



## Identificação de novos candidatos a repressores e ativadores da morfogênese *in vitro* durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizando proteômica e fosfoproteômica *label-free*

Lucas Rodrigues Xavier, Felipe Astolpho Almeida, Vitor Batista Pinto, Vanildo Silveira

A micropropagação via embriogênese somática (ES) é uma alternativa para superar a baixa eficiência da propagação vegetativa convencional de cana-de-açúcar. Estudos sobre a ES vêm identificando genes como *SERK1*, *BBM*, *LEC1* e *ABI3* que otimizam a micropropagação e regeneração de transgênicos, áreas de grande interesse biotecnológico. Neste trabalho, utilizamos abordagens proteômicas e fosfoproteômicas *label-free* para elucidar aspectos pouco estudados sobre a ES de cana-de-açúcar. Rolos foliares de 2-4 mm de espessura foram incubados no escuro por 45 dias em meio MS com 2,4-D para formar calos embriogênicos, seguidos por três ciclos de multiplicação de 21 dias. Em seguida, os calos foram maturados por 14 dias na presença de luz em meio MS sem 2,4-D para ativação da competência morfogenética. Foram extraídas proteínas de 300mg de calos de cinco réplicas biológicas antes (EC0) e durante a maturação (EC14), seguido pela sua quantificação, digestão com tripsina, quantificação dos peptídeos, enriquecimento de fosfopeptídeos (fosfoproteômica) e avaliação por espectrometria de massas. Os espectros foram processados contrastando EC14 e EC0 nos softwares PLGS e ISOquant (proteômica) ou MAXQuant (fosfoproteômica) utilizando banco de dados de *Saccharum spontaneum*. Proteínas e fosfoproteínas presentes em pelo menos 4 réplicas biológicas e com *fold change* >1,5 foram consideradas reguladas após avaliação por test-t ( $p < 0,05$ ), seguido pela anotação funcional utilizando o software Omics Box. Foram identificadas 592 proteínas diferencialmente abundantes, sendo 283 up-acumuladas em p\_EC0 e 309 em p\_EC14. Os processos biológicos celulares e de catabolismo foram mais representativos em p\_EC0 e os processos celulares e de biossíntese em p\_EC14. Na fosfoproteômica, 258 fosfoproteínas foram diferencialmente reguladas entre fp\_EC0 e fp\_EC14, sendo 117 mais fosforiladas em fp\_EC0 e 141 em fp\_EC14. As funções moleculares mais representativas foram ligação a proteínas e DNA em fp\_EC0, e de ligação a proteínas e nucleotídeos em fp\_EC14. As fosfoproteínas estão fosforiladas principalmente em resíduos de serina (92,3%) e localizadas majoritariamente no núcleo em EC0 e no citosol em EC14. A análise de fp\_EC0 e p\_EC0 evidenciou diversos repressores de transcrição, como TOPLESS e LEUNIG, indicando que a morfogênese é reprimida na presença de 2,4-D e o metabolismo dos calos na multiplicação é restrito. O estudo de fp\_EC14 e p\_EC14 relevou ativadores da morfogênese e fotossíntese, como PIF1 e TOR kinase, e mudanças no metabolismo do etileno, ácido abscísico, fotossíntese e glicólise. A expressão dos genes de proteínas e fosfoproteínas reguladas entre EC0 e EC14 está sendo realizada por RT-qPCR.