- Behr M, Baldacci-Cresp F, Kohler A, Morreel K, Goeminne G, Van Acker R, Veneault-Fourrey C, Mol A, Pilate G, Boerjan W et al. (2020) Alterations in the phenylpropanoid pathway affect poplar ability for ectomycorrhizal colonisation and susceptibility to root-knot nematodes. *Mycorrhiza* 30:555–566.
- 53- Bai, Z., Qi, T., Liu, Y., Wu, Z., Ma, L., Liu, W., Cao, Y., Bao, Y., & Fu, C. (2018). Alteration of S-adenosylhomocysteine levels affects lignin biosynthesis in switchgrass. *Plant Biotechnology Journal*, 16(12), 2016–2026.
- 54-Sruthilaxmi CB and Babu S (2020) Proteome Responses to Individual Pathogens and Abiotic Conditions in Rice Seedlings. *Phytopathology*® 110:1326–1341.
- 55-Boulila-Zoghalmi L, Gallusci P, Holzer FM, Basset GJ, Djebali W, Chaïbi W, Walling LL and Brouquisse R (2011) Up-regulation of leucine aminopeptidase-A in cadmium-treated tomato roots. *Planta* 234:857–863.
- 57-Shi H-T and Chan Z-L (2013) In vivo role of *Arabidopsis* arginase in arginine metabolism and abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior* 8:e24138.
- 58-Abd Elbar OH, Farag RE and Shehata SA (2019) Effect of putrescine application on some growth, biochemical and anatomical characteristics of *Thymus vulgaris* L. under drought stress. *Annals of Agricultural Sciences* 64:129–137.
- 59-Lightfoot DA, Mungur R, Ameziane R, Nolte S, Long L, Bernhard K, Colter A, Jones K, Iqbal MJ, Varsa E et al. (2007) Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (gdhA) of *E. coli*. *Euphytica* 156:103–116.

- 60-Zhang XL, Jiang L, Xin Q, Liu Y, Tan JX and Chen ZZ (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front Plant Sci.*
- 61-Verma RK, Santosh Kumar VV, Yadav SK, Pushkar S, Rao MV and Chinnusamy V (2019) Overexpression of ABA Receptor PYL10 Gene Confers Drought and Cold Tolerance to Indica Rice. *Front Plant Sci* 10:1488.

CAPÍTULO 1 – Figuras e Tabelas

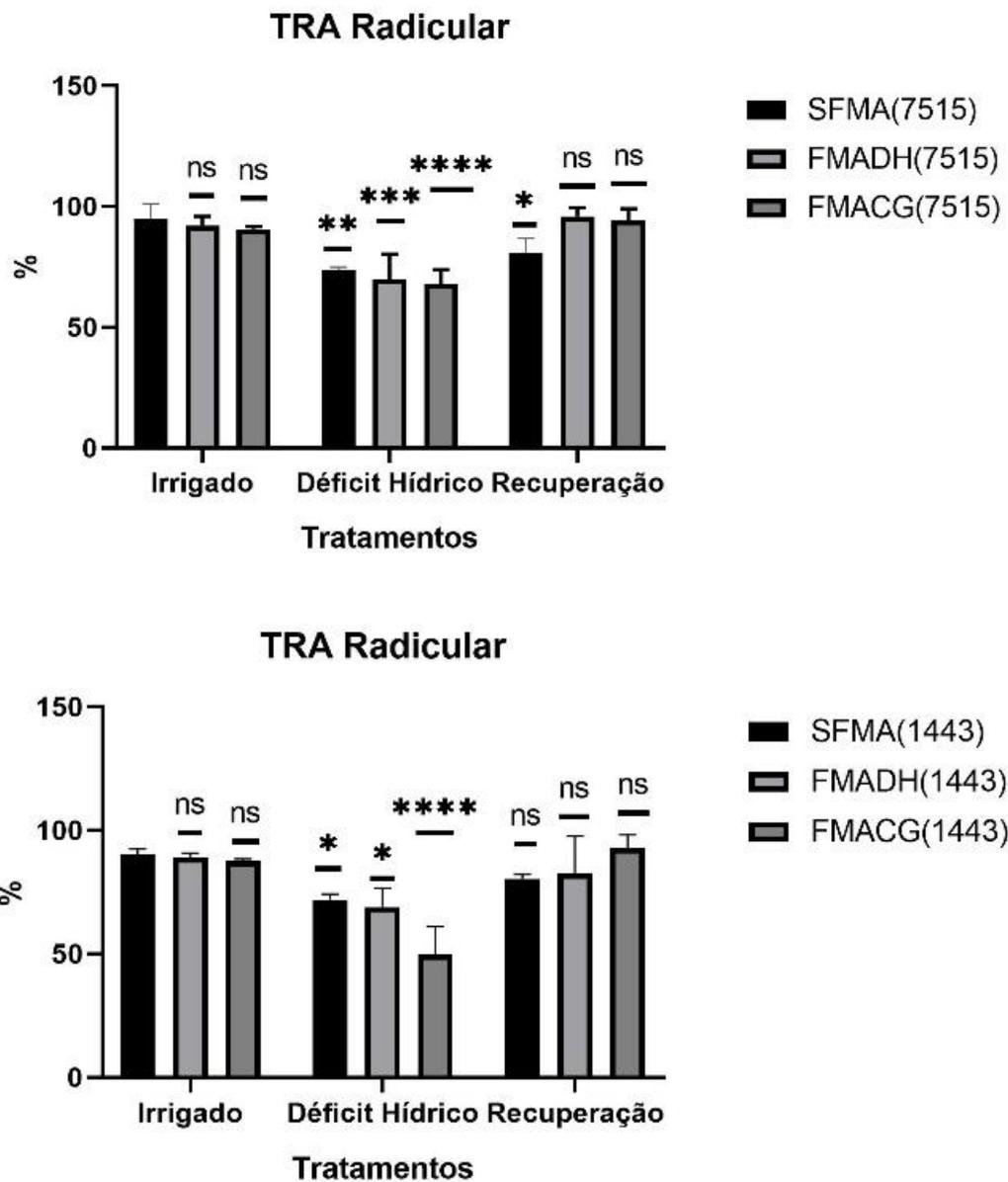


Figura 1 – Análise de Teor Relativo de Água (TRA) de variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) submetidas a estresse por déficit hídrico. SFMA- Sem Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA); FMADH- FMA *Dentiscutata heterogama*; FMACG- FMA *Claroideoglomus etunicatum*; IS- Irrigação do solo; SS- Sem irrigação do solo

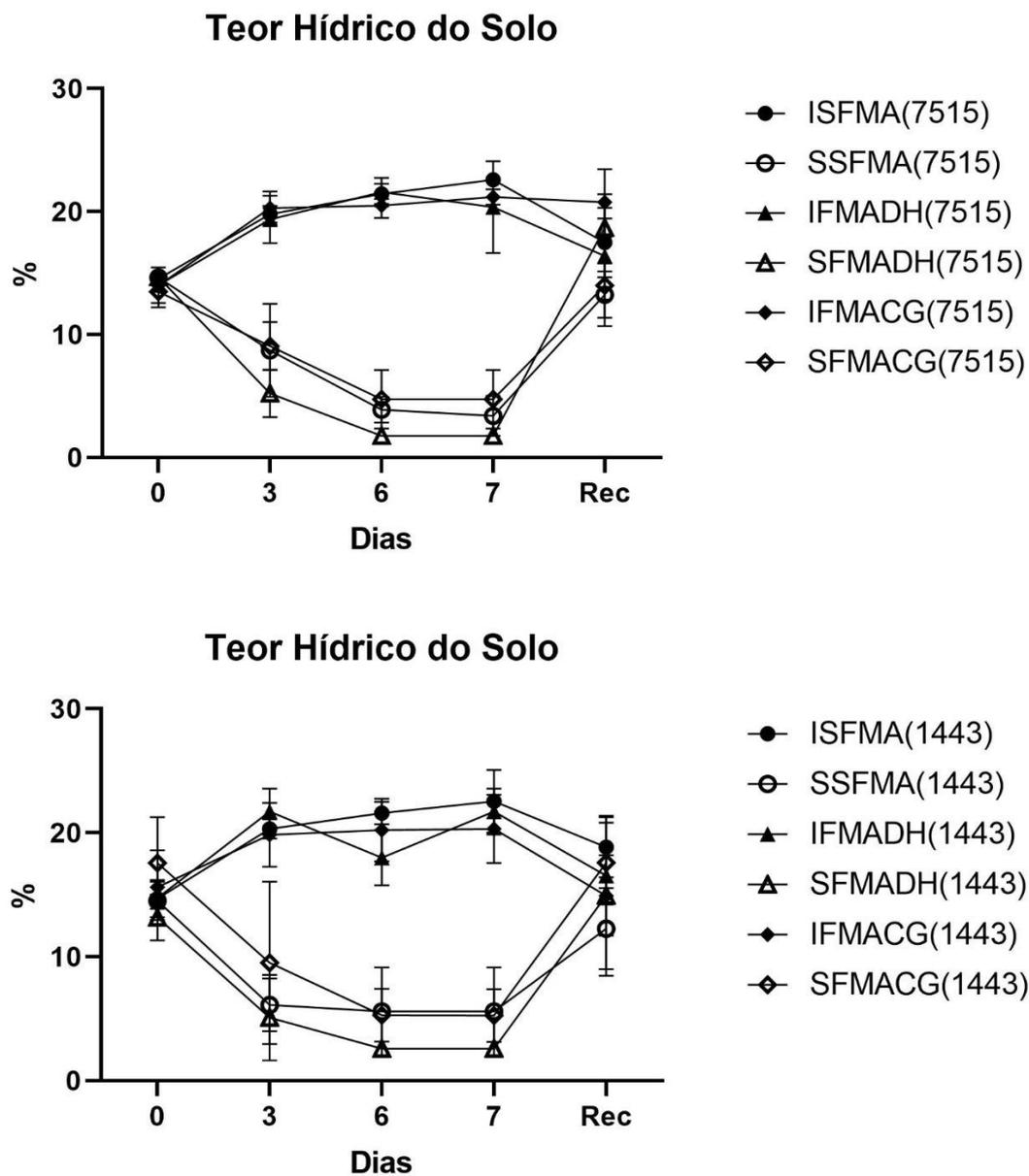


Figura 2 – Avaliação do Teor hídrico do solo em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglossum etunicatum* (CG).
 Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMADH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMADH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_ CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMACG.

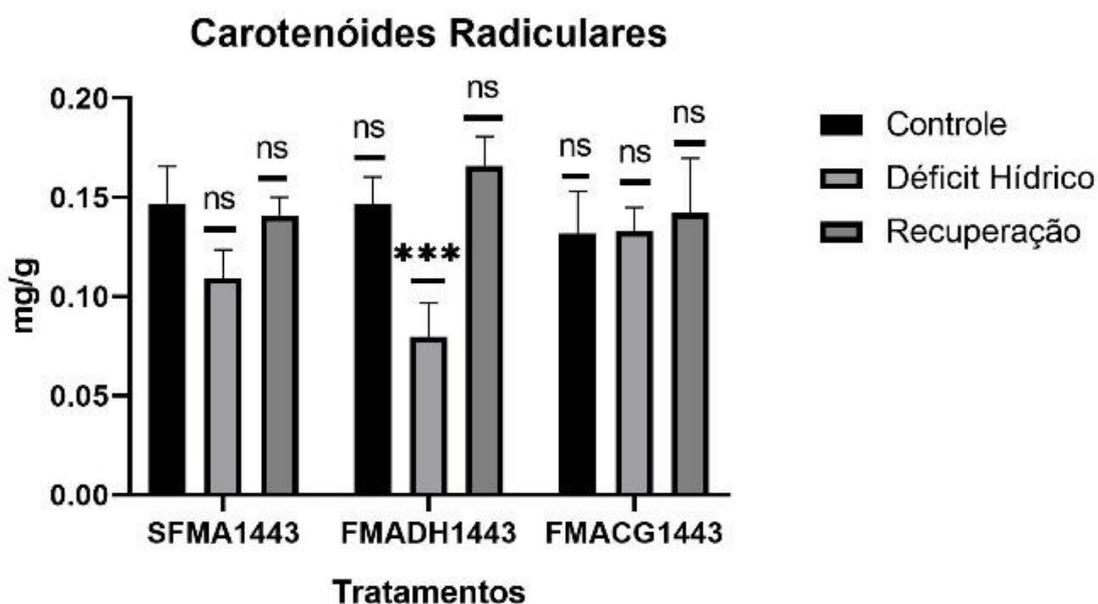
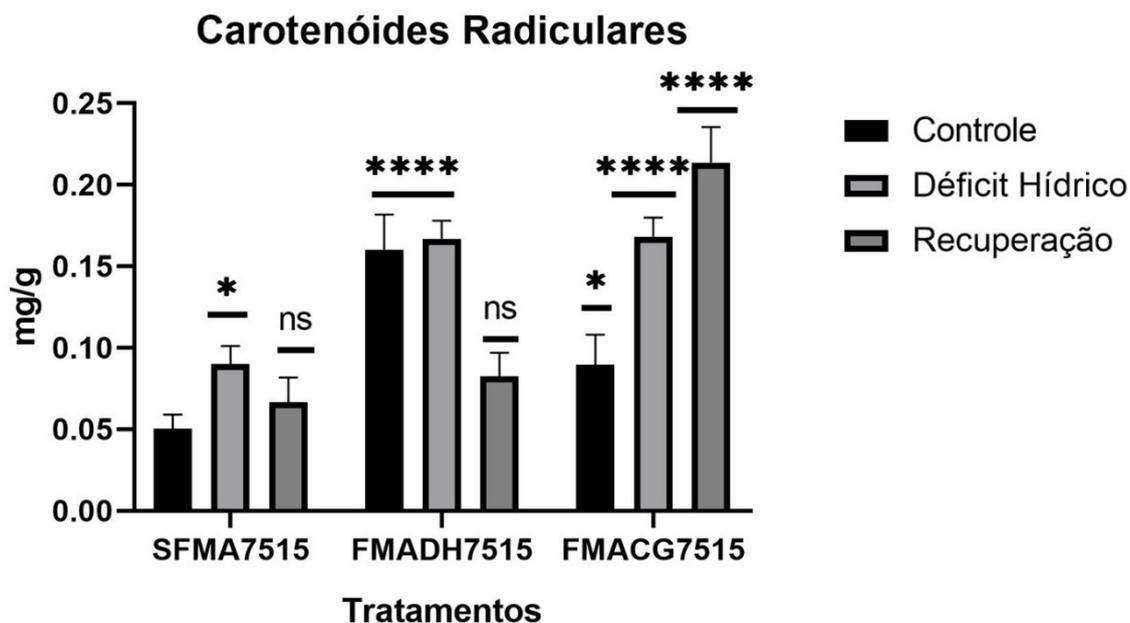


Figura 3 – Avaliação do Teor de carotenóides radiculares em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglomus etunicatum* (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMADH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMADH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_ CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMACG.

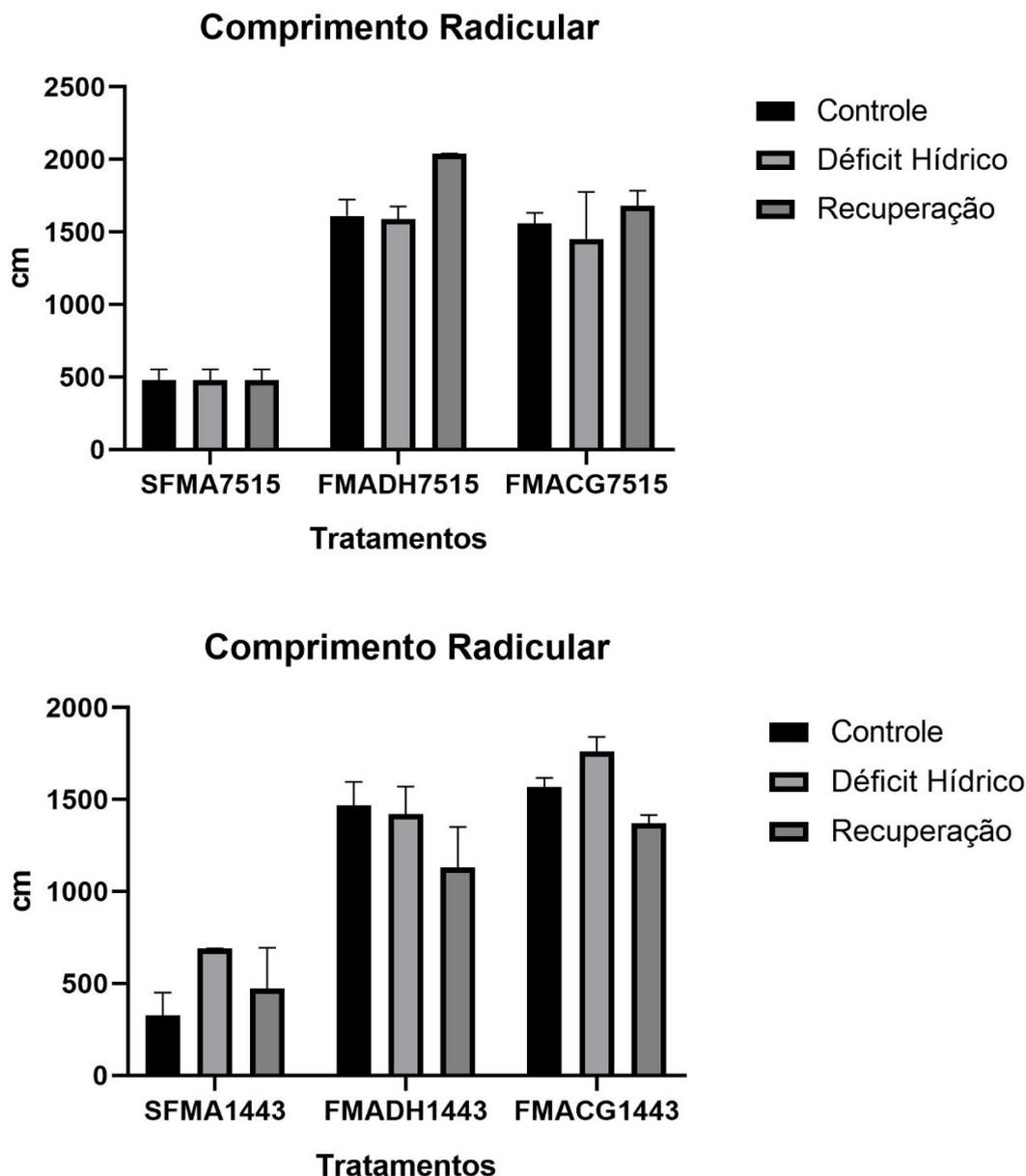


Figura 4 – Avaliação do comprimento radicular em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglossum etunicatum* (CG).
 Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMADH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMADH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_ CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMACG.

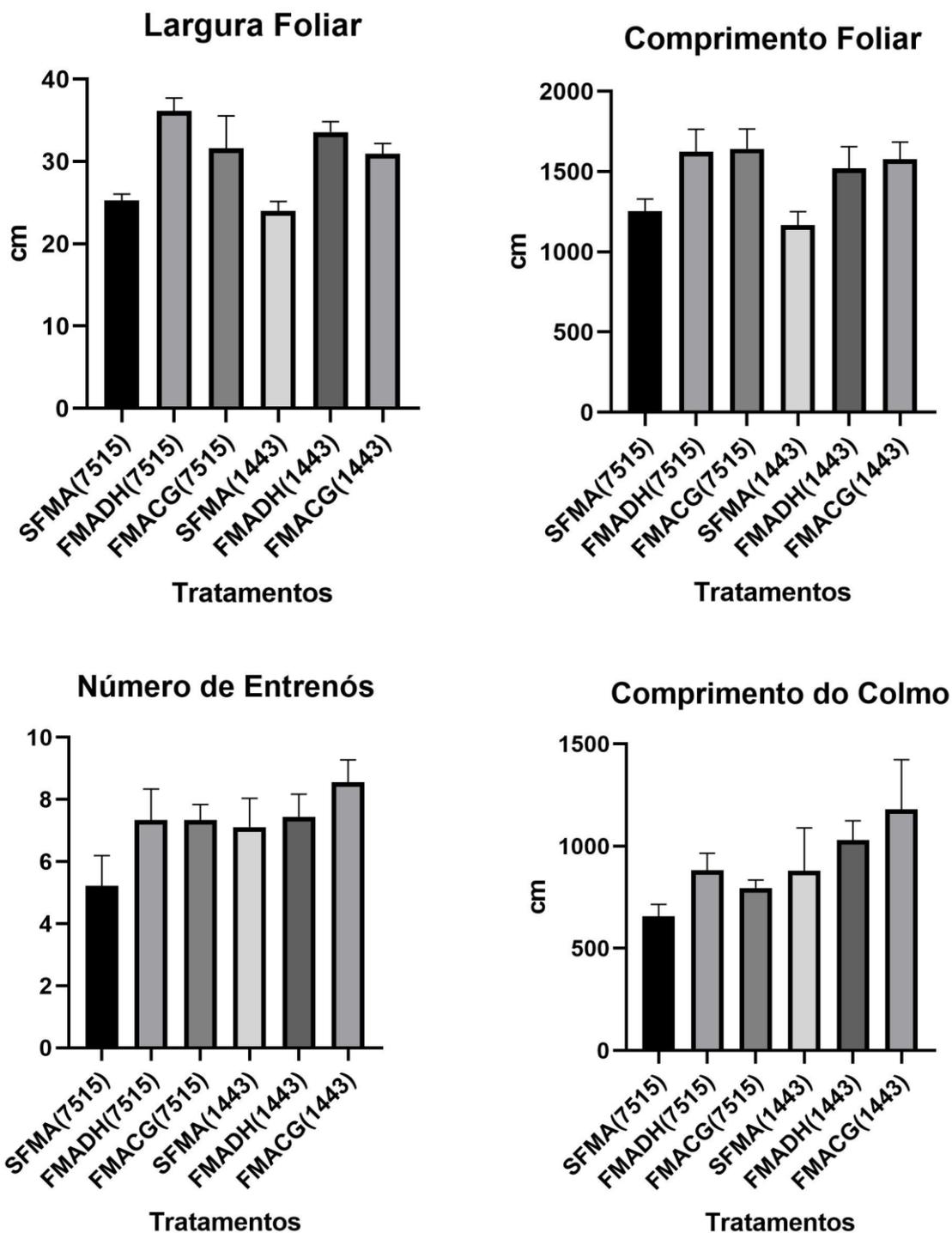


Figura 5 – Avaliação dos parâmetros morfológicos em variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) submetidas a estresse por déficit hídrico e inoculação com Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA) dos tipos *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglomus etunicatum* (CG). Legenda: ISFMA- Planta Irrigada e sem FMA; SSFMA- Planta sob déficit hídrico e sem FMA; IFMADH- Planta irrigada e inoculada com FMADH; SFMADH- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMADH; IFMACG- Planta irrigada e inoculada com FMA_ CG; SFMACG- Planta sob déficit hídrico e inoculada com FMACG.

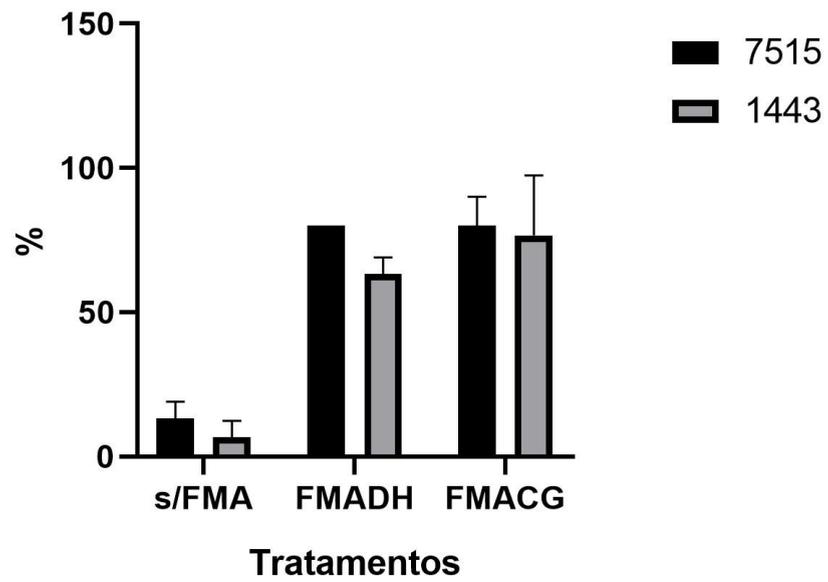


Figura 6 – Colonização micorrízica de variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB041443) com Fungos Micorrízicos Acumulados (FMA) do tipo *Dentiscutata heterogama* (DH) e *Claroideoglobus etunicatum* (CG).

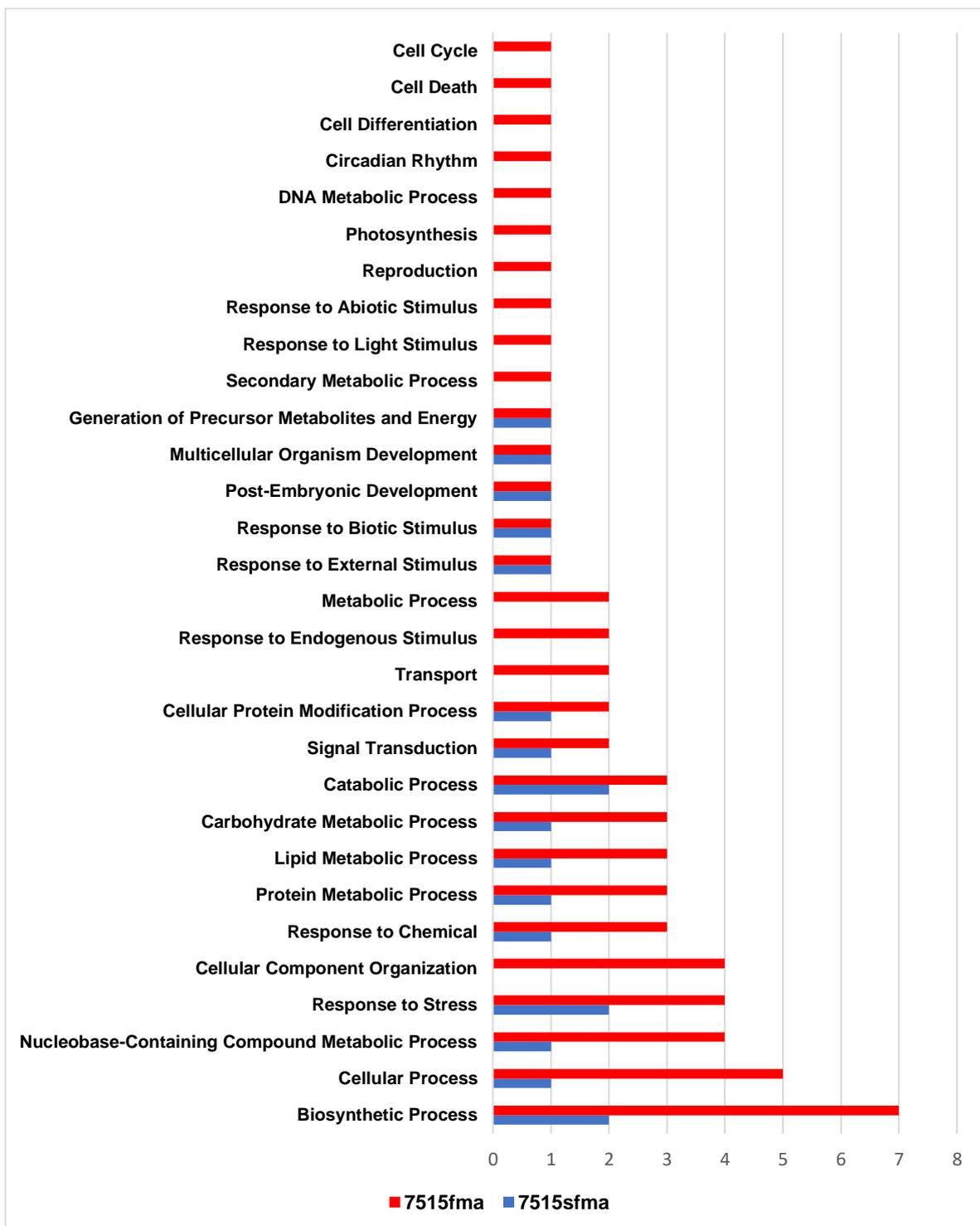


Figura 7 – Categorização ontológica com base em processo biológico de proteínas identificadas na variedade de cana-de-açúcar RB7515 submetidas ao estresse por déficit hídrico em resposta a colonizadas por *Dentiscutata heterogama*.

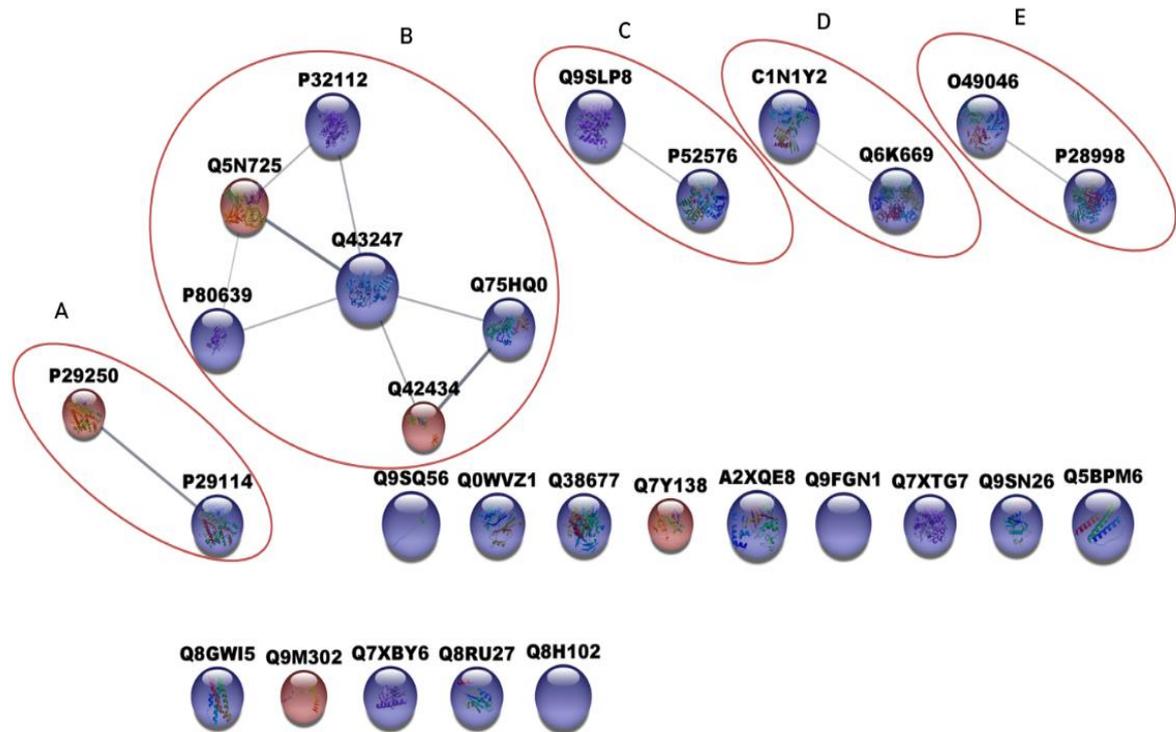


Figura 8 – Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em raízes não micorrizadas (SSFMA) e micorrizadas com *Dentiscutata heterogama* (SFMADH) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de vinte e quatro proteínas identificadas, rendeu cinco clusters (A-E) baseadas em processos biológicos.

Tabela 1 – Tabela de pontos das avaliações morfométricas, fisiológicas e colonização. FMADH (*Densticutata heterogama*) e FMACG (*Claroideoglopus etunicatum*).

Parâmetros	RB867515		RB111443	
	FMADH	FMACG	FMADH	FMACG
Comprimento Radicular	+++	++	++	+++
Comprimento Foliar	++	+	++	+
Largura Foliar	++	++	+	+
Colonização	+++	+++	++	++
Carotenoides	+++	+++	+	+
Teor Relativo de água	++	++	+	+
Comprimento do Colmo	++	++	+	++

+

Tabela 2 – Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB867515 não-colonizadas por *Dentiscutata heterogama* e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.

Uniprot ID	Protein	Log 2 (FC)	Anova	Molecular Mass	Subcellular localization	Biological Process
P29250	Linoleate 9S-lipoxygenase 2	5.816449	0.026	97.35	Cytoplasm	BP, CP, L, PED, RB, REX, RS
Q42434	Luminal-binding protein	5.683298	0.008	73.82	Endoplasmic reticulum	CP, PMP, RC, RS, S
Q7Y138	Probable protein phosphatase 2C 36	4.080573	0.006	42.59	Mitochondrion	CPMP
Q9M302	Pentatricopeptide repeat-containing protein At3g48810	3.272479	0.044	75.67	Mitochondrion	
Q5N725	Fructose-bisphosphate aldolase 3	1.951514	0.049	39.17	Cytoplasm	BP, CMP, CP, G, MOD, N,

Legenda: BP: Biosynthetic Process; CMP: Carbohydrate Metabolic Process; CP: Catabolic Process; CPMP: Cellular Protein Modification Process; G: Generation of Precursor Metabolites and Energy; L: Lipid Metabolic Process; MOD: Multicellular Organism Development; N: Nucleobase-Containing Compound Metabolic Process; PED: Post-embryonic Development; PMP: Protein Metabolic Process; RB: Response to Biotic Stimulus; RC: Response to Chemical; REX: Response to External Stimulus RS: Response to Stress; S: Signal Transduction

Tabela 3 – Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB867515 colonizadas por *Dentiscutata heterogama* e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.

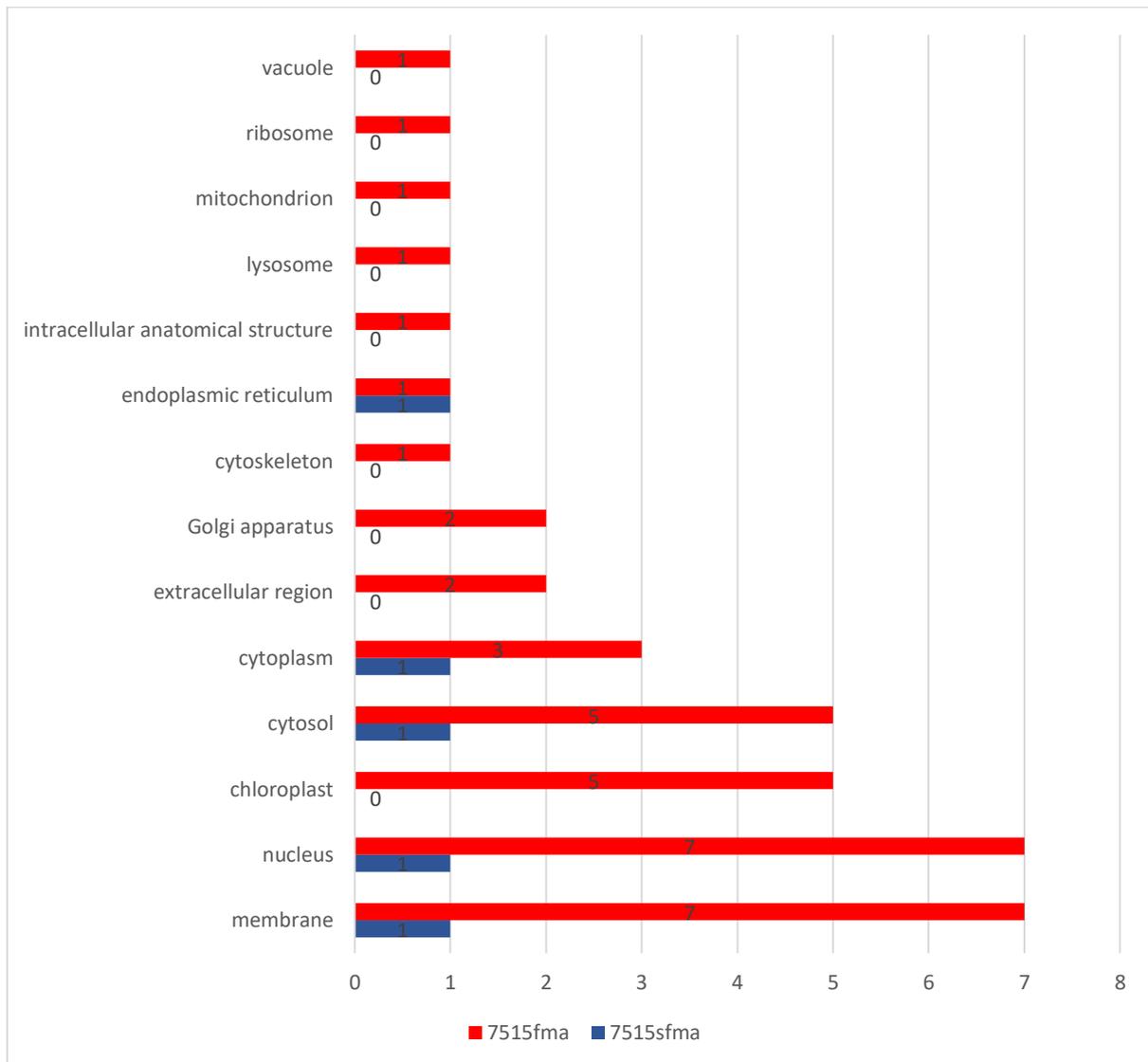
Uniprot ID	Protein	Log 2 (FC)	Anova	Molecular Mass	Subcellular localization	Biological Process
O49046	Arginase	Exclusive	0.006	38.95	Mitochondrion	BP, CEP
P52576	Isoflavone reductase	Exclusive	0.001	35.6	Cytoplasm	RS
Q7XTG7	7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase	Exclusive	0.03	52.95	Plastid	CEP
Q8GWI5	Uncharacterized protein At4g18257	Exclusive	0.047	29.17	Nucleus	
Q8RU27	Probable UDP-arabinopyranose mutase 2	Exclusive	0.028	42.17	Cytoplasm	BP, CCO, CMP, CPMP, N
Q9SN26	Phytolongin Phyl1.1	Exclusive	0.003	28.76	Golgi apparatus	T
Q75HQ0	Heat shock 70 kDa protein BIP4	Exclusive	0.007	74.48	Endoplasmic reticulum	CP, PMP, RC, RS, S
P28998	NADP-specific glutamate dehydrogenase (Fragment)	10.07515	0.044	58.04	Plastid	CEP, MEP
Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	8.205055	0.01	36.62	Cytoplasm	CMP, G, N, RA, RC, RS
Q5BPM6	QWRF motif-containing protein 6	7.531824	0.005	49.42	Cytoplasm	CC, CCO, PED, R
C1N1Y2	Translation factor GUF1 homolog	6.846973	0.05	77.62	Plastid	TR
Q9SLP8	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	6.532955	4.36×10^{-6}	26.44	Cytoplasm	BP, CEP, CR, L, SM
A2XQE8	Senescence-specific cysteine protease SAG39	6.146349	0.026	37.47	Vacuole	CP, CDE, CDI, MOD, PMP, RC, REN
Q9SQ56	RGG repeats nuclear RNA binding protein A (Fragment)	4.94709	0.001	32.44	Nucleus	RL

Q8H102	Transcription factor bHLH128	3.763427	0.012	39.29	Nucleus	BP, N
Q9FGN1	Probable long-chain-alcohol O-fatty-acyltransferase 11	3.358601	0.036	51.74	Endoplasmic reticulum	L
P32112	Adenosylhomocysteinase	2.906176	0.0004	54.12	Cytoplasm	N
Q0WVZ1	Putative metallophosphoesterase At3g03305	2.811386	0.0003	85.32	Endoplasmic reticulum	D, RB, REX, RS
Q6K669	Leucine aminopeptidase 2	2.67459	4.88×10^{-9}	62.22	Plastid	PMP
Q1K VX6	Light-independent protochlorophyllide reductase subunit N	2.303291	0.01	64.66	Plastid	BP, CMP, P
Q38677	V-type proton ATPase catalytic subunit A isoform 2	2.214479	0.021	67.72	Cytoplasm	BP, CCO, T
P80639	Eukaryotic translation initiation factor 5A	1.885535	7.09×10^{-5}	17.73	Cytoplasm	CCO
Q7XBY6	Abscisic acid receptor PYL10	1.659368	0.02	23.31	Cytoplasm	CPMP, RC, REN, S
P29114	Linoleate 9S-lipoxygenase 1	0.542189	0.008	96.51	Cytoplasm	BP, CP, L

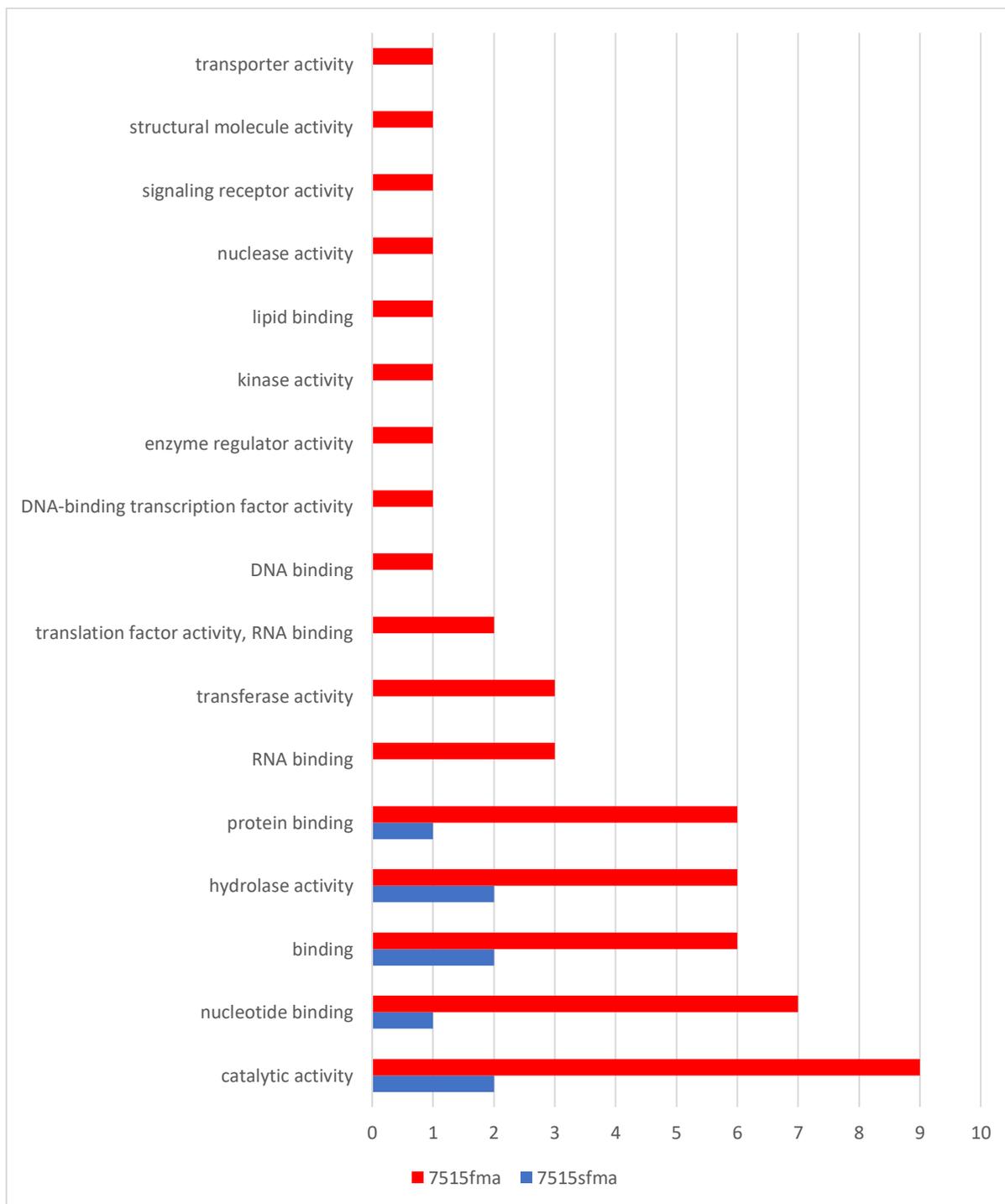
Legenda: BP: Biosynthetic Process; CMP: Carbohydrate Metabolic Process; CP: Catabolic Process; CC: Cell Cycle; CDE: Cell Death; CDI: Cell Differentiation; CCO: Cellular Component Organization; CEP: Cellular Process; CPMP: Cellular Protein Modification Process; CR: Circadian Rhythm; D: DNA Metabolic Process; G: Generation of Precursor Metabolites and Energy; L: Lipid Metabolic Process; MEP: Metabolic Process; MOD: Multicellular Organism Development; N: Nucleobase-Containing Compound Metabolic Process; P: Photosynthesis; PED: Post-embryonic Development; PMP: Protein Metabolic Process; R: Reproduction; RA: Response to Abiotic Stimulus; RB: Response to Biotic Stimulus; RC: Response to Chemical; REN: Response to Endogenous Stimulus; REX: Response to External Stimulus; RL: Response to Light Stimulus; RS: Response to Stress; S: Signal Transduction; SM: Secondary Metabolic Process; T: Transport, TR: Translation.

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1

Componente celular



Função Molecular



CAPÍTULO 2

Manuscrito a ser submetido na revista BMC Biology, qualis A1 na área CB1

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DO PROTEOMA RADICULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR COLONIZADAS POR MICORRIZA EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

Elton Pedro Nunes Pena ^{1,6}; José de Paula Oliveira ²; Rafael Borges da Silva Valadares³; Felipe Trindade³; Fabiana Aparecida Cavalcante Silva⁴; Tercilio Calsa Junior ^{5,6*}

¹ Discente do Programa de Pós-Graduação em Genética – Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco; ²Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA; ³Instituto Tecnológico Vale – ITV; ⁴Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Fidelidade Genética – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE; ⁵Docente do Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco; ⁶ Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas – Depto. de Genética – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco.

* Autor para correspondência: Tercilio Calsa Junior. E-mail: tercilio.calsaj@ufpe.br

RESUMO

A cana-de-açúcar representa 70 % da produção mundial de açúcar, tendo o Brasil como principal produtor. Devido a sua alta relevância, diversas pesquisas foram desenvolvidas para obtenção de variedades mais tolerantes a estresses ambientais. Associação de plantas com organismos simbiotes, como FMA, pode contribuir na absorção de água e nutrientes, e reduzir os efeitos deletérios de estresses bióticos e abióticos. O trabalho objetivou analisar o proteoma de radicular de cana-de-açúcar colonizada por micorriza em resposta ao déficit hídrico. As canas-de-açúcar foram propagadas em vasos contendo ou não esporos de *Dentiscutata heterogama* (FMADH), quatro meses após a inoculação as plantas foram submetidas ao déficit hídrico por sete dias. Análise proteômica revelou 60 proteínas diferencialmente acumuladas na condição submetida ao déficit hídrico sem FMA, e 22 proteínas diferencialmente acumuladas na condição submetida ao déficit hídrico com FMA. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se as proteínas malato desidrogenase citoplasmática e mitocondrial, a SPINDLY, a desidratase NAD(P)HX dependente de ATP. Os dados obtidos podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de resposta de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico colonizadas por FMA.

Palavras-chave: *Saccharum*; FMA; Proteoma; Estresse abiótico; LC-MS/MS.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar configura-se como uma das principais fontes de açúcar e etanol no mundo, tendo o Brasil como seu maior produtor. Por apresentar alta relevância no cenário econômico brasileiro, diversas pesquisas relacionadas ao seu melhoramento por meio de cruzamento de variedades foram desenvolvidas visando a obtenção de cultivares mais produtivas e com maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Dentre estes cultivares destaca-se a RB041443, considerada como tolerante a vários estresses bióticos e com alta produtividade.

A produtividade da cana-de-açúcar representa apenas 20 % do seu potencial teórico-experimental, devido as condições edafoclimáticas e ações antrópicas que comprometem o crescimento e desenvolvimento da planta. Dentre as condições edafoclimáticas, a seca é um dos principais fatores ambientais que compromete a produtividade das plantas, pois compromete diversas vias metabólicas das plantas que podem ocasionar a morte do vegetal, sendo responsável por grandes perdas no setor sucroalcooleiro.

Associação das plantas com microrganismos, como FMA podem contribuir com redução dos efeitos deletérios da seca sobre cana-de-açúcar, pois regulam vias metabólicas favorecendo o desenvolvimento e tolerância da planta a estresses. Compreender os mecanismos de interação da cana-de-açúcar com micorrizas em resposta ao déficit hídrico pode auxiliar na identificação de marcadores funcionais que podem contribuir no melhoramento da cultura.

Desta forma, o presente trabalho visa analisar o proteoma radicular da variedade RB041443 colonizada pela FMA *Dentiscutata heterogama* submetida ao déficit hídrico. A cana-de-açúcar configura-se como uma das principais fontes de açúcar e etanol no mundo, tendo o Brasil como seu maior produtor (MONTEIRO et al, 2018). Por apresentar alta relevância no cenário econômico brasileiro, diversas pesquisas relacionadas ao seu melhoramento por meio de cruzamento foram desenvolvidas visando a obtenção de cultivares mais produtivo e com maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Dentre estes cultivares destaca-se a variedade RB041443, considerada como tolerante a vários estresses bióticos e com alta produtividade.

Apesar de diversas variedades de cana-de-açúcar serem produzidas, principalmente pela técnica de cruzamento entre variedades (melhoramento

clássico), a produtividade da cana-de-açúcar representa apenas 20 % do seu potencial teórico-experimental(WACLAWOVSKY et al, 2010), devido as condições edafoclimáticas e ações antrópicas que comprometem o crescimento e desenvolvimento da planta (DIAS and SENTELHAS, 2018). Dentre as condições edafoclimáticas, a seca é um dos principais fatores ambientais que compromete a produtividade das plantas, pois compromete diversas vias metabólicas das plantas podem ocasionar a morte do vegetal, sendo responsável por grandes perdas no setor sucroalcooleiro (REYES et al, 2020).

Associação das plantas com microrganismos, como FMA podem contribuir com redução dos efeitos deletérios da seca sobre cana-de-açúcar, pois regulam vias metabólicas favorecendo desenvolvimento e tolerância da planta a estresses (BONFANTE and GENRE, 2015). Compreender os mecanismos de interação da cana-de-açúcar com micorrizas em resposta ao déficit hídrico pode auxiliar na identificação de marcadores funcionais que podem contribuir no melhoramento da cultura.

Desta forma, o presente trabalho visa analisar o proteoma radicular da variedade RB041443 colonizada pela FMA *Dentiscutata heterogama* submetida ao déficit hídrico

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico e delineamento experimental

Foram utilizados segmentos de colmo de cana-de-açúcar da variedade RB041443 gentilmente fornecidos pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucoenergético). O inóculo de fungos micorrízicos arbusculares utilizado foi *Dentiscutata heterogama* gentilmente fornecido pelo Laboratório de Biologia do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (8°03'49.1"S 34°55'30.3"W).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no IPA. Segmentos de colmo de cana-de-açúcar da variedade RB041443, foram tratados termicamente para desinfecção segundo conforme a metodologia de Tokeshi (1997). Em seguida, foram propagados em bandejas contendo subsolo de argissolo vermelho-amarelo autoclavado. Após dez dias do plantio, as plântulas brotadas foram transplantadas para 18 vasos, cada um contendo 8 kg do mesmo subsolo autoclavado. No

momento do transplântio, 9 vasos foram inoculados com 200 esporos de FMA *Dentiscutata heterogama* (FMADH). As plantas foram regadas com solução de Hoagland (1/2 x) com ausência de fósforo (Hoagland e Arnon, 1938) e água destilada em dias alternados. Após 110 dias do transplântio, metade as plantas foram submetidas à supressão de rega por 7 dias. Plantas controle permaneceram com irrigação constante, a 70% da capacidade de pote. Após 117 dias de transplântio foram coletadas as raízes para análise proteômica. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2, com seis tratamentos: 1- plantas irrigadas não inoculadas, 2- plantas irrigadas e inoculadas com FMA, 3- plantas submetidas ao déficit hídrico não inoculadas, 4- plantas submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com FMA; 5 – plantas reidratadas não inoculadas e 6 – plantas reidratadas inoculadas com FMA. Em cada tratamento apresentava 3 repetições, totalizando 18 unidades experimentais.

2.1. Análise Proteômica

2.1.1. Preparação das proteínas e digestão tríptica

As proteínas solúveis totais radiculares da variedade RB041443 submetida ao déficit hídrico e inoculação com FMDH foram extraídas pelo método fenólico de Wang et al (2006) com modificações. Em seguida as amostras foram quantificadas em fluormetro Qubit 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante e em seguida submetidas à eletroforese em géis SDS-PAGE (12,5 % de poliacrilamida) para certificação da integridade das proteínas extraídas. O processo de digestão tríptica (TrypsinGold, Promega, WI, USA) seguida de dessalinização em coluna C18Sep-Pack (Oasis) para extração em fase sólida foi realizado conforme metodologia de Nascimento et al (2018).

2.1.2. Espectrometria de massas UPLC-MS e identificação das proteínas

As amostras obtidas foram injetadas em cromatógrafo Nano ACQUITY UPLC® (Waters Corp.) equipado com tecnologia de diluição online 2D e acoplado ao espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters), do Instituto Tecnológico Vale – ITV (Belém, PA, Brasil).

A primeira dimensão cromatográfica foi realizada a partir de uma alíquota de 4,5 µg de cada amostra em coluna de fase reversa BEH C18 300 Å, 5 µM 300 um

x 50 mm (XBridge™, Waters Corp.) e taxa de fluxo de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A segunda dimensão cromatográfica foi realizada em coluna C18 de 100 μm x 10 mm empacotada com partículas híbridas de superfície alterada (CSH) de 1,8 μm (Acquity UPLC M-Class CSH C18, Waters Corp., Milford, MA). Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Synapt G2-S equipado com fonte de ionização por eletrospray padrão (ESI, Waters) e operado no modo de resolução de íons positivos para todas as medições. Os espectros de massa foram adquiridos em modo contínuo em faixa de m/z 50-1200 Da, usando tensão capilar de 2,6 KV, temperatura da fonte 100°C, tensão de compensação da fonte 100 V, fluxo de gás do cone de 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ e cone tensão de 40 V. O tempo de aquisição espectral em cada ajuste de energia foi de 0,5 s. Foi usada solução a 0,2 μM Glu1-fibrinopeptídeo (785,8427 Da) como massa fixa, fornecida a uma taxa de fluxo de 0,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ usando bomba auxiliar do sistema de cromatografia líquida. A massa de bloqueio foi amostrada a cada 30 s em varreduras de 0,1 s na mesma faixa de massa.

Para a identificação presumível das proteínas, os dados brutos de MS foram processados no software Progenesis Q1 for Proteomics (Q1p) utilizando os bancos de dados via Protein Lynx Global Server (PLGS) 3.0.2 (Waters Corp, Milford, MA, EUA) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Foram utilizados os seguintes parâmetros: i) modificação fixa: carbamidometilação (C), ii) modificações variáveis: oxidação (M) desaminação (N), amidação (C-terminal) e fosforilação (STY), e iii) taxa de falsa descoberta de peptídeos (FDR) de 1%. A seleção das proteínas para validação foi realizada com base no valor de ANOVA significativa maior que 95% ($p < 0,05$) e $\log_2(\text{FC, fold change})$ na comparação entre plantas da variedade RB111443 sob déficit hídrico inoculadas ou não com FMADH.

2.1.3. Ontologia gênica e interação proteína-proteína (PPI)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico no programa OmicsBox/Blast2GO (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), utilizando as ferramentas Blastp, InterProScan e GO-Slim (Mitchell et al., 2019). A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto das DAPs de cada tratamento foram utilizadas em todas as comparações.

As análises de PPI foram previstas usando StringApp do Cytoscape (versão: 3.8.0) (Szklarczyk et al, 2016). No software foi importada a rede do banco de dados

STRING v. 11.0 (<https://string-db.org/>) utilizando os seguintes parâmetros: i) Banco de dados: STRING: protein query, ii) Espécie: *Arabidopsis thaliana*, iii) cutoff: confiança média (0,4) e métodos de previsão: vizinhança conservada, coocorrência, fusão, coexpressão, experimentos, bancos de dados e mineração de texto. Adicionalmente, foi importada a tabela com os dados $\log_2(FC)$ dos tratamentos.

3. Resultados

Foram identificadas 81 DAPs, sendo 60 identificadas na condição não-colonizadas por *Densticutata* heterogama e 22 na condição colonizadas DH (Tabela 1 e 2). A análise de ontologia gênica por processo biológico das DAPs identificadas revelou que as proteínas do tratamento não-inoculado com FMADH e inoculado foram distribuídas em 18 e 13 categorias, respectivamente (Figura 1). Dentre as categorias obtidas, destacam-se na condição sem FMA, Processo Biossintético, Resposta a químicos, Resposta a estímulos abióticos e Organização de componentes celulares, enquanto na condição com FMA, destacam-se as categorias Resposta a estresse, Processos de modificação proteica, Resposta a estímulos abióticos e Processo Biossintético.

Com relação a rede de interação das proteínas, na condição não-colonizada, foi observado a formação de seis clusters (Figura 2). Cluster A foi observado proteínas relacionadas ao processo de crescimento e defesa, Cluster B foi observado proteínas envolvidas com metabolismo proteico, Cluster C foram agrupadas proteínas relacionadas ao processo de lignificação, Cluster D foram agrupadas proteínas de defesa e metabolismo de aminoácidos, no Cluster E foi observado proteínas relacionadas modificação pós-traducionais e no Cluster F foram agrupadas proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos.

Na rede de interação das proteínas da condição colonizada foram observados três clusters (Figura 3). No Cluster A foi observado proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios, no Cluster B foi observado proteínas relacionadas a metabolismo de carboidratos e no Cluster C foram agrupadas proteínas relacionadas a síntese proteica.

As proteínas identificadas no cluster A foram relacionadas aos processos de crescimento e defesa, dentre as proteínas presentes no grupo destacam-se as proteínas malato desidrogenase 1 e 2 citoplasmática. Estas proteínas participam na síntese de oxalacetato e estão envolvidas na manutenção da homeostase

celular (TOMAZ, 2010). Além disso, estão envolvidas em respostas de defesa a patógenos, estresses abióticos, como frio, salinidade (WANG et al, 2016) e deficiência nutricional (WANG et al, 2015). O Maior acúmulo destas proteínas na condição estresse sem FMA, deve estar associado ao processo de crescimento radicular (WANG et al, 2015) para que a planta consiga atingir horizontes mais profundos no solo e obter água. Além disso, o acúmulo destas proteínas está relacionada a formação da parede celular, contribuindo para maior tolerância da planta por evitar ressecamento das raízes.

As proteínas identificadas no Cluster B foram relacionadas ao processo de metabolismo de proteínas, dentre estas destaca-se a Glutathione S-transferase 1. A GST1 é responsável por oxidar a glutathione promovendo o processo detoxificação de inseticidas e EROs. Por participar do mecanismo detoxificação, a GST1 radicular de cana-de-açúcar deve estar contribuindo para uma maior tolerância ao déficit hídrico, pois estudo evidenciam a participação desta proteína em resposta a diversos estresses, como a déficit hídrico (CICERO et al, 2015), salinidade (KISSOUDIS et al, 2015), induzindo genes envolvidos com resposta a estresses (SHARMA et al, 2014).

As proteínas presentes no cluster D são na sua maioria enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa e síntese de aminoácidos. Dentre as proteínas presentes no cluster foram identificadas várias proteínas relacionadas a biossíntese de metionina. Com destaque para a proteína S-adenosilmetionina sintase 1 (SAMS1), que foi a mais acumulada na condição de déficit hídrico sem FMA (FC = 3,27). A SAMS1 converte a metionina em S-adenosilmetionina, precursora de diversas moléculas, como as poliaminas (SAUTER et al, 2013), compostos relacionados aos processos de defesa a estresses ambientais, principalmente ao déficit hídrico. Além disso, S-adenosilmetionina é precursora da síntese de lignina pela CCoAOMT (BAI et al, 2018), proteína também identificada neste trabalho. Outra proteína identificada relacionada a metabolismo da metionina foi a Adenosilhomocisteinase que converte S-adenosilmetionina em adenosil e cisteína, precursor da glutathione, molécula envolvida com os processos detoxificação celular.

O Cluster E agrupou as proteínas UDP-N-acetilglucosamina N-acetilglucosaminatransferase SPINDLY (O82422), e uma protease (Q9LJL3) com ação metalopeptidase. A proteína SPINDLY atua como um repressor na via de

sinalização da giberelina (GA) (OLSZEWSKI et al., 2010) para inibir o alongamento do hipocótilo, e nas vias do relógio circadiano de controle da floração, Estudos evidenciam que o acúmulo da proteína SPINDLY compromete a tolerância das plantas ao estresse hídrico, pois interfere na expressão de genes responsivos a estresse com os DREBs (QUIN et al, 2011).

No Cluster F foram identificadas duas proteínas envolvidas com o ciclo das pentoses fosfato, a 6-fosfogliconato desidrogenase descarboxilase 1 e 6-fosfogliconolactonase 4 cloroplastidial. Ambas participam do processo de conversão da glicose 6-fosfato para ribose 5-fosfato. O maior acúmulo destas proteínas nesta condição deve estar relacionado ao processo de manutenção da homeostase celular por meio do equilíbrio redox devido a redução dos H⁺ nos compartimentos celulares (STINCONE et al, 2015), conferindo maior tolerância nas plantas em respostas a estresse ambientais (TIAN et al, 2021). Outra proteína presente neste Cluster foi a proteína HMG-Y grupo A (HMGA), a qual parte de um grande grupo de proteínas cromossômicas relacionadas com processos de regulação gênica (GROSSCHEDL, GIESE and PAGEL, 1994). A HMGA está envolvida com os processos desenvolvimento do endosperma induzindo o acúmulo de amido pelas plantas. Além disso, participar de diversos mecanismos de reposta aos estresses abióticos, como resposta à temperatura (ZHANG et al, 2020) e ao déficit hídrico (XU et al, 2021). O acúmulo desta proteína nesta condição deve estar relacionado a produção de amido, visto que, amido é uma molécula osmoprotetora evitando o ressecamento das raízes mediante o déficit hídrico. Esta hipótese pode confirmada pela presença da proteína 6-fosfogliconolactonase 4 cloroplastidial que está diretamente relacionada ao acúmulo de amido nos plastídios em resposta a estresses por temperatura (RIBEIRO et al, 2020).

Estresse com FMA

No cluster B foram agrupadas as proteínas: sub. beta 3 do componente E1 da piruvato desidrogenase cloroplastidial, a fosfoenolpiruvato carboxilase 2 (PEPC2) e malato desidrogenase mitocondrial (mMDH). A malato desidrogenase é uma proteína envolvida na conversão do malato em oxaloacetato no interior das mitocôndrias. O maior acúmulo da mMDH deve estar relacionada ao crescimento radicular das plantas, como foi observado Wang et al (2015) em plantas transgênicas que superexpressavam o gene mMDH. Além disso, a colonização por

FMA também favorece a maior atividade da mMDH e da PEPC como foi observado Kchikich et al (2021) em três variedades sorgos micorrizadas.

No Cluster C foram identificadas proteínas relacionadas a síntese proteica. Dentre as proteínas agrupadas neste cluster a proteína Fator de alongação 1 subunidade gama 2 (EF-1-gamma 2) é a proteína principal do grupo. A proteína EF-1-gamma-2 forma conjuntamente com outras três proteínas o complexo EF1 que apresenta várias funções (SASIKUMAR et al, 2012). Além de participar a síntese proteica o os fatores de alongação podem se complexar com proteínas HSPs evitando a desnaturação das demais proteínas celulares, principalmente em condições de estresse, garantindo tolerância a estresse como déficit hídrico e salinidade (GAO et al,2019).

A proteína desidratase NAD(P)HX dependente de ATP foi a mais acumulada na condição déficit hídrico com FMA. Está envolvida no reparo do NADHX e NADPHX em NADH e NADPH respectivamente, permitindo a sua atividade (NIEHAUS et al, 2014; COLINAS et al, 2014). Estas duas moléculas participam diversos processos biológicos interagindo com elétrons livres e EROs produzidos durante os processos metabólicos. Além disso, estão envolvidas em respostas a estresses, como estresse oxidativo, salinidade e altas temperaturas (YING, 2008). O maior acúmulo desta proteína pode estar envolvido no aumento de EROs devido ao déficit hídrico, sendo necessário maior disponibilidade das NADH e NADPH, evitando a degradação de diversas moléculas. Além disso, a presença do FMADH pode ter contribuído neste maior acúmulo, como foi observado por Lingua et al (2012) em plantas colonizadas por FMA submetida a estresse por metal pesado.

5. Conclusão

Foi observado que as repostas moleculares das plantas submetidas ao déficit hídrico não-colonizadas diferiram das respostas das plantas submetidas ao déficit hídrico colonizadas.

As proteínas mais acumuladas na condição sem FMA: malato desidrogenase citoplasmática e SPINDLY e as proteínas mais acumuladas na condição com FMA: malato desidrogenase mitocondrial e desidratase NAD(P)HX dependente de ATP são possíveis marcadores funcionais.

6.Referências

Bai Z, Qi T, Liu Y, Wu Z, Ma L, Liu W, Cao Y, Bao Y, Fu C. Alteration of S-adenosylhomocysteine levels affects lignin biosynthesis in switchgrass. *Plant Biotechnol J*. 2018 Dec;16(12):2016-2026. doi: 10.1111/pbi.12935.

Bonfante P, Genre A. Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak 'plantish' or 'fungish'? *Trends Plant Sci*. 2015 Mar;20(3):150-4. doi: 10.1016/j.tplants.2014.12.002. Epub 2015 Jan 9. PMID: 25583176.

Cicero, L. L., Madesis, P., Tsiftaris, A. & Piero, A. R. L. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. *Phytochemistry* 116, 69–77 (2015).

Colinas M, Shaw HV, Loubéry S, Kaufmann M, Moulin M, Fitzpatrick TB. A pathway for repair of NAD(P)H in plants. *J Biol Chem*. 2014 May 23;289(21):14692-706. doi: 10.1074/jbc.M114.556092.

Dias, H. B.; Sentelhas, P. C. Sugarcane yield gap analysis in Brazil – A multi-model approach for determining magnitudes and causes. *Science of The Total Environment*, v. 637-638, p. 1127–1136, 1 out. 2018.

Gao Y, Ma J, Zheng JC, Chen J, Chen M, Zhou YB, Fu JD, Xu ZS, Ma YZ. The Elongation Factor GmEF4 Is Involved in the Response to Drought and Salt Tolerance in Soybean. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 19;20(12):3001. doi: 10.3390/ijms20123001. PMID: 31248195; PMCID: PMC6627591.

Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*. 1994 Mar;10(3):94-100. doi: 10.1016/0168-9525(94)90232-1.

Kchikich, A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Enhance Sorghum Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions through Activation of Nitrogen and Carbon Metabolism Enzymes. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 26, n. 02, p. 201–208, 1 ago. 2021.

Kissoudis, C. et al. Stress-inducible GmGSTU4 shapes transgenic tobacco plants metabolome towards increased salinity tolerance. *Acta physiologiae plantarum* 37, 102 (2015).

Lingua G, Bona E, Todeschini V, Cattaneo C, Marsano F, Berta G, Cavaletto M. Effects of heavy metals and arbuscular mycorrhiza on the leaf proteome of a selected poplar clone: a time course analysis. *PLoS One*. 2012;7(6):e38662. doi: 10.1371/journal.pone.0038662.

Monteiro, L. A., Sentelhas, P. C., and Pedra, G. U.: Assessment of NASA/POWER satellite-based weather system for Brazilian conditions and its impact on sugarcane yield simulation, *Int. J. Clim.*, 38, 1571-1581, <https://doi.org/10.1002/joc.5282>, 2018.

Niehaus TD, Richardson LG, Gidda SK, ElBadawi-Sidhu M, Meissen JK, Mullen RT, Fiehn O, Hanson AD. Plants utilize a highly conserved system for repair of NADH and NADPH hydrates. *Plant Physiol*. 2014 May;165(1):52-61. doi: 10.1104/pp.114.236539.

Qin F, Kodaira KS, Maruyama K, Mizoi J, Tran LS, Fujita Y, Morimoto K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. SPINDLY, a negative regulator of gibberellic acid signaling, is involved in the plant abiotic stress response. *Plant Physiol*. 2011 Dec;157(4):1900-13. doi: 10.1104/pp.111.187302

Reyes JAO, Carpennero AS, Santos PJA, Delfin EF. Effects of Water Regime, Genotype, and Formative Stages on the Agro-Physiological Response of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) to Drought. *Plants (Basel)*. 2020 May 23;9(5):661. doi: 10.3390/plants9050661. PMID: 32456149; PMCID: PMC7284505.

Ribeiro C, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM, Cline K, Settles AM. Engineering 6-phosphogluconate dehydrogenase improves grain yield in heat-stressed maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Dec 15;117(52):33177–85. doi: 10.1073/pnas.2010179117.

Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012 Jul-Aug;3(4):543-55. doi: 10.1002/wrna.1118. Epub 2012 May 3. PMID: 22555874; PMCID: PMC3374885.

Sauter, M.; Moffatt, B.; Saechao, M.C.; Hell, R.; Wirtz, M. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: Essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem. J*. 2013, 451, 145–154.

Sharma, R., Sahoo, A., Devendran, R. & Jain, M. Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in *Arabidopsis*. *PloS one* 9, e92900 (2014).

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MM, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning NM, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2015 Aug;90(3):927-63. doi: 10.1111/brv.12140

Tian Y, Peng K, Bao Y, Zhang D, Meng J, Wang D, Wang X, Cang J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase genes of winter wheat enhance the cold tolerance of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*. 2021 Apr;161:86-97. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.02.005.

Tomaz T, Bagard M, Pracharoenwattana I, Lindén P, Lee CP, Carroll AJ, Ströher E, Smith SM, Gardeström P, Millar AH. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2010 Nov;154(3):1143-57. doi: 10.1104/pp.110.161612. Epub 2010 Sep 27.

Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH and Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8:263–276. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00491.x

Wang QJ, Sun H, Dong QL, Sun TY, Jin ZX, Hao YJ, Yao YX. The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. *Plant Biotechnol J*. 2016 Oct;14(10):1986-97. doi: 10.1111/pbi.12556. Epub 2016 Mar 29.

Wang ZA, Li Q, Ge XY, et al. The mitochondrial malate dehydrogenase 1 gene GhmMDH1 is involved in plant and root growth under phosphorus deficiency conditions in cotton. *Scientific Reports*. 2015 Jul;5:10343. DOI: 10.1038/srep10343.

Xu K, Chen S, Li T, Yu S, Zhao H, Liu H, Luo L. Overexpression of OsHMGB707, a High Mobility Group Protein, Enhances Rice Drought Tolerance by Promoting Stress-Related Gene Expression. *Front Plant Sci*. 2021 Aug 5;12:711271. doi: 10.3389/fpls.2021.711271.

Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):179-206. doi: 10.1089/ars.2007.1672.

Zhang, X., Zhuang, L., Liu, Y. et al. Protein phosphorylation associated with drought priming-enhanced heat tolerance in a temperate grass species. *Hortic Res* 7, 207 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00440-8>.

Tabela 1: Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB041443 não-colonizadas por *Dentiscutata heterogama* e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.

Uniprot ID	Protein	Log 2 (FC)	Molecular Mass	Biological Process
Q0JGZ6	Fructokinase-1	Exclusive	57260,5	BP, CCO, CMP, L
Q6YT00	Proteasome subunit alpha type-7-A	Exclusive	54832,38	CP, PMP
Q69NG5	Probable 6-phosphogluconolactonase 4_ chloroplastic	Exclusive	24432,88	CMP, G, N
A6XMY9	S-adenosylmethionine synthase 1	3,271318	35840,12	BP, CEP
O23254	Serine hydroxymethyltransferase 4	2,07565	43273,96	BP, CR, CP, D, MOD, RA, RC
O23865	Phenylalanine ammonia-lyase 1	1,80235	34675,73	BP, CEP, CP, MOD, RC, RL, RS, SM
O24030	Proteasome subunit alpha type-7	1,70909	92294,2	CP, PMP
O24047	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	1,556383	17967,38	G, RC
O47881	L-galactono-1_4-lactone dehydrogenase_ mitochondrial	1,290892	61860,84	BP, CEP, CMP
O48905	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	1,105417	35889,08	G, RC
O49499	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1	1,10326	35932,93	BP, CEP, CR, L, SM
O50003	60S ribosomal protein L12	0,998386	28594,52	TR
O81833	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-1	0,77429	41666,43	CEP, PMP, RB, RC, REN, REX, RS
O82054	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	0,754859	68171,79	BP, CEP, RC, REN, RS, SM
O82422	Probable UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase SPINDLY	0,750696	42633,75	BP, CCO, CDI, PMP, RC, REN, S
O82549	Phospholipase D alpha 1	0,677925	226987	CP, L, PED, RA, RB, RC, REN, REX, RS, S
P09189	Heat shock cognate 70 kDa protein	0,665693	37346,69	CP, PMP, RA, RB, RC, REX, RS, S
P12329	Chlorophyll a-b binding protein 1_ chloroplastic	0,655983	43676,27	G, P, RL
P12653	Glutathione S-transferase 1	0,606695	121756,3	BP, CEP, RA, RB, RC, REX, RS

P14717	Phenylalanine ammonia-lyase	0,586169	86104,32	BP, CEP, CP, MOD, RC, RL, RS, SM
P24825	Chalcone synthase C2	0,586051	105368,2	BP, SM
P26870	Ribosomal protein S11_ mitochondrial	0,58318	75902,45	CEP, N, TR
P49199	40S ribosomal protein S8	0,55862	76068,74	CEP, N, TR
P50433	Serine hydroxymethyltransferase_ mitochondrial	0,552466	29269,32	BP, CR, CP, D, MOD, RC, RL, RS
P52894	Alanine aminotransferase 2	0,548508	24049,74	BP, CEP, CP, RA, RS
P57751	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	0,543869	60214,19	CCO, CDE, CMP, G, MOD, N
P68173	Adenosylhomocysteinase	0,53397	43757,53	E, EP, PED, R
P93584	Actin-82 (Fragment)	0,504949	92958,35	CCO, PED
Q0DKY4	S-adenosylmethionine synthase 1	0,493296	29034,09	BP, CEP
Q0JBZ8	Hydroxycinnamoyltransferase 1	0,417353	66116,25	BP, CCO, MOD, SM
Q0ZIWO	Protein TIC 214	0,416275	80451,06	CEP, T
Q1PEN0	Receptor-like protein 36	0,399927	27929,86	A, RA, RB, RC, REX, RS
Q2QN36	Probable protein phosphatase 2C 78	0,399461	51565,95	CEP, MOD, PED, RA, RB, REX, RS
Q2QNE3	CASP-like protein 4C1	0,393537	23246,46	
Q2QNG7	ATP-citrate synthase alpha chain protein 3	0,366214	75382,86	BP, L, N
Q2TPW5	11S globulin seed storage protein Jug r 4	0,357499	32933,94	CCO, PED, R
Q3EAY9	Probable pectinesterase 30	0,353163	59112,04	CCO, CMP, CP, RB, REX
Q6H7M1	Fumarylacetoacetase	0,334647	24405,48	CDE, CP
Q6Z6S1	Apoptosis inhibitor 5-like protein API5	0,330183	32075,29	CDE, MOD
Q8GUM2	Heat shock 70 kDa protein 9_ mitochondrial	0,325291	58429,62	CDI, CG, CP, MOD, PO, RC, RS, S
Q8LPD9	Phototropin	0,32514	43594,87	CCO, CDI, CG, CR, E, PED, PMP, PO, RC, REN, RL, RMF, T, TRO, S
Q8S3R1	Monodehydroascorbate reductase 1_ peroxisomal	0,305502	26691	CEP, CP, RC
Q8VXG7	Phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase	0,301963	71875,99	BP, CEP, CP, MOD, RC, RL, RS, SM
Q9FFY6	Protein ELC-like	0,296671	55971,94	CEP, TR
Q9FL99	F-box/FBD/LRR-repeat protein At5g44980	0,294655	39863,73	
Q9FYS5	HMG-Y-related protein A	0,293212	53674,44	BP, CCO, D, PE, R

Q9LI00	6-phosphogluconate dehydrogenase_ decarboxylating 1	0,281134	48894,65	CCO, CMP, CP, G, N, R, RA, RC, REN, RS
Q9LJL3	Presequence protease 1_ chloroplastic/mitochondrial	0,268989	47137,14	PMP
Q9LT76	Putative F-box/kelch-repeat protein At3g19410	0,261471	47675,22	
Q9LTH7	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 12	0,241706	13869,97	BP, CEP, CMP, RB, RC, REX, SM
Q9M4P3	Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g16835_ mitochondrial	0,233952	77358,44	N, PED, R
Q9M5P8	Alpha-soluble NSF attachment protein	0,224199	52090,79	CCO, TR
Q9MAH0	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	0,219019	41824,48	CCO, G, MOD, TR
Q9SDS8	Transcription factor MYB8	0,215517	24386,18	CG, CMP, CR, F, L, RC, REN, RL, RS, SM
Q9SF92	Ras-related protein RABC2b	0,212048	61953,16	A, CDI, CG, PO, TR
Q9SIU8	Probable protein phosphatase 2C 20	0,208768	53839,6	CEP, PMP, PO
Q9SN86	Malate dehydrogenase_ chloroplastic	0,204465	52174,25	CCO, CEP, CMP, CP, E, G, L, PED, R, RA, RB, REX, RS, TR
Q9SP37	Adenosylhomocysteinase	0,187799	27846,39	E, EP, PED, R
Q9SRQ5	BTB/POZ domain-containing protein At3g03510	0,185098	24694,77	CEP, PED, PMP, R, RA, TRO

Legenda: A: Anatomical Structure Development; BP: Biosynthetic Process; CC: Cell Cycle; CCO: Cellular Component Organization; CDE: Cell Death; CDI: Cell Differentiation; CEP: Cellular Process; CG: Cell Growth; CP: Catabolic Process; CMP: Carbohydrate Metabolic Process; CR: Circadian Rhythm; E: Embryo Development; EP: Epigenetic Regulation of Gene Expression; F: Flower development; G: Generation of Precursor Metabolites and Energy; L: Lipid Metabolic Process; MEP: Metabolic Process; MOD: Multicellular Organism Development; N: Nucleobase-Containing Compound Metabolic Process; P: Photosynthesis; PED: Post-embryonic Development; PMP: Protein Metabolic Process; PO: Pollination; R: Reproduction; RA: Response to Abiotic Stimulus; RB: Response to Biotic Stimulus; RC: Response to Chemical; REN: Response to Endogenous Stimulus; REX: Response to External Stimulus; RL: Response to Light Stimulus; RMF: Regulation of molecular function; RS: Response to Stress; S: Signal Transduction; SM: Secondary Metabolic Process; T: Transport; TR: Translation; TRO: Tropism.

Tabela 2: Anotação presumível das proteínas detectadas em raízes de cana-de-açúcar RB041443 colonizadas por *Dentiscutata* heterogama e submetidas ao déficit hídrico, selecionados com variação significativa entre amostras colonizadas ou não pelo FMA, identificadas através do software Progenesis IQ.

Uniprot ID	Protein	Log 2 (FC)	Molecular Mass	Biological Process
Q94DD4	Sialyltransferase-like protein 1	Exclusive	14458,8	BP, CEP, PMP
A3KPF8	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g79080_ chloroplastic	Exclusive	34764,45	N
C5Y210	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	2,332056	73674,95	N
F4J0C0	AAA-ATPase At3g28600	1,545584	45143,42	CEC, PED, R, RA, RB, RC, REN, RS
O22899	Probable pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH3	0,989861	45922,47	CCO, CDI, CG, E, N, PED, R, RB, REX,
O50046	Tryptophan synthase beta chain 2_ chloroplastic	0,974602	55100,05	BP, CEP
P41095	60S acidic ribosomal protein P0	0,943391	55301,68	CCO, RA, RC, RS, TR
P42732	30S ribosomal protein S13_ chloroplastic	0,850471	39737,76	TR
P46487	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	0,818049	65038,27	CMP, CP, G, L, RB, REX, RS
P53491	Actin (Fragment)	0,57822	61026,88	CCO, GR, PED
Q2QM55	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-3_ chloroplastic	0,538101	81921,93	A, BP, CEC, CMP, CP, G, N, PO, RC, REX, RL, RS
Q6YW46	Elongation factor 1-gamma 2	0,532892	36690,51	RC, RS
Q6Z058	Heat shock 70 kDa protein BIP5	0,489426	42042,74	CDI, CG, CP, MOD, PMP, PO, RA, RB, RC, REX, S
Q7XTY9	Copper chaperone for superoxide dismutase_ chloroplastic	0,421474	96667,6	CH, MEP, RA, RS
Q8W471	Long-chain-fatty-acid--[acyl-carrier-protein] ligase AEE15_ chloroplastic	0,400384	51834,88	BP, CEP, L, SM
Q9FV65	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	0,383623	44025,42	CCO, G, MOD, T
Q9SEI4	26S proteasome regulatory subunit 6B homolog	0,359518	83281,12	CCO, CP, PED, PMP, R, RA, RB, RC, REX, RS

Q9SR52	Urease	0,330804	72587,46	CEP, CP
Q9XG77	Proteasome subunit alpha type-6	0,287539	111330,1	CP, PMP
Q67VC8	DNA polymerase lambda	0,213276	53808,62	BP, D, RL, RS
Q84MP7	Probable histone H2A variant 3	0,208608	19381,72	BP, D, RA, REX, RS
Q93W34	Polyadenylate-binding protein RBP45C	0,202286	34491,73	CCO, N, RA, RS, T, TR

Legenda: BP: Biosynthetic Process; CCO: Cellular Component Organization; CEP: Cellular Process; CP: Catabolic Process; CMP: Carbohydrate Metabolic Process; D: DNA Metabolic Process; G: Generation of Precursor Metabolites and Energy; L: Lipid Metabolic Process; MEP: Metabolic Process; MOD: Multicellular Organism Development; N: Nucleobase-Containing Compound Metabolic Process; PMP: Protein Metabolic Process; RA: Response to Abiotic Stimulus; RC: Response to Chemical; RL: Response to Light Stimulus; RS: Response to Stress; S: Signal Transduction; TR: Translation.

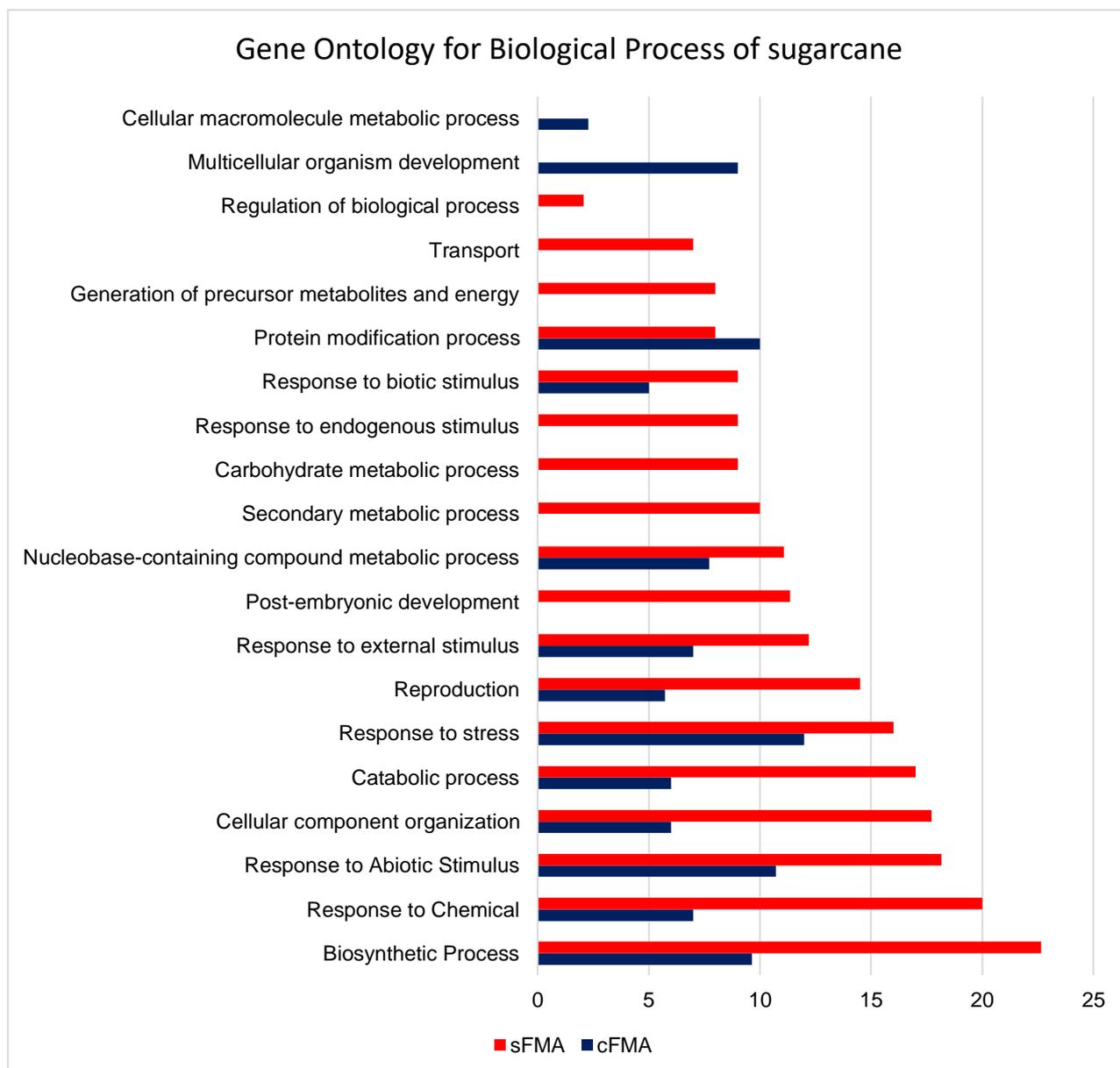


Figura 1: Categorização ontológica com base em processo biológico de proteínas identificadas na variedade de cana-de-açúcar RB041443 submetidas ao estresse por déficit hídrico em resposta a colonizadas por *Dentiscutata heterogama*.

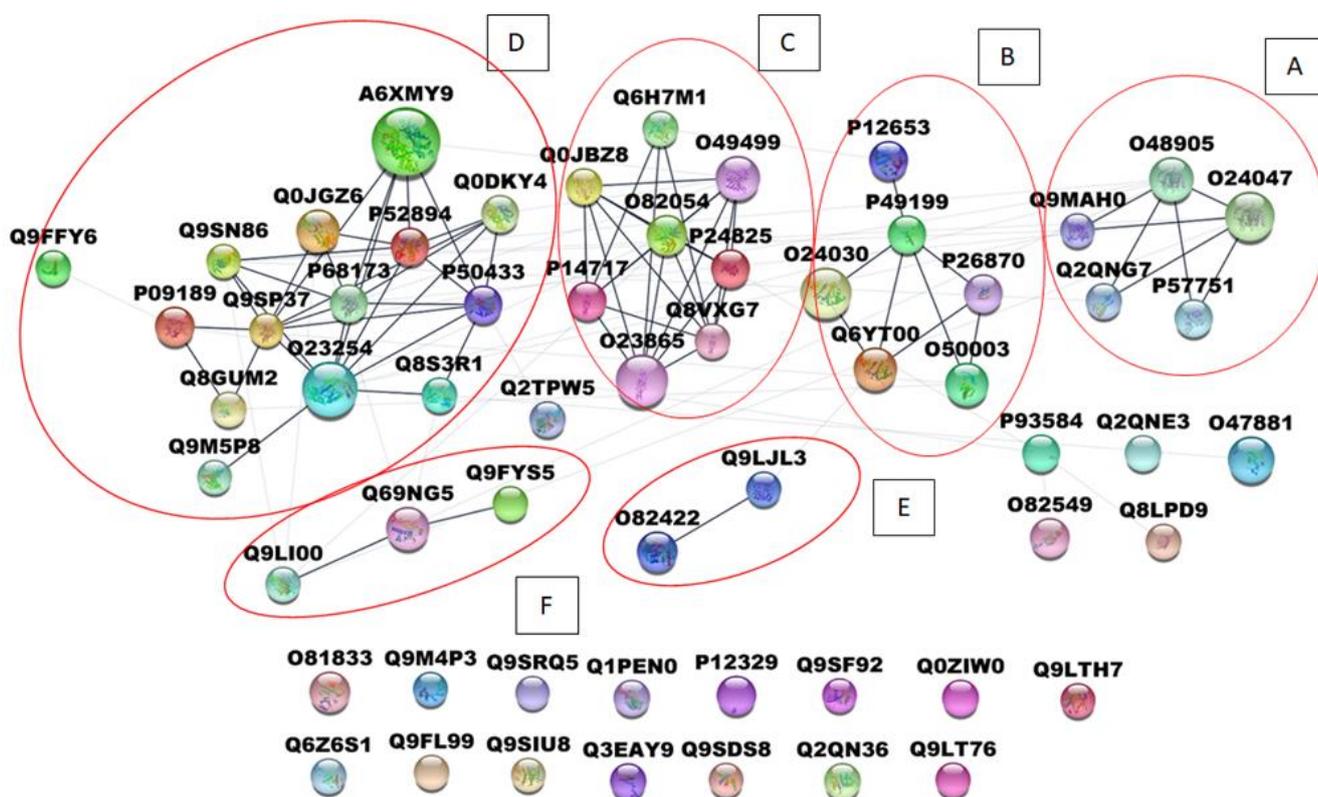


Figura 2. Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em raízes não micorrizadas (SSFMA) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de sessenta identificadas, rendeu seis clusters (A-F) baseadas em processos biológicos.

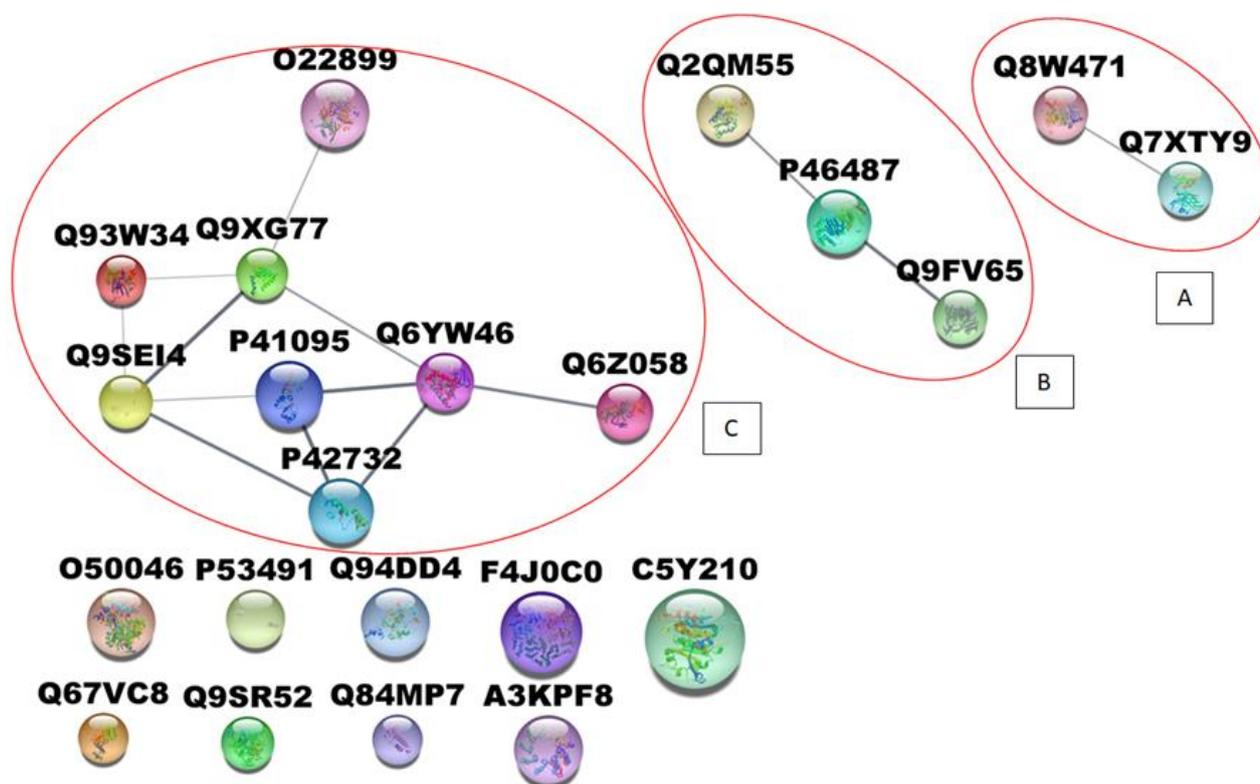


Figura 3. Interações proteína-proteína (base de dados STRING, confiança de 0,500) sob déficit hídrico em raízes micorrizadas com *Dentiscutata heterogama* (SFMADH) de cana-de-açúcar. Legenda: A rede de interações de vinte e uma proteínas identificadas, rendeu três clusters (A-C) baseadas em processos biológicos.

4 DISCUSSÃO GERAL

A colonização das variedades de cana-de-açúcar pelas diferentes espécies de fungos micorrizicos arbusculares promoveu alterações significativas nos diversos parâmetros morfométricos. Acarretando o aumento no crescimento radicular e foliar nas plantas colonizadas em relação as plantas não-colonizadas. Esta situação era esperada, pois a simbiose FMAs promove maior absorção de nutrientes, facilitando a obtenção de moléculas complexadas presentes no solo, desta forma, conferindo maior desenvolvimento para as plantas. No entanto, foi possível observar que a interação entre as espécies de FMA e as variedades de cana-de-açúcar diferiram entre si. A variedade RB867515 apresentou maior taxa de colonização em relação a variedade RB111443 para o isolado de FMADH, enquanto para o isolado FMACG ambas apresentaram a mesma taxa de colonização. Além das diferenças com relação a colonização, a RB867515 apresentou maiores alterações morfométricas do que RB111443 quando colonizadas, inferindo que a a interação com a variedade RB867515 seja mais eficaz do que a interação com a variedade RB111443.

Com relação ao déficit hídrico foi possível observar diversas alterações nas plantas colonizadas em relação plantas não-colonizadas, como maior acúmulo nos teores de carotenoides. Este pigmento está envolvido tanto na atividade antioxidante como na produção estringolactonas, um hormônio que sinaliza e favorece a processo de colonização pelos FMAs. Além disso, foi possível observar mitigação do estresse nas plantas colonizadas em relação as não-colonizadas, devido a uma melhor recuperação das plantas, principalmente na variedade RB867515, evidenciando que associação com os FMAs foi bastante benéfica para a cana-de-açúcar.

Com relação aos perfis proteicos analisados, foi possível observar uma diferença significativa entre as variedades com relação a quantidade de DAPs por tratamento. No

perfil proteico da variedade RB867515 houve maior quantidade de DAPs no tratamento colonizado por FMADH, enquanto o perfil proteico da variedade RB111443 houve maior quantidade de DAPs na condição não-colonizada. Esta variação pode indicar que variedade RB867515 apresenta maior interação com FMADH para a regulação de genes envolvidos com a resposta ao estresse hídrico, enquanto a variedade RB111443 aparentemente não necessita tanto desta interação para regular seus mecanismos de tolerância.

5 CONCLUSÕES

A interação da cana-de-açúcar com os fungos micorrizos arbusculares ocasionou as alterações fisiológicas e morfométricas em ambas as variedades, porém estas alterações variam em função das diferentes variedades e dos diferentes isolados de FMA.

A variedade RB867515 apresentou mecanismos de resposta que diferiam da variedade RB111443 quando colonizadas pelo mesmo FMA.

A variedade RB867515 interagiu de forma mais eficaz com os dois FMAs do que a variedade RB041443.

O fungo *Densticutata heterogama* foi mais eficaz na interação com as variedades de cana-de-açúcar.

As plantas colonizadas submetidas ao déficit hídrico apresentam diferenças significativas em relação as plantas não-colonizadas submetidas ao déficit hídrico.

O proteoma radicular de cana-de-açúcar foi responsivo tanto ao déficit hídrico como a interação com o FMADH.

O proteoma radicular de cana-de-açúcar diferiu entre as variedades quando colonizadas pelos mesmo FMA.

As proteínas GDH, PLY10, Protoclorofila reductase sub. N independente de luz, SPINDLY, MDH citoplasmática e mitocondrial e desidratase NAD(P)HX dependente de ATP são possíveis biomarcadores funcionais.

CURRÍCULO LATTES

Elton Pedro Nunes Pena
Curriculum Vitae

Novembro/2022

Elton Pedro Nunes Pena

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Elton Pedro Nunes Pena

Dados pessoais

Filiação Sergio Adriano Nunes Pena e Jeovanise Nunes Pena

Nascimento 17/08/1990 - Paulista/PE - Brasil

Carteira de Identidade 8314395 SDS - PE - 20/06/2007

CPF 089.543.924-74

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Proteômica radicular de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) associada a fungos micorrízicos arbusculares em resposta ao déficit hídrico
Orientador: Tercilio Calsa Junior
Co-orientador: Fabiana Aparecida Cavalcante Silva
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2015 - 2017** Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: Proteômica Cloroplastidial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob déficit hídrico, Ano de obtenção: 2017
Orientador: Tercilio Calsa Junior
Co-orientador: Fabiana Aparecida Cavalcante Silva
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2010 - 2013** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Título: ANÁLISE PROTEÔMICA CLOROPLASTIDIAL ASSOCIADA A BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas L.*) EM RESPOSTA À SECA
Orientador: Tercilio Calsa Junior
-

Formação complementar

- 2021 - 2021** Curso de curta duração em Cromatografia - Conceitos básicos. (Carga horária: 20h).
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasília, Brasil
- 2020 - 2020** Extensão universitária em Introdução à Computação para Bioinformática (linguagem de programação Python. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2019 - 2019** Extensão universitária em PCR Quantitativa em Tempo Real: Bases e Aplicações na Análise da Expressão. (Carga horária: 50h).

	Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2019 - 2019	Extensão universitária em XVII Curso de Análise de Dados Moleculares. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2019 - 2019	Extensão universitária em VI Curso de Sequenciamento de Nova Geração. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2018 - 2018	Curso de curta duração em Integração de Dados e Biologia de Sistemas.. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2018 - 2018	Curso de curta duração em Curso de Citometria de Fluxo.. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2017 - 2017	Curso de curta duração em 1º Curso Teórico de Análise Proteômica- Conceitos e Aplicações.. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2015 - 2016	Inglês. . (Carga horária: 320h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - PE, SENAC/PE, Recife, Brasil
2015 - 2015	Alemão. . (Carga horária: 160h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - PE, SENAC/PE, Recife, Brasil
2014 - 2014	Curso de curta duração em Biologia Forense. (Carga horária: 12h). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
2013 - 2013	Espanhol Instrumental I. . (Carga horária: 45h). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
2012 - 2012	Curso de curta duração em VII Curso de Biologia Molecular. (Carga horária: 20h). Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Biotecnologia e Desenvolvimento Sustentável. (Carga horária: 8h). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Perícia Criminal e Genética Forense. (Carga horária: 8h). Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Análise Proteômica. (Carga horária: 8h). Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de Pernambuco - UPE

Vínculo institucional

2015 - 2017 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:
 Aulas ministradas e carga horária: 1- Curso: Medicina/Bacharelado - Disciplina: Morfologia Funcional I (2015 - Aulas teóricas ministradas: Química dos nucleotídeos, Comunicação celular e Metabolismo de Cálcio e Fósforo. Carga horária: 6 h. 2- Curso: Ciências Biológicas/Bacharelado - Disciplina: Conceitos e Fundamentos de Biotecnologia - Aulas teóricas ministradas: FMA e Bactérias - PBL, situação-problema e júri simulado. Carga horária: 6 h.

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:

Aulas ministradas e carga horária: Curso de Graduação 1- Curso Ciências Biológicas/Bacharelado - Disciplina IN569 - Semestre de verão (Jan2018) Análise Proteômica - Carga horária: 30h; 2- Curso Ciências Biológicas/Bacharelado - Disciplina - Introdução a Genética (Fev a Jun2018) - Aulas teóricas ministradas: Teoria Cromossômica da Herança e Padrões de Herança Mendeliana e Extensões do Mendelismo - Aulas práticas ministradas: Vídeo/Discussão Científica, Visualização de células eucarióticas em diferentes fases do ciclo celular , Atividade prática sobre Teoria da Herança (Estudo Dirigido), Atividade prática sobre Padrões de Herança, Resolução de Exercícios/ Revisão, Resolução da Prova, Extração de DNA e Estudo dirigido, Aula sobre expressão gênica – PCR em tempo real (Estudo Dirigido) e Genetikando. Carga horária: 20 h; 3- Curso Ciências Biológicas/Bacharelado - Disciplina - Introdução a Genética (Ago a Dez2018) - Aulas teóricas ministradas: Teoria Cromossômica da Herança e Padrões de Herança Mendeliana e Extensões do Mendelismo - Aulas práticas ministradas: • Vídeo/Discussão Científica, Visualização de células eucarióticas em diferentes fases do ciclo celular , Atividade prática sobre Teoria da Herança (Estudo Dirigido), Atividade prática sobre Padrões de Herança, Resolução de Exercícios/ Revisão, Resolução da Prova, Extração de DNA e Estudo dirigido, Aula sobre expressão gênica – PCR em tempo real (Estudo Dirigido) e Genetikando. Carga horária: 20 h; 4- Curso Ciências Biológicas/Bacharelado - Disciplina IN569 - Semestre de verão (Jan2019) Análise Proteômica - Carga horária: 30h;

2011 - 2013 Vínculo: Estáguario , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações:
 Atuação na área de Genética no Estudo de Genoma e Proteoma de Plantas

3. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Vínculo institucional

2013 - 2014 Vínculo: Monitoria Voluntária , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Outras informações:
 Monitoria Voluntária da disciplina de Genética Geral pelo Departamento de Biologia.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. TRAVASSOS VIEIRA, JOANE ISIS; FERREIRA-SILVA, JOSÉ CARLOS; APARECIDA CAVALCANTE SILVA, FABIANA; **NUNES PENA, ELTON PEDRO**; CARVALHO FREITAS, LUCAS; SILVA CHAVES, MAIANA; VIANA GRÁZIA, JOÃO GABRIEL; CARVALHO PEREIRA, LUCAS; HENRIQUE DOS SANTOS FAGUNDES, RENAN; CALSA JUNIOR, TERCILIO; POMPEU DOS SANTOS FILHO, JOSÉ; FIGUEIREDO FREITAS, VICENTE JOSÉ; LEMOS OLIVEIRA, MARCOS ANTONIO
Proteomic Profile of Vitrified in Vitro-Produced Bovine Embryos (). CRYOLETTERS. , v.43, p.206 - 221, 2022.
2. PEÑA-MORENO, IRINA CHARLOT; PARENTE, DENISE CASTRO; DA SILVA, KAROLINI MIRANDA; **PENA, ELTON PEDRO NUNES**; SILVA, FABIANA APARECIDA CAVALCANTE; CALSA JUNIOR, TERCILIO; DE BARROS PITA, WILL; DE MORAIS JR, MARCOS ANTONIO
Comparative proteomic analyses reveal the metabolic aspects and biotechnological potential of nitrate assimilation in the yeast *Dekkera bruxellensis*. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. , v.105, p.1585 - 1600, 2021.
3. FERREIRA-SILVA, JOSÉ CARLOS; OLIVEIRA SILVA, ROBERTA LANE; TRAVASSOS VIEIRA, JOANE ISIS; SILVA, JÉSSICA BARBOZA; TAVARES, LETHICIA SOUZA; CAVALCANTE SILVA, FABIANA APARECIDA; **NUNES PENA, ELTON PEDRO**; CHAVES, MAIANA SILVA; MOURA, MARCELO TIGRE; JUNIOR, TERCILIO CALSA; BENKO-ISEPPON, ANA MARIA; FIGUEIRÊDO FREITAS, VICENTE JOSÉ; LEMOS OLIVEIRA, MARCOS ANTONIO
Evaluation of quality and gene expression of goat embryos produced in vivo and in vitro after cryopreservation. CRYOBIOLOGY. , v.101, p.115 - 124, 2021.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. PENA, E. P. N.; LIRA, N. P. V.; Folha, REO; SOUZA, J. M.; Almeida, RR; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Análise In Silico Comparativa da HSP70 e HSP80 Expressas em Diferentes Órgãos de Cana-de-Açúcar In: I Congresso Nacional de Ciências Biológicas e IV Simpósio Nordeste de Ciências Biológicas, 2011, Recife.
Anais do I Congresso Nacional de Ciências Biológicas. , 2011.
2. SOUZA, J. M.; SOUZA, A. E. R.; PENA, E. P. N.; LIRA, N. P. V.; MANSO, t. C.; PACHECO, C. M.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Caracterização In Silico de Genes de Expansina Presentes em Cana-de-Açúcar In: I Congresso Nacional de Ciências Biológicas e IV Simpósio Nordeste de Ciências Biológicas, 2011, Recife.
Anais do I Congresso Nacional de Ciências Biológicas. , 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ROCHA, G. M. G.; DANTAS, T. F.; SILVA, F. A. C.; PENA, E. P. N.; LIMA, L. M.; Calsa Jr, T
ANÁLISE IN SILICO DAS PROTEÍNAS RUBISCO E YCF4 EM ALGODÃO NATURALMENTE COLORIDO SOB ESTRESSE POR RADIAÇÃO UVB In: III Simpósio Norte e Nordeste de Bioinformática, 2018, Recife.
Anais do III Simpósio Norte e Nordeste de Bioinformática. , 2018.
2. PENA, E. P. N.; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA SHOTGUN DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO: UM ENFOQUE CLOROPLASTIDIAL In: VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018, Recife.
Anais da VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética. , 2018.

3. SILVA, R. R.; PENA, E. P. N.; SILVA, R. G. G.; LIMA, S. C. B. S.; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
VALIDAÇÃO IN SILICO DA PROTEÍNA AFP3 (ABI FIVE BINDING PROTEIN 3) DE CANA-
DEAÇÚCAR (SACCHARUM SPP.) EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO In: III Simpósio Norte e
Nordeste de Bioinformática, 2018, Recife.

Anais do III Simpósio Norte e Nordeste de Bioinformática. , 2018.

4. SANTANA, M. D. S. C.; OLIVEIRA, M. S.; PENA, E. P. N.; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
DIFFERENTIAL PROTEOME ANALYSIS OF PRICKLY PEAR (OPUNTIA STRICTA) IN RESPONSE
TO INFESTATION BY CACTUS SCALE (DIASPIS ECHINOCACTI) In: VI Simpósio Brasileiro de
Genética Molecular de Plantas, 2017, Ouro Preto - MG.

Anais do VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. , 2017.

5. PENA, E. P. N.; SOUZA, A. E. R.; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
SUGARCANE CHLOROPLAST-ENRICHED LEAF PROTEOME ANALYSIS UNDER WATER
DEFICIT In: VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2017, Ouro Preto - MG.

Anais do VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. , 2017.

6. ROCHA, G. M. G.; OLIVEIRA, M. S.; PENA, E. P. N.; SILVA, F. A. C.; LIMA, L. M.; SANTOS, R.
C.; Calsa Jr, T
ANÁLISE DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS
DE FOLHAS DE ALGODOEIRO COLORIDO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016,
Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

7. PENA, E. P. N.; OLIVEIRA, M. S.; SOUZA, A. E. R.; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CLOROPLASTIDIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM
SP.) SOB DÉFICIT HÍDRICO EM GEL SDS - PAGE In: XXI Encontro de Genética do Nordeste,
2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

8. SILVA, R. G. G.; OLIVEIRA, M. S.; PENA, E. P. N.; Almeida, RR; SILVA, F. A. C.; Calsa Jr, T
IDENTIFICAÇÃO EM COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO
DIFERENCIADA EM RESPOSTA A GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS In: XXI
Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

9. SANTANA, M. D. S. C.; PENA, E. P. N.; SILVA, F. A. C.; LIRA NETO, A. C.; Calsa Jr, T
ISOLAMENTO DE PROTEOMA SOLÚVEL DE PALMA FORRAGEIRA (OPUNTIA STRICTA)
PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA À SECA E INFESTAÇÃO POR
COCHONILHA - DE - ESCAMAS (DIASPIS ECHINOCACTI) In: XXI Encontro de Genética do
Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

10. LIMA, S. C. B. S.; SILVA, F. A. C.; PENA, E. P. N.; OLIVEIRA, M. S.; MELO, N. F.; ISEPPON,
A. M. B.; Calsa Jr, T
ISOLAMENTO DO PROTEOMA SOLÚVEL DE FOLHA E RAIZ DE S TYLOSANTHES SCABRA
VOGEL . PARA ANÁLISE DIFERENCIAL In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

11. SILVA, F. A. C.; SOUZA, A. E. R.; PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T
PROTEÔMICA DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA A ESTRESSE FOTOOXIDATIVO E SECA
VIA 2D - PAGE/MS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

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

Anais do 2nd Meeting of the Brazilian Proteomics Society jointly with the 2nd Pan American

HUPO Meeting. , 2014.

13. PENA, E. P. N.; Folha, REO; SOUZA, J. M.; SILVA, M. F. L. T.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO DE CLOROPLASTOS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FOLHAS DE PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS) In: 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 2013, Recife.

Anais da 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). , 2013.

14. SOUZA, J. M.; SOUZA, A. E. R.; PENA, E. P. N.; OLIVEIRA, R. S.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
ISOLAMENTO DA PAREDE CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE DIFERENTES TECIDOS EM CANA-DE-AÇÚCAR In: 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 2013, Recife.

Anais da 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). , 2013.

15. SOUZA, J. M.; SOUZA, A. E. R.; Folha, REO; BARBOSA NETO, A. G.; PENA, E. P. N.; SILVA, M. F. L. T.; OLIVEIRA, R. S.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR PURIFICATION OF CELL WALL PROTEOME OF LEAF IN SUGARCANE In: : XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2012, Recife.

Anais da : XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology. , 2012.

16. SOUZA, J. M.; SILVA, M. F. L. T.; PENA, E. P. N.; OLIVEIRA, R. S.; SOUZA, A. E. R.; Pestana-Calsa,MC; Almeida, RR; Calsa Jr, T
Otimização da extração de proteínas totais de folha em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) para 2D-PAGE In: V Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas, 2012, Recife.

Anais do V Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas. , 2012.

17. Folha, REO; BARBOSA NETO, A. G.; PENA, E. P. N.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Two-dimensional proteome mapping of physic nut (Jatropha curcas L.) chloroplast In: 58º Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu.

Anais da 58º Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PENA, E. P. N.; SILVA, F. A. C.; SOUZA, A. E. R.; OLIVEIRA, M. S.; Calsa Jr, T
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E MOLECULARES NA FOTOSSÍNTESE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO In: III Simpósio Nacional de Estudos para a Produção Vegetal no Semiárido, 2018, Campina Grande.

Anais do III Simpósio Nacional de Estudos para a Produção Vegetal no Semiárido. , 2018.

2. ROCHA, G. M. G.; SILVA, F. A. C.; PENA, E. P. N.; LIMA, L. M.; Calsa Jr, T
ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO NATURALMENTE COLORIDO SUBMETIDO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B In: III Simpósio Nacional de Estudos para a Produção Vegetal no Semiárido, 2018, Campina Grande.

Anais do III Simpósio Nacional de Estudos para a Produção Vegetal no Semiárido. , 2018.

3. LIMA, F. C. S.; NEVES, J. C.; PENA, E. P. N.; SANTANA, D. E. S. L.; SOARES, A. F.
A ENDOMETRIOSE ENTRE MULHERES DAS COMUNIDADES SÍTIOS SÃO BRAZ E CÓRREGO DA FORTUNA, RECIFE/PE: CONHECIMENTOS DO PÚBLICO ACERCA DO TEMA. In: XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), 2013, Recife.

Anais da XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX). , 2013.

4. PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T

“ANÁLISE PROTEÔMICA CLOROPLASTIDIAL VIA 2D-PAGE ASSOCIADA À BIODISSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS L.) EM RESPOSTA À SECA In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC), 2013, Recife.

Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC). , 2013.

5. SOUZA, J. M.; SOUZA, A. E. R.; PENA, E. P. N.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T

Análise comparativa da extração de proteínas de parede celular utilizando dois protocolos em cana-de-açúcar In: XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2012, Recife.

Anais da XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE. , 2012.

6. PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T

ANÁLISE PROTEÔMICA CLOROPLASTIDIAL VIA 2D-PAGE ASSOCIADA À BIODISSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS L.) EM RESPOSTA À SECA In: XX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC), 2012, Recife.

Anais do XX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC). , 2012.

7. PENA, E. P. N.; Folha, REO; PACHECO, C. M.; SOUZA, A. E. R.; LIRA, N. P. V.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T

Análise Cloroplastidial de Sorgo Relacionado à Síntese de Carboidratos para Produção de Bioetanol In: XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), 2011, Recife.

Anais do XI JEPEX. , 2011.

8. SOUZA, J. M.; PACHECO, C. M.; OLIVEIRA, R. S.; PENA, E. P. N.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T

Comparação do Proteoma de folha e raiz de cana-de-açúcar em condições de salinidade In: II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada:biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental, 2011, Recife.

Anais do II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada:biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental. , 2011.

9. PENA, E. P. N.; Almeida, RR; SOUZA, J. M.; OLIVEIRA, R. S.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T

Parâmetros Quantitativos de Proteínas Totais de Folhas de Cana-de-Açúcar sob Estresse Hídrico In: II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada:biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental, 2011, Recife.

Anais do II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada:biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental. , 2011.

Apresentação de trabalho e palestra

1. PENA, E. P. N.; Folha, REO; SOUZA, J. M.; SILVA, M. F. L. T.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO DE CLOROPLASTOS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FOLHAS DE PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS), 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

2. PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T

ANÁLISE PROTEÔMICA CLOROPLASTIDIAL VIA 2D-PAGE ASSOCIADA À BIODISSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS L.) EM RESPOSTA À SECA, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T

ANÁLISE PROTEÔMICA CLOROPLASTIDIAL VIA 2D-PAGE ASSOCIADA À BIODISSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS L.) EM RESPOSTA À SECA, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. PENA, E. P. N.; Folha, REO; PACHECO, C. M.; SOUZA, A. E. R.; LIRA, N. P. V.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Análise Cloroplastidial de Sorgo relacionado á Síntese de Carboidratos para Produção de Bioetanol, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. PENA, E. P. N.; LIRA, N. P. V.; Folha, REO; SOUZA, J. M.; Almeida, RR; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Análise In Silico Comparativa da HSP70 e HSP80 Expressas em Diferentes Órgãos de Cana-de-Açúcar, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. PENA, E. P. N.; Almeida, RR; SOUZA, J. M.; OLIVEIRA, R. S.; Pestana-Calsa,MC; Calsa Jr, T
Parâmetros Quantitativos para Análise de Proteínas Totais de Folhas de Cana-de-Açúcar sob Estresse Hídrico, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Rodrigo Rocha da Silva. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE DEFENSINA DE LEMNOIDEAE EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR PATÓGENOS BACTERIANOS**. 2020. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas**, 2017. (Simpósio)
SUGARCANE CHLOROPLAST-ENRICHED LEAF PROTEOME ANALYSIS UNDER WATER DEFICIT.
2. **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CLOROPLASTIDIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM SP.) SOB DÉFICIT HÍDRICO EM GEL SDS - PAGE.
3. **1st International Workshop on Cellular and Molecular Biology**, 2014. (Outra)
.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)**, 2013. (Congresso)
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO DE CLOROPLASTOS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FOLHAS DE PINHÃO-MANSO (JATROPHA CURCAS).
5. **GE Day/Microrray**, 2013. (Outra)
.
6. **I Jornada de Fisiologia Vegetal**, 2013. (Outra)

- .
7. **16° Seminário Regional Sobre Cana-de-açúcar**, 2012. (Seminário)
- .
8. **V SICBIO: Mini-curso: Purificação, Caracterização e Atividades Biológicas de Proteínas de Origem Vegetal**, 2012. (Simpósio)
- .
9. **V Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas (SICBIO)**, 2012. (Simpósio)
- .
10. **XI Semana do Biólogo - UPE**, 2012. (Congresso)
- .
11. **XI Semana do Biólogo - UPE : Minicurso: Leucemias, Linfomas e Anemias -Morfologia do Sangue Periférico e Novas Técnicas Diagnósticas** -, 2012. (Congresso)
- .
12. **XII JEPEX, Minicurso: ABORDAGEM CELULAR E MOLECULAR DO CANCÊR DE MAMA: ATUALIZAÇÕES EM DIAGNÓSTICOS E TRATAMENTO**, 2012. (Congresso)
- .
13. **XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX)**, 2012. (Congresso)
- .
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Congresso Nacional de Ciências Biológicas**, 2011. (Congresso)
Análise In Silico Comparativa da HSP70 e HSP80 Expressas em Diferentes Órgãos de Cana-de-Açúcar.
15. **II SEMEIO (II Semana do Meio Ambiente)**, 2011. (Outra)
- .
16. **IV Simpósio Nordestino de Ciências Biológicas**, 2011. (Simpósio)
- .
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão (JEPEX)**, 2011. (Congresso)
Análise Cloroplastidial de Sorgo relacionado á Síntese de Carboidratos para Produção de Bioetanol.

Organização de evento

1. **PENA, E. P. N.**
SEMANA UNIVERSITÁRIA: INTEGRANDO E CONSOLIDANDO A UPE, 2015. (Congresso, Organização de evento)
2. **PENA, E. P. N.; SOUZA, J. M.; SILVA, M. F. L. T.; OLIVEIRA, R. S.**
II BioCiclo de Minicursos UFRPE, 2014. (Outro, Organização de evento)
3. **PENA, E. P. N.; SOUZA, J. M.; SILVA, M. F. L. T.; OLIVEIRA, R. S.**
I BioCiclo de Minicursos UFRPE, 2013. (Outro, Organização de evento)
4. **Calsa Jr, T; BARBOSA NETO, A. G.; MANSO, t. C.; MARTINS, P. G. S.; SOUZA, A. E. R.; Almeida, RR; VILELA, R. D.; PENA, E. P. N.; SOUZA, J. M.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, M. F. L. T.; BEZERRA, J. M. N. A.; CAVALCANTI, R. F. N.; GOMES, N. O. C.**
I Curso Teórico-Prático em Análise Proteômica - I CTPAP, 2012. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. Calsa Jr, T; SOUZA, A. E. R.; **PENA, E. P. N.**

Participação em banca de Heloisa Gonçalves da Silva. **DETECÇÃO MOLECULAR DA BACTÉRIA LEIFSONIA XYLI SBSP. XYLI NA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR SP79-1011**, 2020
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

2. PENA, E. P. N.; Calsa Jr, T

Participação em banca de Rayssa Guedes Gomes da Silva. **Proteômica diferencial de colmo de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) sob fixação biológica de nitrogênio**, 2018
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco