

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CULTIVO DE *Eucalyptus urograndis* EM ATMOSFERA
ENRIQUECIDA COM CO₂: MUDANÇAS NO PROTEOMA
CLOROPLASTIDIAL**

Bruna Marques dos Santos

Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CULTIVO DE *Eucalyptus urograndis* EM ATMOSFERA
ENRIQUECIDA COM CO₂: MUDANÇAS NO PROTEOMA
CLOROPLASTIDIAL**

Bruna Marques dos Santos

Orientador: Dr. Tiago Santana Balbuena

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2016

Santos, Bruna Marques dos
S237c Cultivo de *Eucalyptus urograndis* em atmosfera enriquecida com
CO₂: mudanças no proteoma cloroplastidial / Bruna Marques dos
Santos. -- Jaboticabal, 2016
x, 110 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Tiago Santana Balbuena
Banca examinadora: Gilberto Barbosa Domont, Pedro Luís da
Costa Aguiar Alves
Bibliografia

1. Cloroplasto. 2. Eucalipto. 3. Proteômica. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:582.776

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bruna Marques dos Santos – nascida em 6 de março de 1992 em São Paulo, SP, é bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Câmpus de Jaboticabal (2010-2013). Desenvolveu projeto de Iniciação Científica como bolsista CNPq-PIBIC em 2012/2013 na área de microbiologia aplicada ao controle biológico de pragas agrícolas, sob orientação do Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, defendendo o trabalho de conclusão de curso intitulado “Toxicidade e interação de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)”. Em 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Proteômica Vegetal sob orientação do Dr. Tiago Santana Balbuena, desenvolvendo a pesquisa da presente dissertação como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Aos meus pais, Maria de Fátima e Marçal Marques dos Santos. Vocês são meu maior exemplo e orgulho. Todas as conquistas em minha vida foram, são e serão dedicadas a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Santana Balbuena, pela oportunidade e confiança, por me ensinar sempre com muita paciência e disposição, pelos conselhos e incentivos.

Aos meus queridos pais, Marçal e Fátima, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu irmão, Vinícius Marques, pelo carinho e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos importantes.

Às minhas avós, Francisca e Sinely, que com muito amor sempre me deram forças para seguir meus sonhos.

Ao meu avô, Wilson Marques (*in memoriam*), que em minha infância me ensinou a admirar plantas e animais, que despertou a bióloga curiosa e apaixonada em mim.

Ao meu namorado e melhor amigo, Gustavo Avelar Molina, pela parceria, amor, compreensão e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Proteômica Vegetal, Marília, Gabriela, Fernanda e Edwin, que hoje chamo de amigos. Obrigada por toda ajuda, paciência e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos meus amigos da universidade, Rachel (Poá), Gisele (Fome), Renata (Ixpulsa), André (Mela-mina), Guilherme (Aleluia) e Leonardo (Mór-Amaçço). Obrigada pelo companheirismo, pela diversão e por nutrirem nossa amizade desde a graduação.

Ao professor Dr. Eduardo Gasparino e à assistente acadêmica Roseli, pelo grande auxílio nas análises de microscopia ótica.

A todos os meus professores, por contribuírem para minha formação pessoal e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida de acordo com o processo nº 2014/07454-0.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO	
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 O setor florestal brasileiro e o gênero <i>Eucalyptus</i>	3
3.2 Mudanças climáticas e o efeito do enriquecimento de CO ₂ nas plantas.....	5
3.3 A proteômica.....	6
3.4 A proteômica subcelular e os cloroplastos.....	8
4. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 2 – O PROTEOMA CLOROPLASTIDIAL DE <i>Eucalyptus urograndis</i>	16
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	18
2.2 Isolamento e avaliação da integridade de cloroplastos.....	18
2.3 Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais.....	20
2.4 Extração e quantificação de proteínas foliares.....	21
2.5 Separação de proteínas e digestão enzimática em gel.....	21
2.6 Análises por espectrometria de massas e identificação de proteínas.....	23
2.7 Avaliação do grau de enriquecimento do proteoma plastidial.....	24
2.8 Mapeamento de vias fotossintéticas.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1 Isolamento de cloroplastos.....	26
3.1.1 <i>Obtenção da banda cloroplastidial</i>	26
3.1.2 <i>Visualização dos cloroplastos</i>	28
3.2 Avaliação do proteoma plastidial.....	30
3.2.1 <i>Rendimento protéico</i>	30
3.2.2 <i>Enriquecimento cloroplastidial</i>	32
3.2.3 <i>Pureza do proteoma cloroplastidial</i>	33
3.3 Mapeamento de vias fotossintéticas.....	35

4. CONCLUSÃO	37
5. REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 3 - CULTIVO DE <i>Eucalyptus urograndis</i> EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO₂: MUDANÇAS NO PROTEOMA CLOROPLASTIDIAL	41
RESUMO	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	43
2.2 Isolamento de cloroplastos	43
2.3 Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais.....	44
2.4 Separação de proteínas e digestão enzimática em gel.....	45
2.5 Análises por espectrometria de massas e identificação de proteínas.....	46
2.6 Confirmação do enriquecimento do proteoma cloroplastidial.....	48
2.7 Proteínas diferencialmente reguladas.....	48
2.8 Mapeamento de proteínas fotossintéticas.....	49
2.9 Avaliação do aparato fotossintético.....	49
2.10 Microscopia eletrônica de varredura	50
2.11 Microscopia de luz	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 O proteoma cloroplastidial de <i>E. urograndis</i>	51
3.2 Proteínas envolvidas no estresse oxidativo estão entre aquelas diferencialmente reguladas frente ao estímulo de CO ₂	55
3.3 O proteoma fotossintético de <i>E. urograndis</i> é responsivo ao estímulo por CO ₂	58
3.3.1 Proteínas da membrana tilacóide	58
3.3.2 Proteínas do estroma cloroplastidial.....	61
3.4 Plantas jovens de <i>E. urograndis</i> não apresentaram alteração no sistema de captação de energia luminosa frente ao estímulo de CO ₂	65
3.5 O cultivo de plantas de <i>E. urograndis</i> sob alta concentração de CO ₂ causa alterações na anatomia foliar.....	66
4. CONCLUSÃO	69
5. REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	79
ANEXO I	80
ANEXO II	110

CULTIVO DE *Eucalyptus urograndis* EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO₂: MUDANÇAS NO PROTEOMA CLOROPLASTIDIAL

RESUMO - A emissão de dióxido de carbono (CO₂) pelas atividades humanas vem aumentando desde a revolução industrial. Previsões indicam que ocorrerá um aumento expressivo da concentração atmosférica deste gás nos próximos anos. Este fato deve resultar em alterações metabólicas nas plantas e, por consequência, impactar o setor florestal brasileiro. Os cloroplastos são as organelas-chave na fixação do CO₂ e início do particionamento do carbono nas plantas. Alterações na disponibilidade de CO₂ podem afetar o metabolismo dessas organelas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o cultivo de plantas jovens de *Eucalyptus urograndis* em ambiente enriquecido com CO₂ resulta em alterações no proteoma cloroplastidial. Para tanto, primeiramente foram avaliados diferentes métodos de isolamento de cloroplastos quanto aos seguintes parâmetros: morfologia dos cloroplastos observada em microscopia de luz (1); rendimento protéico após isolamento plastidial (2); grau de contaminação por proteínas não cloroplastidiais (3); e abundância em número de proteínas identificadas e já descritas como plastidiais (4). Após a definição da melhor metodologia para obtenção do proteoma cloroplastidial, mudas de *Eucalyptus urograndis* de aproximadamente três meses de idade foram cultivadas sob concentrações atmosféricas controladas de CO₂ (400 e 1000 ppm) durante dez semanas. A avaliação do proteoma plastidial, por buscas restritivas contra um banco de dados de sequências protéicas de *Eucalyptus grandis*, resultou na identificação de 816 proteínas em *E. urograndis*, das quais 80% já haviam sido descritas como plastidiais. O mapeamento *in silico* de vias metabólicas resultou na identificação de todas as proteínas envolvidas no ciclo de Calvin-Benson, além da detecção de um aumento discreto, porém significativo na abundância de enzimas-chave: PGK, GAPDH, FBA, FBPase, SBPase e RPI. Embora a avaliação da eficiência quântica do fotossistema II tenha indicado ausência de alteração fotossintética, as plantas tratadas com 1000 ppm de CO₂ apresentaram fechamento estomático em resposta à condição ambiental imposta, além da diminuição na área do tecido vascular foliar. Esta é a primeira caracterização do proteoma cloroplastidial do gênero *Eucalyptus*, cujos resultados indicam que a atmosfera enriquecida com CO₂ causou respostas na espécie, incluindo um aumento na abundância de proteínas envolvidas na fixação de carbono. Os resultados apresentados aqui podem auxiliar na compreensão das respostas bioquímicas estimuladas por um aumento na concentração atmosférica de CO₂ em plantas do tipo C3, além de contribuir para programas de melhoramento que visem obter plantas adaptadas às condições climáticas futuras.

Palavras-chave: assimilação de carbono, mudanças climáticas globais, proteômica subcelular.

***Eucalyptus urograndis* GROWTH UNDER CO₂-ENRICHED ATMOSPHERE: CHANGES IN THE CHLOROPLAST PROTEOME**

ABSTRACT - Carbon dioxide (CO₂) emissions from human activities have increased since the industrial revolution. Global projections indicate that there will be a significant increase in the atmospheric concentration of this gas in the coming years. This fact can result in metabolic changes in plants and, consequently, affect the Brazilian forest sector. Chloroplasts are key organelles in carbon fixation and early carbon partitioning in plants. Changes in the availability of CO₂ may affect the metabolism of these organelles. The goal of the present study was to assess whether the cultivation of seedlings of *Eucalyptus urograndis* under a CO₂ enriched environment could result in changes in the chloroplast proteome. For this purpose, different chloroplast isolation methods were evaluated to the following parameters: chloroplast morphology observed in bright-field microscopy (1); protein yield after plastid isolation (2); degree of contamination by non-plastidic proteins (3); and abundance in the number of identified proteins described as plastidic (4). After determining the best methodology for the isolation of the chloroplast proteome, *E. urograndis* seedlings about three months old were grown under CO₂ controlled atmospheric concentrations (400 and 1000 ppm) for ten weeks. Evaluation of the plastid proteome, using stringent search against a protein sequence database from *Eucalyptus grandis*, resulted in the identification of 816 proteins in *E. urograndis*, from which 80% were already described as plastidic. *In silico* metabolic pathway mapping resulted in the identification of all proteins involved in the Calvin-Benson cycle and detection of a slight but significant increase in the abundance of key enzymes: PGK, GAPDH, FBA, FBPase, SBPase, and RPI. Although the assessment of the quantum efficiency of photosystem II suggested the absence of changes in the photosynthesis rate, plants treated with 1000 ppm of CO₂ presented stomatal closure in response to the imposed environmental condition. A decreased area of the leaf vascular tissue was also detected in young leaves. This is the first characterization of chloroplast proteome of the genus *Eucalyptus*. Our results indicate that the CO₂ enriched atmosphere stimulated metabolic responses, including an increase in the abundance of proteins involved in carbon fixation. Results showed here will assist on the understanding of the biochemical responses stimulated by an increase in the atmospheric CO₂ concentration in C3-type plants, and contribute to breeding programs that aim to obtain plants adapted to future climate conditions.

Keywords: carbon assimilation, global climate change, subcellular proteomics.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP-GP	ADP-glicose pirofosforilase
APX	ascorbato peroxidase
B	ATPase subunidade b
CIB	tampão de isolamento de cloroplastos
cyt b ₆ f	complexo citocromo b ₆ f
delta	ATPase subunidade delta
EROs	espécies reativas de oxigênio
FACE	enriquecimento de CO ₂ ao ar livre
FBA	frutose-bisfosfato aldolase
FBPase	frutose-1,6-bisfosfatase
G3P	gliceraldeído-3-fosfato
gamma	ATPase subunidade gamma
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IPCC	painel intergovernamental sobre mudanças climáticas
LCH	complexo coletor de luz
NSAF	fator de abundância espectral normalizado
PGK	fosfoglicerato quinase
PRK	fosforibuloquinase
PSI	fotossistema I
PSII	fotossistema II
RPE	ribulose-5-fosfato 3-epimerase
RPI	ribose-5-fosfato isomerase
RuBisCO	ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	ribulose-1,5-bisfosfato
SBPase	sedoheptulose-1,7-bisfosfatase
Starch Syn	amido sintetase
TKLase	transcetolase
TPI	triosefosfato isomerase
TRXs	tiorredoxinas

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), a liberação de dióxido de carbono (CO₂) pelas atividades industriais e agrícolas resultou em grande aumento da concentração deste gás na atmosfera, passando de cerca de 278 ppm no ano de 1750 para cerca de 392 ppm em 2012. O planeta Terra apresenta atualmente o nível mais elevado de CO₂ dos últimos 800.000 anos e espera-se que esta concentração aumente ainda mais devido à dependência dos combustíveis fósseis e à taxa de crescimento da população mundial. Estima-se que em 2100, a concentração média de CO₂ será de 985 ppm (794 - 1142 ppm), com 90% de nível de confiança (IPCC, 2013). O aumento na concentração atmosférica deste gás, associado ao aumento da temperatura e de mudanças nos padrões de precipitação podem alterar as taxas de crescimento das plantas terrestres em um futuro próximo. Um experimento clássico conduzido por Kimball (1983) indicou que o rendimento de diversas culturas C3 provavelmente irá aumentar em 33% em resposta à duplicação da concentração de CO₂ atmosférico. Sendo assim, o conhecimento de quais os processos bioquímicos e etapas metabólicas limitam a fotossíntese durante o crescimento, à longo prazo, em condição de elevada disponibilidade de CO₂, é fundamental para determinar como as plantas responderão às mudanças climáticas, bem como beneficiar programas de melhoramento genético.

O gênero *Eucalyptus*, que compreende mais de 850 táxons (STEVENS, 2001), é a cultura madeireira mais utilizada em regiões tropicais e subtropicais devido à sua elevada taxa de crescimento, ampla adaptabilidade e versatilidade das propriedades da madeira. Do ponto de vista econômico, as espécies de eucalipto são as mais importantes da família Myrtaceae e suas florestas de alta produtividade contribuem para reduzir a pressão sobre a exploração das florestas nativas e da biodiversidade associada a elas (GRATTAPAGLIA & KIRST, 2008). As espécies deste gênero são a fonte primordial de madeira para produção de papel e celulose, sendo *Eucalyptus grandis* a mais cultivada mundialmente para fins industriais. No entanto, há

outras espécies que tem ganhado destaque como fontes de fibra, como *Eucalyptus urograndis*, um híbrido de *E. urophylla* e *E. grandis*, que é a principal planta madeireira cultivada na América do Sul (UGALDE & PÉREZ, 2001; TRABADO & WILSTERMANN, 2008). Dados limitados sobre o gênero *Eucalyptus* indicam que ele está entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao aumento de CO₂. No entanto, verificou-se que a resposta mais acentuada ocorre geralmente nas fases iniciais do estabelecimento da árvore, especialmente nos primeiros dois anos de crescimento (ATWELL et al., 2003; AINSWORTH & LONG, 2005).

A proteômica é o estudo da composição protéica total de um organismo, célula ou organela em um determinado momento (WILKINS et al., 1995). Nesse aspecto, o estudo de complexos eventos biológicos por meio da proteômica está se tornando cada vez mais atraente, especialmente em decorrência do rápido desenvolvimento das técnicas de identificação e quantificação protéica por espectrometria de massas. Tais técnicas têm permitido o estudo simultâneo de grande quantidade de proteínas expressas em uma célula, em um determinado momento e condição (ROSE et al., 2004; HAYNES & ROBERTS, 2007). Sendo assim, a proteômica representa uma ferramenta poderosa para descobrir os componentes moleculares envolvidos na resposta ao estresse abiótico (TIMPERIO et al., 2008). A proteômica subcelular, ou proteômica de organelas, tem como objetivo a caracterização de proteínas presentes em um compartimento celular, em um determinado período do ciclo de vida da célula (AGRAWAL et al., 2011). O estudo do proteoma de compartimentos subcelulares individuais fornece uma caracterização voltada à relação localização/função, facilitada pela redução da complexidade da amostra e consequente aumento da sensibilidade da análise (ANDERSEN; MANN, 2006; PANDEY et al., 2008).

O cloroplasto é o maior compartimento metabolicamente ativo das células de folhas maduras. Em relação ao volume, apenas o vacúolo é maior, mas comparativamente inativo em relação às reações bioquímicas. A fotossíntese e uma gama muito ampla de outras vias metabólicas ocorrem nos cloroplastos. Estima-se que 3.000 tipos diferentes de proteínas estão presentes nos mesmos (LEISTER, 2003). Uma vez que o cloroplasto é a organela mais sensível ao estresse abiótico (KRATSCH & WISE, 2000), seu proteoma tem

grande importância para a compreensão de como as plantas se adaptam às mudanças ambientais, tais como o aumento da concentração atmosférica de CO₂.

Embora o proteoma cloroplastidial de algumas espécies já tenha sido estudado (*Arabidopsis thaliana* (FERRO et al., 2003), trigo (KAMAL et al., 2013), milho (MAJERAN et al., 2005) e ervilha (GRIMAUD et al., 2013)), as espécies do gênero *Eucalyptus* ainda não foram submetidas a análises de proteômica subcelular. Tendo em vista seu ciclo de vida longo, espera-se que as mudanças climáticas resultem em alterações metabólicas nestas plantas e, por consequência, afetem o setor florestal brasileiro. Como os cloroplastos são as organelas-chave na fixação e início do particionamento de carbono nas espécies vegetais, torna-se fundamental determinar as alterações na abundância das proteínas cloroplastidiais induzidas por cultivo em atmosfera enriquecida com dióxido de carbono, bem como os possíveis efeitos na abertura estomática e anatomia foliar induzidos por tal condição.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar se o cultivo de plantas jovens de *E. urograndis* em atmosfera enriquecida com 1000 ppm de CO₂ resulta em alterações no proteoma cloroplastidial.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O setor florestal brasileiro e o gênero *Eucalyptus*

O setor florestal tem importância mundial como fornecedor de energia e matéria-prima para a indústria da construção civil e de transformação. O Brasil apresenta grande competitividade no mercado de produtos florestais, principalmente devido às suas características edafoclimáticas e ao desenvolvimento tecnológico na área de silvicultura (ABRAF, 2013), destacando-se como o quarto maior produtor mundial de celulose e o nono

produtor de papel (IBÁ, 2015). Para a economia brasileira e para a sociedade, o setor florestal contribui com uma parcela importante da geração de produtos, impostos, empregos e renda. Em 2014, o valor bruto da produção deste setor totalizou 60,63 bilhões de reais, indicador 1,7% superior ao de 2013. Em relação aos tributos, foram arrecadados 10,23 bilhões de reais, correspondendo a 0,8% da arrecadação nacional. A participação deste setor no PIB brasileiro tem crescido a cada ano e fechou 2014 representando 1,1% de toda a riqueza gerada no País e 5,5% do PIB industrial (IBÁ, 2015). Em termos ambientais, esse setor também procura contribuir com o equilíbrio de ecossistemas naturais, reduzindo o nível de desmatamento ilegal e o impacto sobre as florestas nativas através da manutenção e incentivo do uso de florestas plantadas (BRACELPA, 2014). Embora muito desenvolvido, o setor florestal brasileiro ainda tem grande potencial a ser explorado, uma vez que o país apresenta condições naturais adequadas como a elevada extensão de terras, mão de obra abundante, clima e solos favoráveis e tecnologia silvicultural avançada. Portanto, investimentos na atividade florestal podem contribuir ainda mais para o desenvolvimento socioeconômico do país (SOARES, 2006).

O gênero *Eucalyptus*, nativo da Oceania, pertence à família Myrtaceae e apresenta 859 táxons descritos, incluindo espécies, subespécies e alguns híbridos (STEVENS, 2001). Devido à sua vasta utilização pela indústria florestal e grande adaptabilidade a diferentes condições climáticas, existem mais de 20 milhões de hectares de plantações de eucalipto no mundo (IGLESIAS & WILTERMANN, 2009), fornecendo recursos renováveis para a produção de celulose, papel, biomateriais e bioenergia (BAUHUS et al., 2010). No Brasil, o primeiro registro da presença do eucalipto data de 1825, como planta ornamental, mas o aproveitamento econômico teve início em 1903, com a produção de dormentes ferroviários e lenha para movimentar as locomotivas da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (HASSE, 2006). A partir da década de 1950, a importância econômica do eucalipto ganhou impulso com o início de sua utilização como matéria-prima para a produção de celulose e papel (ABECCEL, 2004). Em 2014, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* totalizou 5,56 milhões de hectares, representando 71,9% da área ocupada por árvores plantadas no Brasil. O principal fator que alavancou esse

crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda dos projetos industriais do segmento de papel e celulose. Em âmbito estadual, Minas Gerais, São Paulo, e Mato Grosso do Sul são os maiores produtores do gênero *Eucalyptus* (IBÁ, 2015).

Mundialmente, as espécies de eucalipto são a fonte primordial de madeira para produção celulósica, sendo *Eucalyptus grandis* a espécie mais cultivada para fins industriais (UGALDE & PÉREZ, 2001). No entanto, existem outras espécies que têm se destacado no setor, como *Eucalyptus urograndis*, um híbrido preferencialmente utilizado na América do Sul (TRABADO & WILSTERMANN, 2008). Este híbrido é amplamente cultivado em diversas regiões do Brasil, uma vez que combina o rápido crescimento e ótima propagação vegetativa de *Eucalyptus grandis* com a maior tolerância às doenças fúngicas, excelente adaptabilidade e maior densidade da madeira de *Eucalyptus urophylla* (CAMPINHOS, 1989; VIGNERON et al., 2000). A primeira plantação clonal do mesmo ocorreu em 1979 no estado do Espírito Santo, mas foi na década de 1990 que essa espécie passou a ser vastamente utilizada e impulsionou o ritmo do crescimento florestal no Brasil (LOPES, 2005).

3.2 Mudanças climáticas e o efeito do enriquecimento de CO₂ nas plantas

Criado no final de década de 1980, o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, na sigla em inglês) é um corpo internacional de especialistas criado para a avaliação da pesquisa sobre mudanças climáticas globais. Portanto, seu principal objetivo é promover uma visão ampla sobre o estado-da-arte da pesquisa realizada na área, consolidando tendências e prevendo seus impactos ambientais e socioeconômicos (OJIMA, 2011). De acordo com o último relatório do IPCC, desde o início da era industrial, a liberação de CO₂ pelas atividades industriais e agrícolas resultou em grande aumento da concentração deste gás na atmosfera, passando de cerca de 278 ppm no ano de 1750 para cerca de 392 ppm em 2012. O planeta Terra apresenta atualmente o nível mais elevado de CO₂ dos últimos 800.000 anos e espera-se que continue a aumentar devido à dependência dos combustíveis fósseis para produção de energia e à taxa de crescimento da população

mundial. Estima-se que em 2100, a concentração de CO₂ média será de 985 ppm (794 - 1142 ppm), com 90% de nível de confiança (IPCC, 2013). Apesar do número crescente de políticas para mitigação de mudanças climáticas, as emissões anuais de gases que causam efeito estufa cresceram, em média, 1 GtCO₂-eq por ano, de 2000 a 2010, comparado a 0,4 GtCO₂-eq ao ano, de 1970 a 2000 (IPCC, 2014).

A maior parte dos organismos vegetais pertence ao grupo de plantas com fotossíntese do tipo C3. Este grupo recebe esta denominação porque o primeiro produto da carboxilação é um ácido com três carbonos, o ácido 3-fosfoglicérico (PGA) (BENSON, 2002; BASSHAM, 2003). A fotossíntese de plantas C3 é conhecida por funcionar a níveis de CO₂ abaixo do ótimo e pode apresentar um aumento dramático na assimilação de carbono dependendo da disponibilidade deste gás na atmosfera. Respostas positivas de crescimento em atmosfera com elevada concentração de CO₂ em espécies de plantas lenhosas têm sido amplamente divulgadas quando outros recursos foram adequadamente fornecidos (WITTIG et al., 2005; LIBERLOO et al., 2006; CROUS et al., 2008; KOSOBRYUKHOV, 2008; ATWELL et al., 2009). Dados limitados sobre o gênero *Eucalyptus* indicam que ele está entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao aumento de CO₂. No entanto, verificou-se que a resposta mais acentuada ocorre geralmente nas fases iniciais do estabelecimento da árvore, especialmente nos primeiros dois anos de crescimento (ATWELL et al., 2003; AINSWORTH & LONG, 2005).

3.3 A proteômica

Segundo Wilkins et al. (1995), proteoma é o complemento expresso de um genoma, ou seja, são todas as proteínas codificadas por um genoma. É um sistema complexo e dinâmico, que pode ser definido em termos de sequência, estrutura, abundância, localização, modificação, interação e função bioquímica de seus componentes (TWYMAN, 2004). Embora a expressão gênica em nível transcricional possa trazer informações importantes, a abundância de mRNA nem sempre é correlacionada com a abundância das proteínas expressas. Isso porque a quantidade de proteínas expressas depende de vários fatores, como

transcrição, tradução e modificações pós-traducionais. Sendo assim, a proteômica é uma ferramenta chave para o estudo de sistemas biológicos altamente complexos e dinâmicos, pois permite a análise de um grande número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, fornecendo informações sobre o estado biológico ou mudanças sistêmicas (CHEN & HARMON, 2006).

Um dos principais objetivos da proteômica é caracterizar mudanças na abundância de proteínas em sistemas biológicos, providenciando um “snapshot” do estado da expressão das proteínas de uma célula em resposta a perturbações biológicas como a progressão de doenças e tratamentos com drogas ou outros agentes externos. Portanto, são necessários ensaios sensíveis e acurados para identificar proteínas em misturas complexas e quantificar suas abundâncias nesses sistemas dinâmicos. Em muitos estudos, a eletroforese bidimensional foi utilizada para caracterizar proteomas. Contudo, esta estratégia tem grandes limitações em sensibilidade, reprodutibilidade e pode ser ineficiente para analisar proteínas insolúveis e de massa molecular muito alta ou muito baixa. Sendo assim, a proteômica do tipo “shotgun” tornou-se uma estratégia alternativa muito utilizada para estudar sistemas biológicos, envolvendo a digestão de proteínas de misturas complexas, seguida de separação cromatográfica e análise por espectrometria de massas de peptídeos (OLD et al., 2005).

Atualmente, existe uma grande variedade de métodos de quantificação de proteínas a partir da espectrometria de massas envolvendo prévia marcação isotópica de proteínas ou peptídeos. As limitações dos métodos baseados em tais marcações são bem conhecidas, como a necessidade de grandes quantidades iniciais de material biológico, aumento da complexidade dos protocolos experimentais e alto custo dos reagentes. Sendo assim, os métodos de quantificação intitulados livres de marcação têm se popularizado por serem alternativas eficientes e mais baratas. Dentre esses, destaca-se a quantificação por contagem espectral, que considera o número de espectros de fragmentação (MS^2) adquiridos e correlacionados para cada proteína como medida indireta da abundância da mesma (LIU et al., 2004; OLD et al., 2005).

3.4 A proteômica subcelular e os cloroplastos

Apesar dos avanços nas técnicas de espectrometria de massas e bioinformática, a abordagem proteômica pode falhar na descoberta de produtos gênicos pois depende da abundância dos mesmos. As proteínas subcelulares são de extremo interesse para a proteômica, uma vez que são unidades funcionais compartimento-específicas. Contudo, devido à sua menor abundância em relação ao proteoma celular total, a identificação e quantificação desses sub-proteomas pode ser considerado um desafio analítico (DREGER, 2003). Os principais obstáculos da proteômica subcelular residem principalmente nos métodos de purificação ou isolamento de organelas e na obtenção de quantidades de proteínas suficientes para a análise (MILLAR, 2004). Contaminantes protéicos ou restos celulares indesejados podem levar a atribuições errôneas de proteínas para a organela estudada, bem como erros de quantificação (AGRAWAL et al., 2011). Exemplos de estudos de proteômica subcelular incluem a análise das proteínas do complexo de Golgi (BELL et al., 2001), do núcleo (DREGER et al., 2001), do fagossomo (GARIN et al., 2001), da mitocôndria (SALVATO et al., 2014) e dos cloroplastos (KAMAL et al., 2013). Cada um destes estudos levou à identificação de associações entre proteínas e organelas que nunca foram descritas anteriormente.

O cloroplasto é o maior compartimento metabolicamente ativo das células de folhas maduras. Em relação ao volume, apenas o vacúolo é maior; porém, comparativamente inativo em relação às reações bioquímicas. A fotossíntese e uma gama muito ampla de outras vias metabólicas ocorrem nos cloroplastos. Estima-se que 3.000 tipos diferentes de proteínas estão presentes nos mesmos (LEISTER, 2003). A maior parte destas proteínas são codificadas no núcleo, sintetizadas no citoplasma e pós-traducionalmente transportadas para a organela. Por exemplo, o genoma cloroplastidial de *E. grandis* apresenta apenas 128 genes (PAIVA et al., 2011), sendo necessária a importação de outros produtos gênicos para o correto funcionamento da organela.

Durante mais de duas décadas, a proteômica tem sido utilizada com sucesso para caracterizar sistematicamente o conjunto de proteínas de cloroplastos, especialmente na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Os dados gerados a partir desses projetos de proteoma são de acesso público via bancos

de dados como o “The Plant Proteome Database” (PPDB), o “*Arabidopsis thaliana* chloroplast protein database” (AT_Chloro) e o “Plastid protein database” (plprot). Estudos do proteoma cloroplastidial forneceram novas informações sobre a biogênese/diferenciação desta organela, resposta ao estresse, além da compreensão da maquinaria fotossintética e vias bioquímicas de síntese de ácidos graxos e metabólitos secundários em espécies consideradas como fontes potenciais de matéria-prima para a produção de bioenergia (MAJERAN et al., 2005; COVSHOFF et al., 2009; MAJERAN et al., 2009; PINHEIRO et al., 2013). Embora o proteoma cloroplastidial já tenha sido estudado em algumas espécies (*Arabidopsis thaliana* (FERRO et al., 2003), trigo (KAMAL et al., 2013), milho (MAJERAN et al., 2005) e ervilha (GRIMAUD et al., 2013)), as espécies do gênero *Eucalyptus* ainda não foram submetidas a análises de proteômica subcelular.

4. REFERÊNCIAS

ABECEL. Cultura do eucalipto pela indústria brasileira exportadora de celulose. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Exportadores de Celulose**, 16 p. 2004.

ABRAF. **Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Florestas Plantadas 2013 – Ano Base 2012**. Brasília, DF, p. 146, 2013. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf>. Acesso em: 18 de Março de 2014.

AGRAWAL, G. K.; BOURGUIGNON, J.; ROLLAND, N.; EPHRITIKHINE, G.; FERRO, M.; JAQUINOD, M.; ALEXIOU, K. G.; CHARDOT, T.; CHAKRABORTY, N.; JOLIVET, P.; DOONAN, J. H.; RAKWAL, R. Plant Organelle Proteomics: Collaborating for optimal cell function. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 30, p. 772 – 853, 2011.

AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. **The New Phytologist**, v. 165, p. 351 – 371, 2005.

ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. **EMBO reports**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 874 – 879, 2006.

ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; BALL, M. C. Does soil nitrogen influence growth, water transport and survival of snow gum (*Eucalyptus pauciflora* Sieber ex Sprengel.) under CO₂ enrichment? **Plant Cell Environment**, v. 32, p. 553 – 566, 2009.

ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; WHITEHEAD, D. Sapwood development in *Pinus radiata* trees grown for three years at ambient and elevated carbon dioxide partial pressures. **Tree Physiology**, v. 23, p. 13 – 21, 2003.

BASSHAM, J. A. Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. **Photosynthesis Research**, v. 76, p. 35 – 52, 2003.

BAUHUS, J.; VAN DER MEER, P. J.; KANNINEN, M. **Ecosystem Goods and Services from Plantation Forests**. Earthscan, London, UK, p. 254, 2010.

BELL, A. W.; WARD, W. P.; BLACKSTOCK, H. N.; FREEMAN, J. S.; CHOUDHARY, A. P.; LEWIS, D.; CHOTAI, A.; FAZEL, J. N.; GUSHUE, J.

Paiement. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 5152 – 5165, 2001.

BENSON, A. A. Following the path of carbon in photosynthesis: A personal story. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 29 – 49, 2002.

BRACELPA – **Associação Brasileira de Celulose e Papel**. Dados do Setor – Março de 2014. São Paulo – SP, 29 p., 2014. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>. Acesso em 12 de Maio de 2015.

CAMPINHOS E.; IKEMORI Y. K. Selection and management of the basic population *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* established at Aracruz for the long term breeding programme. **Proceedings of the IUFRO Conference: Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry**, p. 75 - 169, 1989.

CHEN, S. X.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504 - 5516, 2006.

COVSHOFF, S.; MAJERAN, W.; LIU, P.; KOLKMAN, J. M.; VAN WIJK, K. J.; BRUTNELL, T. P. Dereglulation of maize C4 photosynthetic development in a mesophyll cell- defective mutant. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1469 –1481, 2008.

CROUS, K. Y.; WALTERS, M. B.; ELLSWORTH, D. S. Elevated CO₂ concentration affects leaf photosynthesis–nitrogen relationships in *Pinus taeda* over nine years in FACE. **Tree Physiology**, v. 28, p. 607 – 614, 2008.

DREGER, M. L.; BENGTSSON, T.; SCHONEBERG, H.; HUCHO, F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 98, p. 11943 – 11948, 2001.

DREGER, M. Subcellular Proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, New York. v. 22, p. 27 – 56, 2003.

FERRO, M.; SALVI, D.; BRUGIÈRE, S.; MIRAS, S.; KOWALSKI, S.; LOUWAGIE, M. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 2, p. 325 –245, 2003.

GARIN, J.; DIEZ, R.; KIEFFER, S.; DERMINE, J. F.; DUCLOS, S.; GAGNON, E.; SADOUL, R.; RONDEAU, C.; DESJARDINS, M.. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. **The Journal of Cell Biology**, v. 152, p. 165 – 180, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, n. 4, p. 911 - 929, 2008.

GRIMAUD, F.; RENAUT, J.; DUMONT, E.; SERGEANT, K.; LUCAU-DANILA, A.; BLERVACQ, A. S.; GOULAS, E. Exploring chloroplastic changes related to chilling and freezing tolerance during cold acclimation of pea (*Pisum sativum* L.). **Journal of Proteomics**, v. 80, p.145 – 59, 2013.

HASSE, G. **Eucalipto: histórias de um imigrante vegetal**. Porto Alegre, p.127, 2006.

HAYNES, P. A.; ROBERTS, T. H. Subcellular shotgun proteomics in plants: Looking beyond the usual suspects. **Proteomics**, Wheinheim, v. 7, p. 2963 – 2975, 2007.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas referentes ao ano de 2015**. Disponível em <http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em 1 de Maio de 2016.

IGLESIAS, I.; WILTERMANN, D. Eucalyptologics Information. Resources on Eucalypt Cultivation Worldwide. **GIT Forestry Consulting**, 2009. Disponível em: <http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map.htm>. Acesso em 20 de Outubro de 2015.

IPCC - Climate Change: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth **Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. IPCC, Geneva, Suíça, p. 151, 2014.

IPCC - Climate change: the physical science basis. **Cambridge University Press**, p. 2231, 2013.

KAMAL, A. H. M.; CHO, K.; CHOI, J. S.; BAE, K. H.; KOMATSU, S.; UOZUMI, N.; WOO, S. H. The wheat chloroplastic proteome. **Journal of Proteomics**, v. 93, p. 326 – 342, 2013.

KIMBALL, B. A. Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 430 prior observations. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 779 – 788, 1983.

KOSOBRYUKHOV, A. A. Activity of the photosynthetic apparatus at periodic elevation of CO₂ concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, p. 8 – 16, 2008.

KRATSCH, H. A.; WISE, R. R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant Cell Environ**, v. 23, p.337 – 350, 2000.

LEISTER, D. Chloroplast research in the genomic age. **Trends in Genetics**, v. 19, p. 47 - 56, 2003.

LIBERLOO, M.; CALFAPIETRA, C.; LUKAC, M.; GODBOLD, D.; LUO, Z. B. Woody biomass production during the second rotation of a bio-energy *Populus* plantation increases in a future high CO₂ world. **Global Change Biology**, v. 12, p. 1094 – 1106, 2006.

LIU, H.; LIU, H.; SADYGOV, R. G.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193 – 201, 2004.

LOPES, E. D. **Qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora* produzidas em blocos prensados e em dois modelos de tubetes e seu desempenho no campo.** 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2005.

MAJERAN, W.; CAI, Y.; SUN, Q.; VAN WIJK, K. J. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. **Plant Cell**, v. 17, p. 3111 - 140, 2005.

MAJERAN, W.; VAN WIJK, K. J. Cell-type specific differentiation of chloroplasts in C4 plants. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 100 – 109, 2009.

MILLAR, A. H. Location, location, location: surveying the intracellular real state through proteomics in plants. **Functional Plant Biology**, Melbourn, v. 31, p. 563 – 571, 2004.

OJIMA, R. As dimensões demográficas das mudanças climáticas: cenários de mudança do clima e as tendências do crescimento populacional. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 28, n. 2, p. 389 – 403, 2011.

OLD, W. M.; MEYER-AREND, K.; AVELINE-WOLF, L.; PIERCE, K. G.; MENDONZA, A.; SEVINSKY, J. R.; RESING, K. A.; AHN, N. G. Comparison of

Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1487 -1502, 2005.

PAIVA, J. A.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS M. D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis genes from deep-coverage BAC libraries., **BMC Genomics**, v.12, p. 137, 2011.

PANDEY, A.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, N. Proteomics Approach to Identify Dehydration Responsive Nuclear Proteins from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 88 – 107, 2008.

PINHEIRO, C. B.; SHAH, M.; SOARES, E. L.; NOGUEIRA, F. C. S.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA, M.; ARAÚJO, G. D. T.; SOARES, A. A.; DOMONT, G. B.; CAMPOS, F. A. P. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n.11, p. 5137 – 5145, 2013.

ROSE, J. K. C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J. J.; JAHN, M. M.; SARAVANAN, R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, v. 39, p. 715 – 733, 2004.

SALVATO, F.; HAVELUND, J. F.; CHEN, M.; RAO, R. S. P.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; JENSEN, O. N.; MOLLER, I. M. The Potato Tuber Mitochondrial Proteome. **Plant Physiology**, v. 164, n. 2, p. 637 – 653, 2014.

SOARES, N. S. **Potencial de Implantação de um Contrato Futuro da Madeira de Reflorestamento**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Versão 12 de Julho de 2012. Disponível em <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 20 de Outubro de 2015.

TIMPERIO, A. M.; EGIDI, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 391 - 411, 2008.

TRABADO, G. I.; WILSTERMANN, D. *Eucalyptus Universalis*. **Global Cultivated Eucalypt Forest Map**, 2008. disponível em <<http://www.git-forestry.com/>>. Acesso em Maio de 2011.

TWYMAN, R. M. **Principles of Proteomics**. Cambridge: BIOS Scientific Publishers, 241p. 2004.

UGALDE, L.; PÉREZ, O. Mean annual volume increment of selected industrial forest plantation species. Rome: FAO, 2001.

VIGNERON, P.; BOUVET, J. Eucalypt hybrid breeding in Congo. Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. **Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium**, Abril, p. 14 – 26, 2000.

VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v. 153, p. 376 - 387, 1981.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19 - 50, 1995.

WITTIG, V. E.; BERNACCHI, C. J.; ZHU, X.; CALFAPIETRA, C.; CEULEMANS, R.; DEANGELIS, P.; GIELEN, B.; MIGLIETTA, F.; MORGAN, P. B.; LONG, S. P. Gross primary production is stimulated for three *Populus* species grown under free-air CO₂ enrichment from planting through canopy closure. **Global Change Biology**, v. 11, p. 644–656, 2005.

CAPÍTULO 2 – O PROTEOMA CLOROPLASTIDIAL DE *Eucalyptus urograndis*

RESUMO - A proteômica subcelular é uma abordagem importante para a identificação de proteínas anteriormente desconhecidas de compartimentos celulares específicos. Contudo, essa estratégia é dependente da seleção de um método eficiente de extração e isolamento da organela-alvo, uma vez que a separação incompleta do sub-proteoma de interesse pode resultar em identificações compartimento-falso-positivas e impedir a identificação de proteínas pouco abundantes. Atualmente, não existem estudos sobre o proteoma dos cloroplastos de *Eucalyptus urograndis* que possam ser utilizados como referência; portanto, o objetivo do presente capítulo foi obter o proteoma cloroplastidial deste híbrido com alto grau de enriquecimento. Para tanto, foram testadas diferentes adaptações de um protocolo convencional para isolamento de cloroplastos, além de um kit especificamente desenvolvido para a obtenção destas organelas puras e intactas. Os resultados obtidos levaram à conclusão de que a homogeneização de tecidos foliares com o instrumento Turrax seguido do uso do kit comercial “CP-ISO” (Sigma-Aldrich) apresentou melhores resultados quanto aos seguintes parâmetros: padrão anatômico dos cloroplastos observado em microscopia de luz (1); rendimento protéico após isolamento plastidial (2); grau de contaminação por proteínas não cloroplastidiais (3); e abundância em proteínas já descritas como plastidiais (4).

Palavras-chave: cloroplasto, eucalipto, proteômica subcelular.

1. INTRODUÇÃO

A redução da complexidade do proteoma como consequência do fracionamento subcelular é a principal vantagem da proteômica de organelas, pois permite uma cobertura mais profunda do proteoma e a identificação de proteínas de menor abundância (ANDERSEN & MANN, 2006; PANDEY et al., 2008). Sendo assim, a caracterização do proteoma de cloroplastos pode ajudar a compreender vias metabólicas importantes, bem como revelar novas funções metabólicas e regulatórias que residem no interior desse plastídio. Outro aspecto importante é a descoberta de proteínas hipotéticas, putativas ou desconhecidas, já que estas são as identificações mais abundantes em proteômica subcelular. Além disso, esta abordagem também pode auxiliar na definição de novas classificações para proteínas e melhorar os algoritmos de predição de localização subcelular existentes (BAGINSKY & GRUISSEM, 2004). Contrariamente, a principal dificuldade desta técnica reside na obtenção de extratos com o mínimo grau de pureza, uma vez que os contaminantes protéicos de outras organelas e do citoplasma normalmente não são completamente eliminados. Estes contaminantes indesejados podem levar a atribuições errôneas de proteínas para a organela estudada, bem como erros de quantificação. Portanto, experimentos complementares são indicados para confirmar a localização de uma proteína em determinada organela (BAGINSKY & GRUISSEM, 2004; AGRAWAL et al., 2011).

Diversos protocolos para isolamento de cloroplastos de plantas superiores foram desenvolvidos (MASON et al., 1991; KLEFFMANN et al., 2004; BAGINSKY et al., 2005; MENG et al., 2011; VIEIRA et al., 2014) e todos empregam gradientes de densidade de Percoll para a purificação destas organelas previamente às análises em espectrometria de massas. Devido à inexistência de estudos do proteoma cloroplastidial em espécies de *Eucalyptus*, no presente capítulo buscou-se identificar a metodologia mais adequada para o isolamento de cloroplastos do híbrido *E. urograndis*, segundo os parâmetros: estrutura anatômica, rendimento protéico, abundância de proteínas já descritas como plastidiais e grau de contaminação com identificações não plastidiais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Mudas clonais do híbrido *Eucalyptus urograndis* (I144), com aproximadamente 120 dias, foram adquiridas da empresa “Agriflora – Mudanças Florestais” (Araraquara, SP), plantadas em vasos de 30 litros contendo substrato florestal e mantidas em casa de vegetação na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP campus Jaboticabal, no Departamento de Tecnologia, sob regime hídrico controlado e temperatura máxima de 30 °C. Foram coletadas sete folhas jovens, totalmente expandidas, presentes no terço superior da planta e imediatamente submetidas ao processo de isolamento de cloroplastos. Foram utilizadas três repetições biológicas, sendo que cada repetição foi constituída por uma planta.

2.2 Isolamento e avaliação da integridade de cloroplastos

Para a obtenção dos cloroplastos intactos, foram utilizadas adaptações da metodologia sugerida por Shiraya et al. (2014), conforme descrito na Tabela 1. Primeiramente, folhas jovens foram coletadas e mantidas em gelo. Em seguida, as folhas foram lavadas com água destilada e os tecidos foliares foram cortados em pedaços pequenos, removendo-se a nervura central. Este material foi então transferido para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de tampão de isolamento de plastídio (1 M HEPES-KOH, pH 7,5; 1 M EDTA; 1 M MgCl₂; 1 M MnCl₂; 1 M L-ascorbato de sódio e 1 M DTT) e processado, visando o rompimento das células, segundo as metodologias descritas na Tabela 1. Finalmente, as amostras vegetais foram filtradas em membrana de papel e o filtrado foi coletado em novo recipiente pré-resfriado.

Tabela 1. Adaptações do método proposto por Shiraya et al. (2014) para o isolamento de cloroplastos de *Eucalyptus urograndis*.

Material vegetal ^a	Lise celular ^b	Gradiente de densidade ^c
5	Maceração com pistilo	80-40% (1:3)
5	Maceração com pistilo	100-60% (1:1)
5	Mixer	100-60% (1:1)
5	Mixer	100-60% (1:4)
5	Mixer	80-40% (1:1)
5	Mixer	80-40% (1:4)
3	Turrax Omni GLH	100-60% (1:1)
3	Turrax Omni GLH	100-60% (1:4)
3	Turrax Omni GLH	80-40% (1:1)
3	Turrax Omni GLH	80-40% (1:4)

a: em gramas de folhas jovens presentes até o quarto internó a partir do meristema apical;

b: tipo de ruptura de células e tecidos foliares;

c: gradiente de densidade de Percoll em duas fases (v/v).

O material filtrado foi centrifugado a 200 xg por 4 minutos a 4 °C para remover detritos celulares e o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 2000 xg por 4 minutos a 4 °C visando a precipitação dos cloroplastos. O pellet de cloroplastos foi então ressuspensionado em 1 mL de tampão de isolamento de plastídio e a suspensão foi depositada lentamente sobre um gradiente de densidade de Percoll (P7828, Sigma-Aldrich). Em seguida, o sistema foi submetido à centrifugação a 4000 xg por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, os cloroplastos intactos localizados na interface do gradiente de Percoll foram removidos lentamente e transferidos para um novo tubo, onde foram lavados por adição de 5 vezes o volume de tampão de isolamento de plastídio e centrifugação a 4000 x g por 10 minutos a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspensionado com tampão de diluição de plastídio (PVP; 1 M HEPES-KOH, pH 7,5; 1 M EDTA e 1 M MgCl₂).

Uma estratégia alternativa foi incorporada ao experimento, seguindo as instruções do fabricante do kit de isolamento de cloroplastos CP-ISO (Sigma-Aldrich), com algumas modificações. Para tanto, três gramas de folhas jovens foram coletadas, lavadas e mantidas em gelo. Com o auxílio de uma tesoura, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços e tiveram sua nervura central

removida. Porém, o material vegetal foi depositado em tubo de 50 mL contendo 18 mL de “chloroplast isolation buffer” (CIB), aditivado com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente, o material vegetal foi processado pelo homogeneizador Turrax Omni GLH, conforme realizado para as estratégias anteriores. O material processado foi filtrado em membrana de Nylon (Mesh 100) fornecida pelo kit e em seguida centrifugado a 200 xg por 3 minutos a 4 °C para remover células intactas e pedaços de parede celular. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e centrifugado a 1000 xg por 7 minutos a 4 °C para precipitar os cloroplastos. Para o isolamento das organelas, o material foi ressuspensionado em 1 mL de CIB contendo BSA 0,1% para então ser purificado em um gradiente de Percoll 80-40% na proporção 1:2 (v/v). Em seguida, o sistema foi submetido à centrifugação em 3200 xg por 15 minutos a 4 °C e os cloroplastos intactos coletados e transferidos para um novo tubo. Foram realizadas lavagens conforme descrito para as estratégias anteriores até ressuspensão em 500 µL de CIB.

Para todas as estratégias avaliadas, uma alíquota de 20 µL foi coletada para visualização da integridade dos cloroplastos por microscopia de luz, e o restante foi armazenado em freezer -30 °C.

2.3 Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais

A extração das proteínas dos cloroplastos foi realizada também seguindo protocolo adaptado de Shiraya et al. (2014). Primeiramente, foi adicionado um volume de tampão de extração de proteínas (2 M tiourea; CHAPS; 1 M Tris-HCl, pH 8; glicerol 50%; triton X-100; 1 M DTT e 8 M ureia) igual a 5 vezes o volume em que os cloroplastos foram ressuspensionados. Posteriormente, foram realizados 15 ciclos de sonicação de 1 minuto, com intervalos de 30 segundos no gelo, seguido de centrifugação a 3200 xg por 15 minutos a 4 °C para remoção de material membranoso. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e, a esse tubo, foi adicionado um volume de acetona gelada igual a 10 vezes o volume do sobrenadante transferido. A precipitação das proteínas ocorreu por 12 horas a -30 °C, seguido de centrifugação a 3200 xg por 15 minutos a 4 °C, descarte do

sobrenadante e resolubilização do pellet protéico em tampão de amostra contendo 125 mM Tris pH 6,8; 20% glicerol; 1% SDS e 1% DTT.

A concentração de proteínas solúveis foi estimada através do kit “Bio-Rad Protein Assay”, seguindo a metodologia do Microiter Plate Protocols, baseado no método de Bradford (1976), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Extração e quantificação de proteínas foliares

Com o objetivo de comparar o grau de enriquecimento do proteoma cloroplastidial em relação a uma amostra de proteoma total foliar, foram coletadas três gramas de folhas jovens de *Eucalyptus urograndis* e as folhas foram lavadas, mantidas em gelo e com o auxílio de uma tesoura foram cortadas em pequenos pedaços tendo sua nervura central removida. O material vegetal foi depositado em tubo contendo 18 mL de tampão de extração de proteínas gelado e, em seguida, foi processado utilizando-se o homogeneizador Turrax Omni GLH. O material processado foi filtrado em membrana de Nylon (Mesh 100 – Sigma-Aldrich) e em seguida centrifugado a 3200 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado 5 vezes o seu volume de acetona gelada. A precipitação das proteínas ocorreu por 12 horas a -30 °C, seguido de centrifugação a 3200 xg por 15 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet protéico obtido em tampão de amostra citado anteriormente. A concentração de proteínas solúveis foi estimada como descrito na seção anterior.

2.5 Separação de proteínas e digestão enzimática em gel

A separação dos extratos protéicos foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Para tanto, aliquotas contendo 5 µg de proteínas foram diluídas (1:1, v/v) com tampão de amostra Laemmli 2X (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2,1% SDS; 26,3% (v/v) glicerol, 0,01% azul de bromofenol), aquecidas por 5 minutos a 99°C e aplicadas no topo do gel. O

sistema eletroforético foi composto por um gel de empilhamento a 5% (acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8%) e 0,5% SDS, e um gel de separação, constituído de 12,5% (acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8%) e 1% SDS. O gel foi preparado em placa de vidro (80 x 100 mm) com espaçadores (1,5 mm) e em seguida transferido para uma cuba vertical Bio-Rad, modelo Mini-protean® Tetra System, a qual foi preenchida com tampão de corrida (0,192 M glicina, 25 mM Tris e 0,1% SDS) e submetida a uma corrente constante de 20 mA por gel, em temperatura ambiente. Após a eletroforese, o gel foi imerso em um recipiente plástico contendo 30 mL de solução de coloração (0,08% *Coomassie Colodial*, 20% etanol, 1,6% ácido fosfórico, 8% sulfato de amônio, água (q.s.p. 1 L)) por 16 horas. Em seguida, foi realizada lavagem com solução descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e água (q.s.p. 100 mL)), por 12 horas. O gel foi mantido em solução de ácido acético 1% e sua imagem foi digitalizada em aparelho scanner Image Scanner III (GE Healthcare) em alta resolução e no modo de transparência.

Previamente às análises por espectrometria de massas, as misturas protéicas separadas nos géis de poliacrilamida foram digeridas em gel segundo o protocolo estabelecido por Shevchenko et al. (2007). Para tanto, os géis foram inicialmente segmentados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para microtubos. Posteriormente, o corante *Coomassie* foi removido por sucessivas lavagens em solução de 100 mM bicarbonato de amônio: acetonitrila (1:1, v/v) seguido de redução das proteínas em solução de 10 mM DTT em 100 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos a 56 °C. Após a etapa de redução, os resíduos de cisteína das proteínas no gel foram carbamidometilados por incubação em solução de 50 mM iodoacetamida em 100 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente.

Antes do início da digestão triptica, os fragmentos de gel foram saturados com solução de tripsina (5 ng de tripsina/ μ L de solução tampão contendo 10 mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila), incubados por 1 hora a 4 °C e, posteriormente, incubados a 37 °C por 16 horas para promover a digestão. Após a digestão, para extrair os peptídeos da matriz de poliacrilamida, foi utilizada uma solução de extração contendo 5% ácido fórmico: acetonitrila (1:2, v/v) e incubados em agitação por 30 minutos. O

sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um novo microtubo. Este procedimento de extração foi repetido e, finalmente, acetonitrila pura foi adicionada aos fragmentos do gel e o sobrenadante também foi coletado. Os peptídeos extraídos foram secos com o auxílio de uma centrífuga acoplada a um sistema de vácuo (Centrivap) e o extrato seco foi armazenado a -30 °C.

2.6 Análises por espectrometria de massas e identificação de proteínas

Os peptídeos obtidos na etapa anterior foram ressuspensos em solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e separados em um sistema cromatográfico do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fischer Scientific) utilizando-se uma nano-coluna de fase reversa (15 cm, 3 µm, 100 Å) e gradiente de polaridade decrescente (solvente A contendo 0,1% de ácido fórmico em H₂O e solvente B contendo 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), iniciando com 100% de solvente A, atingindo 35% de solvente B em 50 minutos, seguidos de 10 minutos de lavagem com 80% de solvente B, sob fluxo de 400 nL/min. A ionização e injeção dos peptídeos no espectrômetro de massas (Q-Exactive, Thermo) ocorreu por electrospray (ESI), utilizando-se 2,5 kV de potencial aplicado diretamente na agulha de injeção. O espectrômetro de massas foi operado no modo “data-dependent”, onde os dez íons peptídicos mais abundantes de cada “survey scan” foram selecionados para fragmentação e aquisição de espectros de fragmentação. Os espectros do tipo MS¹ e MS² foram adquiridos, respectivamente, em resolução igual a 70.000 e 35.000 FWHM (“full width at half maximum”). O tipo de fragmentação utilizado foi o “high collision energy” (HCD), com energia de colisão do tipo “stepped” a 33,2, 35 e 36,8 eV. Os íons peptídicos selecionados para fragmentação foram excluídos de um novo evento de fragmentação por 60 segundos.

A identificação das proteínas foi realizada por buscas restritivas baseadas nas sequências de proteínas da espécie *Eucalyptus grandis*, depositadas no portal do projeto Phytosome v.9 (GOODSTEIN et al., 2012; MYBURG et al., 2014). As correlações entre os espectros do tipo MS², que foram obtidos do espectrômetro de massas, e os espectros virtuais, oriundos da digestão virtual e processamento do banco de proteínas, foram realizadas

pela ferramenta de busca Sequest, contida no ambiente virtual Proteome Discoverer 1.4, utilizando os seguintes parâmetros de busca: 10 ppm de tolerância para os íons precursores e 0,02 Da para os íons fragmentos, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação da cisteína como variação estática. Os resultados obtidos (“peptide spectrum matches”, PSMs) foram filtrados, considerando apenas as identificações que possuísem coeficiente de correlação cruzada (XCorr) igual a 1,5; 2,0; 2,5 para os íons de carga +1, +2 e +3, respectivamente e taxa de falsos positivos máxima igual a 1%. A descrição das proteínas foi obtida através da montagem e anotação do genoma de *Eucalyptus grandis* BRASUZ1, versão 1.1 disponível no portal do projeto Phytozome v.9. A anotação funcional das sequências protéicas identificadas por correlação espectral foi obtida de acordo com os termos sugeridos e vocabulário controlado pelo “Gene Ontology Consortium”. As etapas de alinhamento, anotação e classificação foram realizadas por meio do uso do programa Blast2GO (CONESA et al., 2005), com os seguintes parâmetros de restringência: Database “Swissprot”, Blast program “Blastp”, Blast ExpectValue “1.0E⁻³”, number of Blast hits “20”.

2.7 Avaliação do grau de enriquecimento do proteoma plastidial

Foram realizadas três avaliações de pureza e enriquecimento dos extratos cloroplastidiais. Inicialmente, a pureza dos subproteomas foi avaliada quantitativamente utilizando-se como referências as sequências das proteínas: ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase subunidade pequena (controle positivo), “Germin” e “NAC” (controles negativos), depositadas no portal do projeto Phytozome conforme acessos indicados na Tabela 2. A abundância dos controles foi estimada pelo “normalized spectral abundance factor” (NSAF) (ZYBAILOV et al., 2006). Além desta avaliação dirigida, o grau de enriquecimento dos extratos protéicos foi estimado segundo a localização celular sugerida pelo programa Blast2GO, adicionando-se os dados resultantes da avaliação do preditor de localização celular ChloroP 1.1 (EMANUELSSON et al., 1999). Finalmente, o enriquecimento dos extratos protéicos plastidiais também foi avaliado diretamente a partir dos dados espectrométricos por

comparação da intensidade do sinal de um mesmo peptídeo precursor das proteínas contaminantes "Germin" e "NAC".

Tabela 2. Proteínas de *Eucalyptus urograndis* utilizadas como controles negativos e positivos nos experimentos de isolamento de cloroplastos.

Acesso ^a	Descrição ^b
Eucgr.C03525	RuBisCO subunidade pequena (controle positivo)
Eucgr.C03347	Germin (controle negativo)
Eucgr.K00451	Domínio UBA / TS-N / NAC (controle negativo)

a: ID do transcrito

b: descrição funcional segundo PFAM.

2.8 Mapeamento de vias fotossintéticas

A metodologia de isolamento e extração de proteínas de cloroplastos estabelecida neste capítulo será utilizada para a avaliação dos efeitos do enriquecimento de CO₂ atmosférico no metabolismo do híbrido *E. urograndis* (Capítulo 3), portanto, é fundamental que esta estratégia permita a identificação de grande parte das proteínas e enzimas relacionadas à fotossíntese e assimilação de carbono. Sabendo disso, as proteínas da cadeia de transporte de elétrons e do ciclo de Calvin-Benson foram mapeadas utilizando o banco de dados Kegg Metabolic Pathway (OGATA et al., 1999). Este mapeamento foi possível através da utilização das sequências homólogas em *Arabidopsis thaliana* das proteínas identificadas em *Eucalyptus urograndis*, seguido de carregamento das mesmas no banco das vias metabólicas para essa espécie no site: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de cloroplastos

3.1.1 Obtenção da banda cloroplastidial

Com o objetivo de identificar o melhor método de isolamento de cloroplastos intactos para o híbrido *Eucalyptus urograndis*, foram testadas diversas adaptações do protocolo sugerido por Shiraya et al. (2014). Primeiramente, as estratégias de isolamento avaliadas foram baseadas em maceração por uso de pistilo em almofariz e com gradiente de Percoll 80-40% (1:3). Essa estratégia não resultou em separação do material plastidial, ficando a amostra depositada no fundo do tubo de centrifugação (Figura 1A). Tendo em vista que a concentração do Percoll empregada neste método foi, possivelmente, insuficiente para reter os cloroplastos intactos, optou-se por testar outro sistema de separação, desta vez mais concentrado, composto por 100-60% de Percoll (1:1). Tal sistema resultou em um isolamento parcial do material plastidial (Figura 1B).

Visando aperfeiçoar o procedimento de lise celular, foi adotada a metodologia de processamento das amostras por uso de um “mixer” (Mondial). Contudo, para todos os sistemas de separação indicados na Tabela 1, nenhum se mostrou eficiente para o isolamento dos cloroplastos, ficando todo o material vegetal depositado no fundo dos tubos (Figura 1C, D, E e F). Tal resultado é indicativo de que o procedimento de ruptura celular por uso do “mixer” pode ter resultado em ruptura plastidial, uma vez que os mesmos não foram retidos em nenhuma das concentrações de Percoll avaliadas (Tabela 1). Frente aos resultados parciais de isolamento de cloroplastos após lise celular por maceração e uso de “mixer”, foi testado o uso do equipamento Turrax Omni GLH nos mesmos sistemas de separação avaliados anteriormente. Destes, somente aquele composto por Percoll 100-60% (1:1) resultou no isolamento e imobilização de cloroplastos na interface do sistema de separação (Figura 1G).

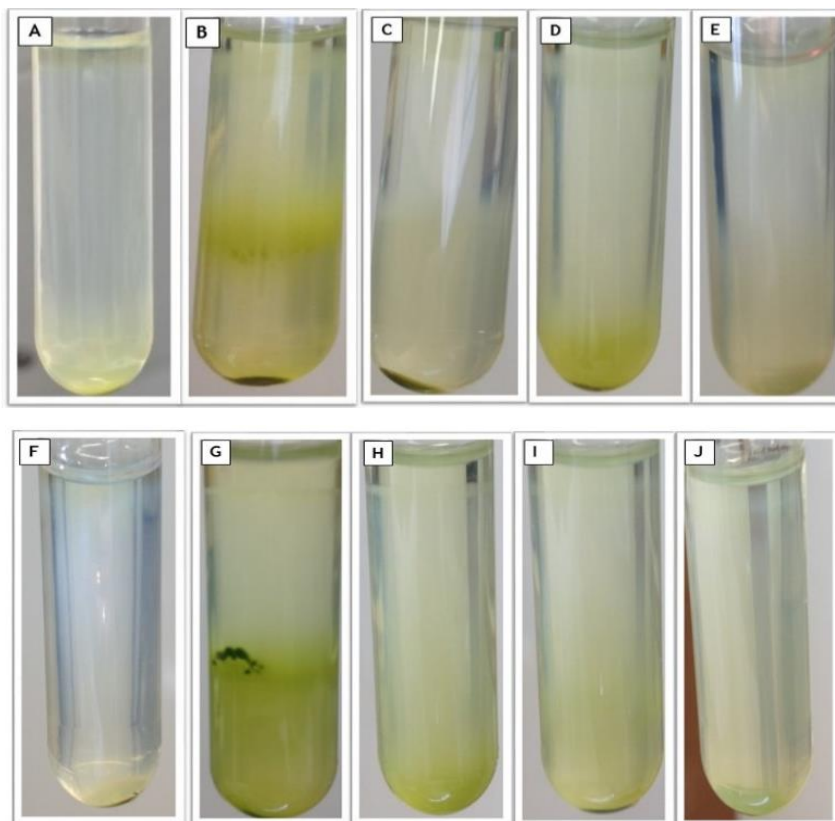


Figura 1. Purificação dos cloroplastos de *Eucalyptus urograndis* em sistemas de separação por gradiente de densidade de Percoll. **A:** Maceração com pistilo, gradiente de 80-40% (1:3); **B:** Maceração com pistilo, gradiente de 100-60% (1:1); **C:** Mixer, gradiente de 100-60% (1:1); **D:** Mixer, gradiente de 100-60% (1:4); **E:** Mixer, gradiente de 80-40% (1:1); **F:** Mixer, gradiente de 80-40% (1:4); **G:** Turrax Omni GLH, gradiente de 100-60% (1:1); **H:** Turrax Omni GLH, gradiente de 100-60% (1:4); **I:** Turrax Omni GLH, gradiente de 80-40% (1:1); **J:** Turrax Omni GLH, gradiente de 80-40% (1:4).

Dentre as três estratégias de processamento de material vegetal avaliados, aquele baseado no uso do equipamento Turrax mostrou-se o mais eficiente na obtenção de uma banda cloroplastidial localizada na interface do gradiente de densidade de Percoll. Sendo assim, o mesmo foi utilizado para o rompimento celular e isolamento de cloroplastos segundo o protocolo do kit de isolamento de cloroplastos CP-ISO (Sigma-Aldrich). Esta combinação permitiu a obtenção de uma maior separação dos cloroplastos em relação aos resultados obtidos anteriormente, sendo possível a observação de uma banda bem definida um pouco acima da interface entre as duas concentrações de Percoll (Figura 2).



Figura 2. Purificação de cloroplastos de *Eucalyptus urograndis* seguindo o protocolo de isolamento de cloroplastos CP-ISO (Sigma-Aldrich) em gradiente Percoll 80-40% (proporção 1:2).

3.1.2 Visualização dos cloroplastos

A avaliação microscópica do material vegetal isolado por meio de maceração em almofariz e pistilo indicou que tal processamento de amostras é pouco eficiente para o rompimento de células foliares de *E. urograndis*, uma vez que houve a detecção de poucos cloroplastos intactos (Figura 3 A e B). Por outro lado, a ausência de material plastidial íntegro nas amostras processadas pelo “mixer” corrobora com a hipótese de que esse aparelho tenha sido agressivo no isolamento plastidial, resultando na obtenção de muitos cloroplastos rompidos, com formato enrugado e coloração verde escura (Figura 3C, D, E e F). O processamento de amostras com o homogeneizador de tecidos Turrax mostrou-se o mais brando, resultando em um maior número de cloroplastos intactos em relação às estratégias descritas anteriormente (Figura 3G, H, I e J). Contudo, as avaliações morfológicas por microscopia revelaram resultados ainda insatisfatórios, pois também foi possível observar um grande número de cloroplastos rompidos e outros contaminantes celulares em todas as estratégias. Por fim, o uso do kit de isolamento de cloroplastos CP-ISO (Sigma-Aldrich), em combinação com o homogeneizador Turrax, resultou no isolamento de um grande número de cloroplastos intactos e na obtenção de extratos livres de contaminantes conforme indicado na Figura 3K.

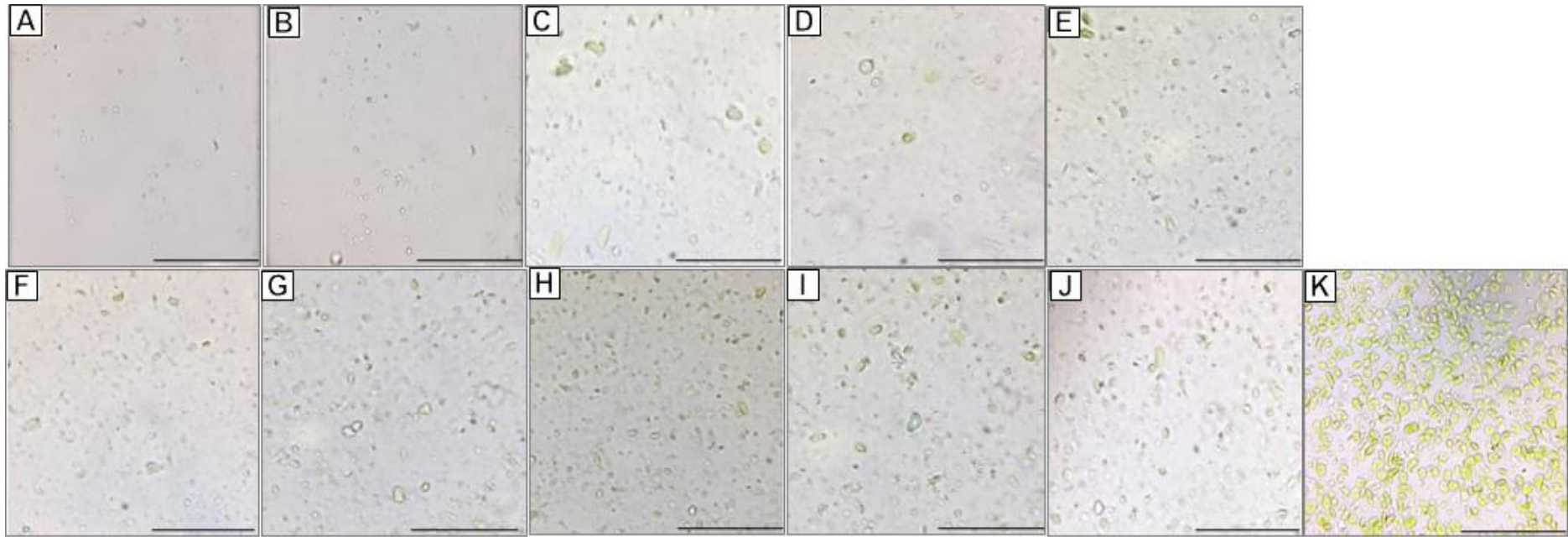


Figura 3. Microscopia de campo claro de cloroplastos isolados de *Eucalyptus urograndis* isolados por meio do uso de diferentes estratégias de separação. **A:** Maceração com pistilo, gradiente de Percoll 80-40% (1:3); **B:** Maceração com pistilo, gradiente de Percoll 100-60% (1:1); **C:** Mixer, gradiente de Percoll 100-60% (1:1); **D:** Mixer, gradiente de Percoll 100-60% (1:4); **E:** Mixer, gradiente de Percoll 80-40% (1:1); **F:** Mixer, gradiente de Percoll 80-40% (1:4); **G:** Turrax Omni GLH, gradiente de Percoll 100-60% (1:1); **H:** Turrax Omni GLH, gradiente de Percoll 100-60% (1:4); **I:** Turrax Omni GLH, gradiente de Percoll 80-40% (1:1); **J:** Turrax Omni GLH, gradiente de Percoll 80-40% (1:4); **K:** Turrax Omni GLH e kit CP-ISO (Sigma-Aldrich), gradiente de Percoll 80-40% (1:2). Aumento de 100 vezes, barra = 100 μm .

3.2 Avaliação do proteoma plastidial

3.2.1 *Rendimento protéico*

O rendimento protéico obtido após o uso das diferentes estratégias de isolamento de cloroplastos confirmam as hipóteses levantadas anteriormente. As estratégias baseadas em lise celular por maceração em almofariz e pistilo resultaram na extração das menores quantidades de proteínas (Figura 4, barras 1 e 2). Tais valores de rendimento protéico foram comparáveis àqueles obtidos segundo as estratégias que utilizaram rompimento celular por “mixer” e que, possivelmente, resultaram em rompimento plastidial e consequente redução na quantidade de proteínas extraídas (Figura 4, barras 3-6). Finalmente, as estratégias que fizeram uso do homogeneizador Turrax foram aquelas em que foi observado maior rendimento protéico (Figura 4, barras 7-11). Dentre essas, aquela baseada no gradiente de separação 80-40% (1:1) foi a que resultou em maior quantidade de proteínas extraídas por grama de material foliar. Esse resultado foi comparável àquele obtido pela estratégia que fez uso do kit comercial CP-ISO (Sigma-Aldrich), o qual também obteve os maiores valores de rendimento protéico (Figura 4, barras 10 e 11, respectivamente).

Diante desses resultados, as subseqüentes avaliações do proteoma plastidial foram restritas a comparativas entre a estratégia de isolamento que não faz uso de reagentes e protocolos comerciais; ou seja, aquela baseada em ruptura celular por Turrax seguido de isolamento de cloroplastos em gradiente de 80-40% (1:1) e a estratégia que faz uso de reagentes e protocolo sugerido pelo kit comercial CP-ISO (Sigma-Aldrich). Deste ponto em diante, a primeira estratégia descrita nessa seção será chamada de estratégia não comercial e a segunda de estratégia comercial.

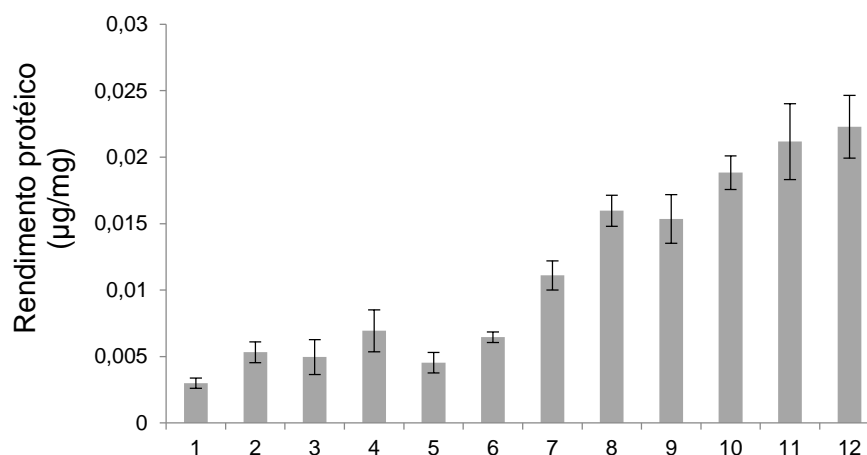


Figura 4. Rendimento protéico obtido após o uso de estratégias de purificação de cloroplastos de *Eucalyptus urograndis* representando a média de três repetições biológicas \pm erro padrão. **1:** Maceração com pistilo, gradiente de 80-40% (1:3); **2:** Maceração com pistilo, gradiente de 100-60% (1:1); **3:** Mixer, gradiente de 100-60% (1:1); **4:** Mixer, gradiente de 100-60% (1:4); **5:** Mixer, gradiente de 80-40% (1:1); **6:** Mixer, gradiente de 80-40% (1:4); **7:** Turrax Omni GLH, gradiente de 100-60% (1:1); **8:** Turrax Omni GLH, gradiente de 100-60% (1:4); **9:** Turrax Omni GLH, gradiente de 80-40% (1:1); **10:** Turrax Omni GLH, gradiente de 80-40% (1:4); **11:** Turrax Omni GLH e kit comercial CP-ISO (Sigma-Aldrich); **12:** Proteoma foliar total.

Previamente às análises por espectrometria de massas, as amostras protéicas isoladas foram avaliadas quanto à reprodutibilidade do processo de extração. Foi possível detectar as bandas de separação eletroforética com alto grau de reprodutibilidade entre as repetições biológicas utilizadas (Figuras 5 e 6).

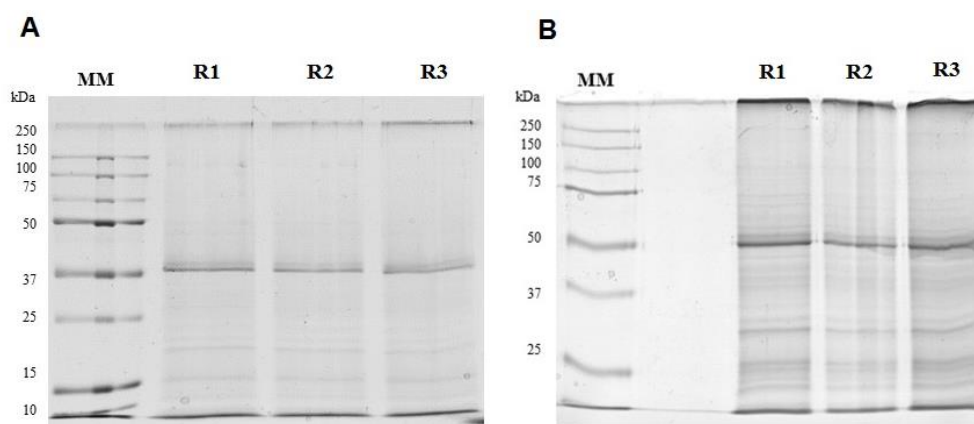


Figura 5. Géis de poliácridamida a 12% contendo 5 μ g de proteínas cloroplastidiais. **A:** Estratégia não-comercial, MM: marcador

molecular; R1-R3: repetições biológicas; **B**: Estratégia comercial, MM : marcador molecular; R1-R3: repetições biológicas.

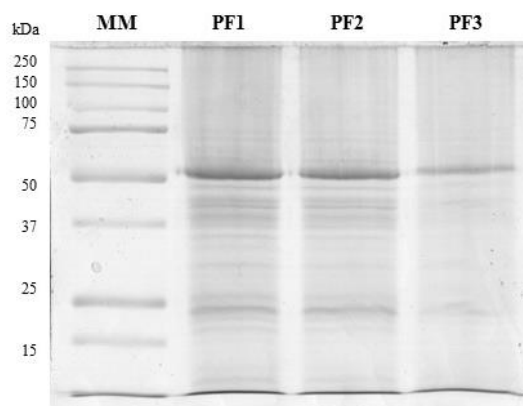


Figura 6. Gel de poli-acrilamida a 12% contendo 5 µg de proteoma foliar. MM: marcador molecular; PF: proteoma foliar, repetições biológicas 1 - 3.

3.2.2 Enriquecimento cloroplastidial

Os extratos plasmidiais obtidos a partir de ambas as estratégias citadas anteriormente foram digeridos enzimaticamente, separados em géis de poli-acrilamida (em triplicatas) e analisados em espectrômetro de massas conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Foi possível observar que as duas estratégias de isolamento de cloroplastos apresentaram resultados semelhantes quanto ao número de proteínas identificadas. Quantidades iguais a 658, 650 e 662 proteínas foram identificadas a partir do processamento de material foliar segundo a estratégia não comercial, comercial e proteoma foliar total, respectivamente. Como o número de proteínas identificadas em ambas as estratégias (comercial e não-comercial) impossibilitou a seleção da melhor abordagem, foi realizada uma avaliação da classificação funcional e localização celular de todas as identidades por meio do uso do programa Blast2GO. Além disso, aos resultados obtidos, foram adicionados os dados obtidos pelo programa de predição subcelular ChloroP (Figura 7). O proteoma isolado por meio da estratégia comercial foi aquele que apresentou a maior fração de proteínas já descritas como cloroplastidiais, tendo 78% de suas identidades associadas à localização plastidial pelo programa Blast2GO e 4% pela ferramenta de predição ChloroP (Figura 7B). Este grau de enriquecimento é

similar ao obtido por outros estudos de proteômica cloroplastidial, onde foram identificadas 73% de proteínas plastidiais em trigo (KAMAL et al., 2013), 92% em *A. thaliana* (HUANG et al., 2012) e 94% em *Jatropha curcas* (PINHEIRO et al., 2013). Portanto, é possível sugerir que o uso do kit CP-ISO permitiu um maior enriquecimento do proteoma cloroplastidial em relação à outra estratégia avaliada, sendo selecionado para avaliações de contaminação e pureza do extrato em relação ao proteoma foliar total.

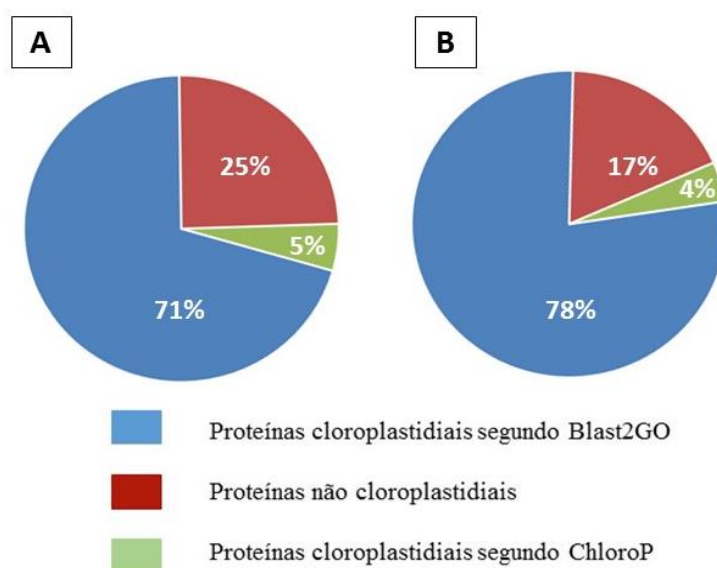


Figura 7. Grau de enriquecimento do proteoma cloroplastidial isolado de folhas jovens de *Eucalyptus urograndis*. **A:** Estratégia não-comercial; **B:** Estratégia comercial.

3.2.3 Pureza do proteoma cloroplastidial

A avaliação da contaminação e pureza dos extratos obtidos foi realizada por comparação dos valores de abundância de proteínas-controle. A proteína RuBisCO (acesso Eucgr.C03525) apresentou um enriquecimento de aproximadamente três vezes nos extratos cloroplastidiais em relação a sua quantidade obtida nos extratos protéicos foliares totais (Figura 8). É importante salientar que a estratégia de isolamento plastidial aumentou a reprodutibilidade da abundância dessa proteína em relação aos extratos foliares totais. Com relação às proteínas controle-negativas, foi observada uma redução expressiva após o isolamento cloroplastidial. Para a proteína “Germin” (Eucgr.C03347), a estratégia adotada resultou na identificação da mesma em somente uma

repetição biológica, a qual se mostrou, aproximadamente, três vezes menos abundante do que quando isolada diretamente dos extratos foliares totais. Embora a proteína “NAC” (Eucgr.K00451) tenha sido identificada em duas repetições dos isolamentos cloroplastidiais, sua abundância também se mostrou reduzida expressivamente em relação aos extratos foliares de *E. urograndis*.

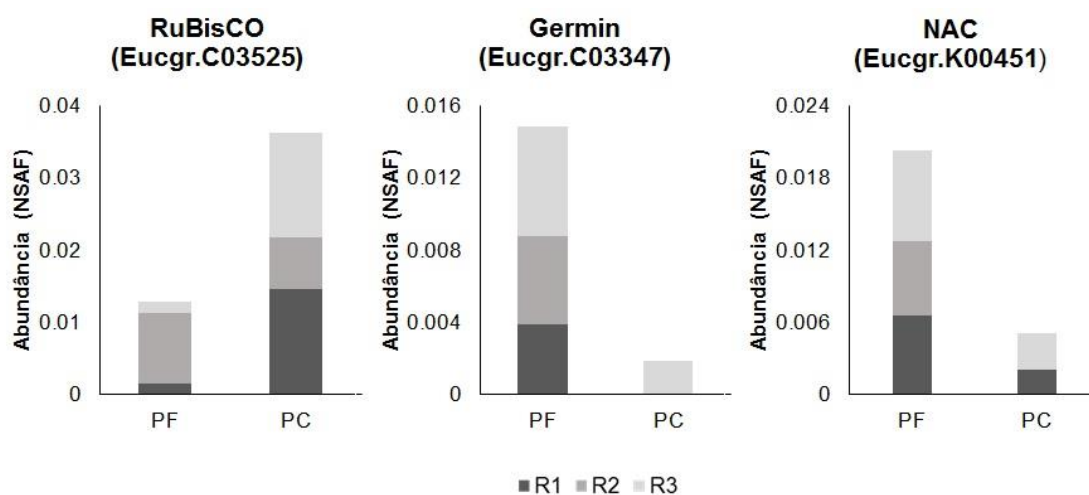


Figura 8. Avaliação da pureza do proteoma cloroplastidial obtido de folhas jovens de *Eucalyptus urograndis*. **PF:** proteoma foliar total; **PC:** proteoma cloroplastidial obtido pela estratégia comercial para isolamento de cloroplastos; **R1-R3:** repetições biológicas 1 - 3.

Visando confirmar a redução na abundância das proteínas selecionadas como controle negativas nos extratos proteicos oriundos da estratégia comercial de isolamento de cloroplastos, os sinais dos peptídeos AAVTTAFVFNQFGLNGLISLAR e IEDLSSQLQTQAAQQFR, mapeados para as proteínas “Germin” e “NAC” respectivamente, foram registrados. Em extratos proteicos foliares o peptídeo alvo da proteína “Germin” apresentou íon com intensidade 2,15 vezes maior do que o íon peptídico oriundo dos extratos cloroplastidiais (Figura 7A e B). Esse resultado foi confirmado pela maior intensidade do íon precursor EDLSSQLQTQAAQQFR nos extratos foliares totais, registrando sinal 2,30 vezes maior do que aquele observado nos extratos enriquecidos por plastídeos (Figura 9C e D).

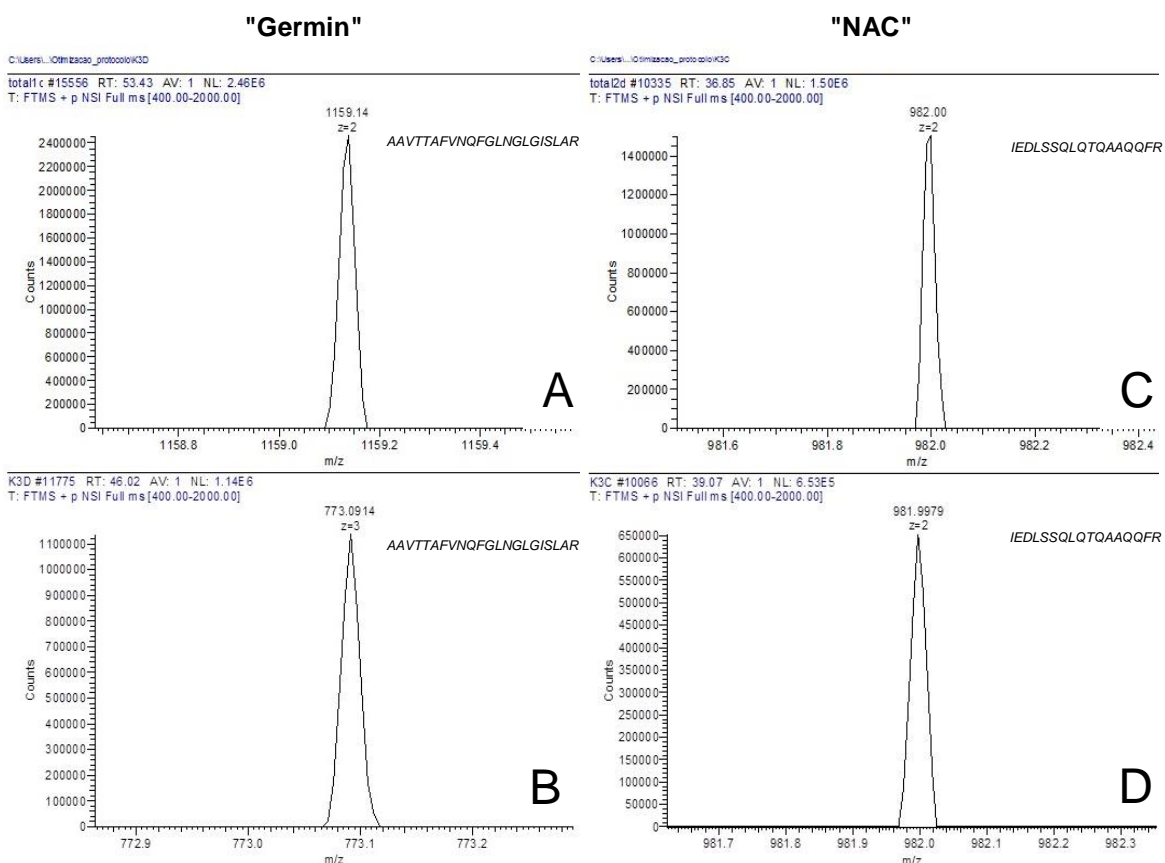


Figura 9. Intensidade dos sinais dos íons AAVTTAFVNQFGLNGLGISLAR (proteína “Germin”, acesso Eucgr.C03347) e IEDLSSQLQTQAAQQR (proteína “NAC”, acesso Eucgr.K00451), após aquisição em espectrômetro de massas. **A e C:** proteoma foliar total; **B e D:** proteoma cloroplastidial.

3.3 Mapeamento de vias fotossintéticas

Para avaliação dos efeitos do CO₂ no metabolismo da espécie *E. urograndis*, é fundamental que a estratégia de isolamento do proteoma cloroplastidial permita a identificação de grande parte das proteínas e enzimas relacionadas à fotossíntese e assimilação de carbono. O mapeamento das identificações obtidas por enriquecimento cloroplastidial pela estratégia comercial resultou em cobertura quase completa das vias de fotólise, cadeia de transporte de elétrons e ciclo de Calvin-Benson (Figuras 10 e 11). Embora algumas subunidades da cadeia de transporte de elétrons não tenham sido identificadas no experimento, a não identificação destas pode estar relacionada com a suas propriedades físico-químicas, impedindo que as mesmas sejam solubilizadas e analisadas segundo a metodologia aqui utilizada. Ainda assim, para cada complexo enzimático e proteínas constituídas por mais do que uma

subunidade, ao menos um membro foi identificado e metabolicamente mapeado.

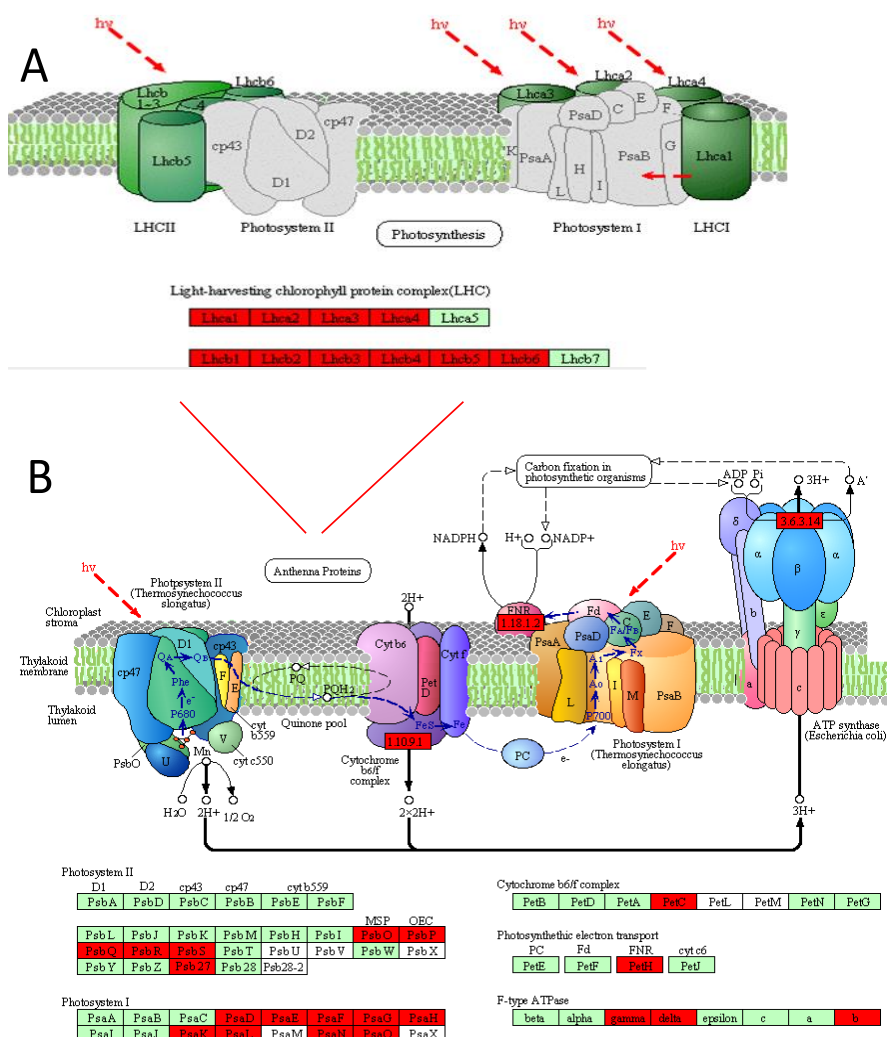


Figura 10. Mapeamento *in silico* da cadeia de transporte de elétrons e complexo antena, realizado a partir das identificações do proteoma plastidial de *Eucalyptus urograndis*. **A:** complexo-antena; **B:** cadeia de transporte de elétrons; Proteínas e enzimas identificadas no extrato protéico estão destacadas em vermelho.

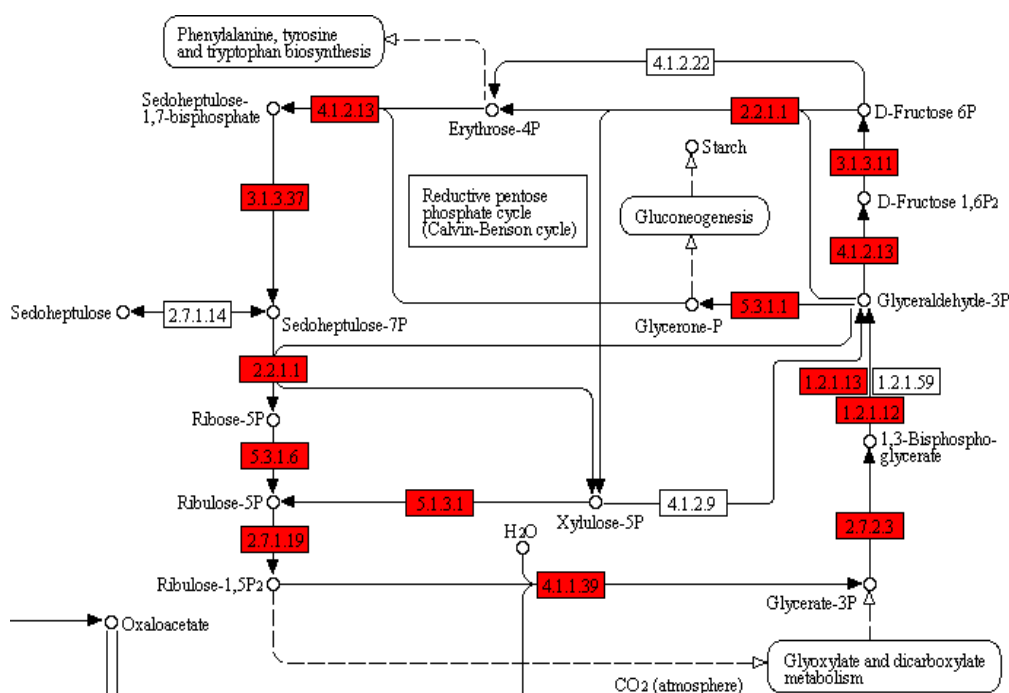


Figura 11. Mapeamento *in silico* do ciclo de Calvin-Benson de fixação de carbono, realizado a partir das identificações do proteoma plastidial de *Eucalyptus urograndis*. Proteínas e enzimas identificadas no extrato protéico estão destacadas em vermelho.

4. CONCLUSÃO

A estratégia de isolamento do proteoma cloroplastidial constituída por rompimento celular pelo equipamento Turrax e purificação por uso do kit comercial CP-ISO (Sigma-Aldrich) apresentou os melhores resultados quanto à: morfologia dos cloroplastos observada em microscopia de luz (1); rendimento protéico após isolamento plastidial (2); abundância de proteínas já descritas como plastidiais (3); grau de contaminação por proteínas não cloroplastidiais (4). Além disso, essa estratégia permitiu o mapeamento de grande parte das proteínas e enzimas relacionadas à fotossíntese na espécie *E. urograndis*.

5. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. K.; BOURGUIGNON, J.; ROLLAND, N.; EPHRITIKHINE, G.; FERRO, M.; JAQUINOD, M.; ALEXIOU, K. G.; CHARDOT, T.; CHAKRABORTY, N.; JOLIVET, P.; DOONAN, J. H.; RAKWAL, R. Plant Organelle Proteomics: Collaborating for optimal cell function. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 30, p. 772 – 853, 2011.

ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. **EMBO reports**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 874 – 879, 2006.

BAGINSKY, S.; KLEFFMANN, T.; VON ZYCHLINSKI, A.; GRUISSEM, W. Analysis of shotgun proteomics and RNA profiling data from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 637 – 640, 2005.

BAGINSKY, S.; GRUISSEM, W. Chloroplast proteomics: Potentials and challenges, **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1213 – 1220, 2004.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674–3676, 2005.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. **Protein Science**, v. 8, n. 5, p. 978-984, 1999.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 1178–1186, 2012.

HUANG, M.; FRISO, G.; NISHIMURA, K.; QU, X.; OLINARES, P. D. B.; MAJERAN, W. Construction of plastid reference proteomes for maize and arabidopsis and evaluation of their orthologous relationships; The concept of orthoproteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 491 – 504, 2013.

KAMAL, A. H. M.; CHO, K.; CHOI, J. S.; BAE, K. H.; KOMATSU, S.; UOZUMI, N.; WOO, S. H. The wheat chloroplastic proteome. **Journal of Proteomics**, v. 93, p. 326–342, 2013.

KLEFFMANN, T.; RUSSENBERGER, D.; VON ZYCHLINSKI, A.; CHRISTOPHER, W.; SJOLANDER, K.; GRUISSEM, W. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. **Current Biology**, v. 14, p. 354 – 362, 2004.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

MASON, C. B.; MATTHEWS, S.; BRICKER, T. M.; MORONEY, J. V. Simplified Procedure for the Isolation of Intact Chloroplasts from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant physiology**, v. 97, p. 1576 – 1580, 1991.

MENG, Q.; RAO, L.; XIANG, X.; ZHOU, C.; ZHANG, X.; PAN, Y. A Systematic Strategy for Proteomic Analysis of Chloroplast Protein Complexes in Wheat, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, p. 2194 – 2199, 2011.

MYBURG, A. A.; GRATAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; VAN DER MERWE, K.; SINGH, P.; VAN JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C.; PETROLI, P.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T. J.; YE, C-Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M.; SAN CLEMENTE, H.; SAIDI, N.; CASSAN-WANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C. A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A. R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSER, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; KULHEIM, C.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JR, G. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J.; VAN DE PEER, I.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 19, p. 356-362, 2014.

OGATA, H.; GOTO, S.; SATO, K.; FUJIBUCHI, W.; BONO, H.; KANEHISA, M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 29–34, 1999.

PANDEY, A.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, N. Proteomics Approach to Identify Dehydration Responsive Nuclear Proteins from

Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 88 – 107, 2008.

PINHEIRO, C. B.; SHAH, M.; SOARES, E. L.; NOGUEIRA, F. C. S.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA, M.; ARAÚJO, G. D. T.; SOARES, A. A.; DOMONT, G. B.; CAMPOS, F. A. P. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n.11, p. 5137 – 5145, 2013.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**. v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SHIRAYA, T., KANEKO, K., MITSUI, T. Quantitative Proteomic Analysis of Intact Plastids. Jorin-NOVO, J.V., KOMATSU, S., WECKWERTH, W., WIENKOOP, S. **Plant Proteomics Methods and Protocols Series: Methods in Molecular Biology**, v. 1072, p. 469-480, 2014.

VIEIRA, L. D. N.; FAORO, H.; DE FREITAS FRAGA H. P.; ROGALSKI, M.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA PEDROSA F. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers. **PLoS One**, v. 9, p. 1 – 8, 2014.

ZYBAILOV, B.; MOSLEY, A. L.; SARDIU, M. E.; COLEMAN, M. K.; FLORENS, L.; WASHBURN, M, P. Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2339-2347, 2006.

CAPÍTULO 3 - CULTIVO DE *Eucalyptus urograndis* EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO₂: MUDANÇAS NO PROTEOMA CLOROPLASTIDIAL

RESUMO - Projeções climáticas globais indicam que haverá um aumento expressivo na concentração atmosférica de gás carbônico nos próximos anos. A fim de investigar se tais mudanças atmosféricas podem afetar o proteoma cloroplastidial de uma planta C3, perene e economicamente importante, mudas de *Eucalyptus urograndis* de aproximadamente três meses de idade foram cultivadas sob concentrações atmosféricas de CO₂ controladas (400 e 1000 ppm) durante dez semanas. Para tanto, folhas jovens foram coletadas, os cloroplastos isolados e a identificação de proteínas foi realizada por espectrometria de massas. Foram identificadas 816 proteínas em *E. urograndis*, das quais 80% já foram descritas como plastidiais. Dentre as proteínas diferencialmente reguladas que apresentaram aumento significativo em sua abundância, três delas estão relacionadas com a eliminação de EROs, o que sugere que o enriquecimento de CO₂ induziu estresse oxidativo em *E. urograndis*. O mapeamento de vias metabólicas resultou na identificação de todas as proteínas envolvidas no ciclo de Calvin-Benson de fixação de carbono, além da detecção de um aumento discreto, porém significativo na abundância de enzimas-chave: PGK, GAPDH, FBA e FBPase, SBPase e RPI. Plantas tratadas com 1000 ppm de CO₂ apresentaram fechamento estomático em resposta à condição ambiental imposta e diminuição na área do tecido vascular foliar, porém a eficiência quântica do fotossistema II não sofreu alterações significativas. Esta é a primeira caracterização de proteoma cloroplastidial do gênero *Eucalyptus* e nossos resultados indicam que a atmosfera enriquecida com CO₂ pode causar um ligeiro, porém positivo aumento na abundância de proteínas envolvidas na fixação de carbono.

Palavras-chave: contagem espectral, mudanças climáticas, organela.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), a concentração atmosférica de CO₂ na Terra está atualmente em seu nível mais elevado desde os últimos 800.000 anos, e espera-se que continue a aumentar devido à dependência dos combustíveis fósseis e às taxas de crescimento da população mundial. Estima-se que a concentração atmosférica média de CO₂ irá atingir 985 ppm (794 - 1142 ppm) no ano de 2100, com o nível de confiança de 90% (IPCC, 2013). Tal aumento, associado ao aquecimento global e às mudanças nos padrões de precipitação, podem causar grandes consequências para o crescimento e desenvolvimento de plantas terrestres em um futuro próximo. Este novo cenário pode levar a alterações metabólicas nas plantas, especialmente em compartimentos subcelulares diretamente envolvidos com a fixação de carbono. A fotossíntese de plantas C3 é conhecida por funcionar a níveis de CO₂ abaixo do ótimo, podendo apresentar um aumento dramático na assimilação de carbono, no crescimento e nos rendimentos com o aumento da disponibilidade desse gás. Um experimento clássico, realizado por Kimball (1983), mostrou que o rendimento de diversas culturas C3 provavelmente irá aumentar em 33% como consequência da duplicação do CO₂ ambiente. Respostas positivas de crescimento em atmosfera com elevada concentração de CO₂ em espécies de plantas lenhosas têm sido amplamente divulgadas quando outros recursos foram adequadamente fornecidos (ATWELL et al., 2003; LIBERLOO et al., 2006; CROUS et al., 2008; ATWELL et al., 2009).

As plantas respondem às mudanças ambientais através da modificação ou regulação de características bioquímicas, moleculares, fisiológicas e estruturais, as quais, em última instância, podem resultar em adaptações morfológicas. A proteômica é uma ferramenta poderosa para descobrir os componentes moleculares envolvidos na resposta ao estresse abiótico, como revisado por Timperio et al. (2008). Uma vez que o cloroplasto é a organela mais sensível ao estresse abiótico (KRATSCH & WISE, 2000), seu proteoma dinâmico tem grande importância para a compreensão de como as plantas se adaptam às mudanças ambientais, como o aumento da concentração atmosférica de CO₂. O objetivo deste capítulo foi investigar a existência de

alterações na abundância de enzimas envolvidas nas primeiras etapas de fixação de carbono da espécie de *E. urograndis* quando estimuladas pelo CO₂.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Mudas clonais do híbrido *Eucalyptus urograndis* (I-144), com cerca de 110 dias de idade foram adquiridas da empresa Agriflora (Araraquara - SP, Brasil) e cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal - SP, Brasil) em vasos de 30 litros contendo substrato forestal. Após uma semana de cultivo, as plantas foram divididas em dois lotes e transferidas para duas câmaras de crescimento (Fitotron-Weiss Gallenkamp, Reino Unido) com 27 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 187 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e concentração de dióxido de carbono controlada. Durante todo o período de cultivo, as plantas receberam 500 mL de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950) meia-força uma vez por semana para garantir a disponibilidade de nutrientes básicos para o desenvolvimento. A indução das alterações do proteoma plastidial foi realizada através do crescimento das plantas sob concentrações de CO₂ ajustadas para 1000 ppm (tratamento) e 400 ppm (controle). Após 10 semanas de cultivo, folhas jovens foram coletadas e imediatamente submetidas aos procedimentos de isolamento de cloroplastos e análises por microscopia.

2.2 Isolamento de cloroplastos

A estratégia empregada para o isolamento de cloroplastos foi aquela descrita como estratégia comercial no capítulo anterior. Foram utilizadas três repetições biológicas, compostas de aproximadamente sete folhas jovens, totalmente expandidas, presentes no terço superior de duas plantas. Para o isolamento plastidial, primeiramente, três gramas de folhas foram coletados de plantas que permaneceram no escuro por 11 horas e mantidas em gelo. Com o

auxílio de uma tesoura, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços e tiveram sua nervura central removida. O material vegetal foi depositado em tubo contendo 18 mL de “chloroplast isolation buffer” (CIB) com BSA 0,1% gelado e, em seguida, foi processado pelo homogeneizador Turrax Omni GLH, em 4 ciclos de 5 segundos, em velocidade média. O material processado foi filtrado em membrana de Nylon (Mesh 100) fornecida pelo kit e em seguida centrifugado a 200 xg por 3 minutos a 4 °C para remover células intactas e pedaços de parede celular. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e centrifugado a 1000 xg por 7 minutos a 4 °C para precipitar os cloroplastos.

O pellet verde contendo os cloroplastos foi ressuscitado em 1 mL de CIB com BSA 0,1% para então ser purificado em um gradiente de Percoll 80-40% na proporção 1:2 (v/v). Em seguida, o sistema foi submetido a centrifugação em 3200 xg por 15 minutos a 4 °C, onde os cloroplastos intactos formam uma banda na interface entre as camadas de 40 e 80% de Percoll, de onde são coletados e transferidos para um novo tubo. A última etapa realizada foi um processo de lavagem, onde foi adicionado um volume de CIB igual a três vezes o volume dos cloroplastos coletados, seguido de centrifugação a 1700 xg por 3 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de cloroplastos lavados foi ressuscitado em 500 µL de CIB. Uma alíquota de 20 µL foi coletada para avaliação da integridade dos cloroplastos por microscopia de luz, e o restante foi armazenado em freezer -30 °C.

2.3 Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais

A extração das proteínas dos cloroplastos foi realizada também seguindo protocolo adaptado de Shiraya et al. (2014). Primeiramente, foi adicionado um volume de tampão de extração de proteínas (2 M tiourea; CHAPS; 1 M Tris-HCl, pH 8; glicerol 50%; triton X-100; 1 M DTT e 8 M ureia) igual a 5 vezes o volume em que os cloroplastos foram ressuscitados. Posteriormente, foram realizados 15 ciclos de sonicação de 1 minuto, com intervalos de 30 segundos no gelo, seguido de centrifugação a 3200 xg por 5 minutos a 4 °C para remoção de material membranoso. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e, a esse tubo, foi adicionado um

volume de acetona gelada igual a 10 vezes o volume do sobrenadante transferido. A precipitação das proteínas ocorreu por 12 horas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de centrifugação a 3200 xg por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, descarte do sobrenadante e resolubilização do pellet protéico em tampão de amostra contendo 125 mM Tris pH 6,8; 20% glicerol; 1% SDS e 1% DTT.

A concentração de proteínas solúveis foi estimada através do kit “Bio-Rad Protein Assay”, seguindo a metodologia do Microtiter Plate Protocols, baseado no método de Bradford (1976), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Separação de proteínas e digestão enzimática em gel

A separação dos extratos protéicos foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Para tanto, aliquotas contendo $25\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas foram diluídas (1:1, v/v) com tampão de amostra Laemmli 2X ($65,8\text{ mM}$ Tris-HCl, pH 6,8; 2,1% SDS; 26,3% (v/v) glicerol, 0,01% azul de bromofenol), aquecidas por 5 minutos a 99°C e aplicadas no topo do gel. O sistema eletroforético foi composto por um gel de empilhamento a 5% (acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8%) e 0,5% SDS, e um gel de separação, constituído de 12,5% (acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8%) e 1% SDS. O gel foi preparado em placa de vidro ($80\text{ x }100\text{ mm}$) com espaçadores (1,5 mm) e em seguida transferido para uma cuba vertical Bio-Rad, modelo Mini-protean® Tetra System, a qual foi preenchida com tampão de corrida (0,192 M glicina, 25 mM Tris e 0,1% SDS) e submetida a uma corrente constante de 20 mA por gel, em temperatura ambiente. Após a eletroforese, o gel foi imerso em um recipiente plástico contendo 30 mL de solução de coloração (0,08% *Coomassie Colodial*, 20% etanol, 1,6% ácido fosfórico, 8% sulfato de amônio, água (q.s.p. 1 L)) por 16 horas. Em seguida, foi realizada lavagem com solução descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e água (q.s.p. 100 mL)), por 12 horas. O gel foi mantido em solução de ácido acético 1% e sua imagem foi digitalizada em aparelho scanner Image Scanner III (GE Healthcare) em alta resolução e no modo de transparência.

Previamente às análises por espectrometria de massas, as misturas protéicas separadas nos géis de poliacrilamida foram digeridas em gel segundo o protocolo estabelecido por Shevchenko et al. (2007). Para tanto, os géis foram inicialmente segmentados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para microtubos. Posteriormente, o corante *Coomassie* foi removido por sucessivas lavagens em solução de 100 mM bicarbonato de amônio: acetonitrila (1:1, v/v) seguido de redução das proteínas em solução de 10 mM DTT em 100 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos a 56 °C. Após a etapa de redução, os resíduos de cisteína das proteínas no gel foram carbamidometilados por incubação em solução de 50 mM iodoacetamida em 100 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente.

Antes do início da digestão trípica, os fragmentos de gel foram saturados com solução de tripsina (5 ng de tripsina/ μ L de solução tampão contendo 10 mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila), incubados por 1 hora a 4 °C e, posteriormente, incubados a 37 °C por 16 horas para promover a digestão. Após a digestão, para extrair os peptídeos da matriz de poliacrilamida, foi utilizada uma solução de extração contendo 5% ácido fórmico: acetonitrila (1:2, v/v) e incubados em agitação por 30 minutos. O sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um novo microtubo. Este procedimento de extração foi repetido e, finalmente, acetonitrila pura foi adicionada aos fragmentos do gel e o sobrenadante também foi coletado. Os peptídeos extraídos foram secos com o auxílio de uma centrífuga acoplada a um sistema de vácuo (Centrivap) e o extrato seco foi armazenado a -30 °C.

2.5 Análises por espectrometria de massas e identificação de proteínas

Os peptídeos obtidos na etapa anterior foram ressuspensos em solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e separados em um sistema cromatográfico do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fischer Scientific) utilizando-se uma nano-coluna de fase reversa (15 cm, 3 μ m, 100 Å) e gradiente de polaridade decrescente (solvente A contendo 0,1% de ácido fórmico em H₂O e solvente B contendo 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), iniciando com

100% de solvente A, atingindo 35% de solvente B em 75 minutos, seguidos de 5 minutos de lavagem com 80% de solvente B, sob fluxo de 400 nL/min. A ionização e injeção dos peptídeos no espectrômetro de massas (Q-Exactive, Thermo) ocorreu por electrospray (ESI), utilizando-se 3,1 kV de potencial aplicado diretamente na agulha de injeção. O espectrômetro de massas foi operado no modo “data-dependent”, onde os dez íons peptídicos mais abundantes de cada “survey scan” foram selecionados para fragmentação e aquisição de espectros do tipo MS². Os espectros do tipo MS¹ e MS² foram adquiridos, respectivamente, em resolução igual a 70.000 e 35.000 FWHM (“full width at half maximum”). O tipo de fragmentação utilizado foi o “high collision energy” (HCD), com energia de colisão igual a 25 eV. Os íons peptídicos selecionados para fragmentação foram excluídos de um novo evento de fragmentação por 60 segundos.

A identificação das proteínas foi realizada por buscas restritivas baseadas nas sequências de proteínas da espécie *Eucalyptus grandis*, versão 1.1 depositadas no portal do projeto Phytozome v.9 (GOODSTEIN et al., 2012; MYBURG et al., 2014). As correlações entre os espectros do tipo MS², que foram obtidos do espectrômetro de massas, e os espectros virtuais, oriundos da digestão virtual e processamento do banco de proteínas, foram realizados pelos programas Sequest, Sequest HT e MS Amanda, contidos no ambiente virtual Proteome Discoverer 1.4, utilizando os seguintes parâmetros de busca: 20 ppm de tolerância para os íons precursores e 0,02 Da para os íons fragmentos, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação da cisteína como modificação estática. Os resultados obtidos (“peptide spectrum matches”, PSMs) foram filtrados, considerando apenas as identificações que possuísem coeficiente de correlação cruzada (XCorr) igual a 1,5; 2,0; 2,5 para os íons de carga +1, +2 e +3, respectivamente, Amanda Score 100 e taxa de falsos positivos máxima igual a 1%. A descrição das proteínas foi obtida através da montagem e anotação do genoma de *Eucalyptus grandis* BRASUZ1, disponível no portal do projeto Phytozome v.9.

2.6 Confirmação do enriquecimento do proteoma cloroplastidial

A confirmação dos resultados de enriquecimento foi realizada por uso de preditores de localização subcelular *in silico* e bancos de dados de proteômicos. Para tanto, a partir do número total de proteínas identificadas após isolamento plastidial e análises em espectrômetro de massas, foi calculada a percentagem de proteínas identificadas e que já haviam sido descritas como plastidiais. Uma proteína foi considerada plastidial quando designada como tal por pelo menos um dos quatro programas de predição de localização subcelular *in silico* (TargetP, ChloroP, WoLF e Predotar) ou quando apresentou uma proteína homóloga em qualquer um dos quatro bancos de dados utilizados: The Plant Proteome Database (PPDB), *Arabidopsis thaliana* chloroplast protein database (AT-Chloro), SUBcellular localisation database for *Arabidopsis* proteins (SUBA3) e The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR).

A pureza do proteoma plastidial também foi avaliada utilizando-se a metodologia também descrita no capítulo anterior. Foram utilizadas as sequências das proteínas “Germin” (acesso Eucgr.C03347, controle negativo) e “ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase” subunidades pequenas (acessos Eucgr.B03013 e Eucgr.K02223, controles positivos) depositadas no portal do projeto Phytozome v.9. Os espectros de fragmentos adquiridos para cada proteína identificada foram normalizados de acordo com Zybilov et al. (2006) e a abundância protéica (“Normalized Spectral Abundance Factor” - NSAF) foi utilizada na avaliação comparativa do proteoma cloroplastidial *versus* proteoma foliar.

2.7 Proteínas diferencialmente reguladas

A análise global da resposta do proteoma cloroplastidial ao estímulo de enriquecimento de CO₂ foi obtida através da identificação das proteínas diferencialmente reguladas. Para tanto, os espectros de fragmentos adquiridos para cada proteína identificada foram normalizados como citado na seção anterior e a abundância protéica (NSAF) foi calculada. O tratamento dos

valores ausentes foi realizado através do software Inferno RDN v1.1.5, utilizando o valor de NSAF médio da respectiva repetição biológica para a substituição. Uma proteína foi considerada como diferencialmente regulada se apresentou valor de NSAF superior ou inferior a 1,5 vezes o valor presente na condição controle (400 ppm CO₂) e se o teste T de Student apresentar nível de confiança superior a 95%.

2.8 Mapeamento de proteínas fotossintéticas

As proteínas da cadeia de transporte de elétrons e do ciclo de Calvin-Benson foram mapeadas utilizando o banco de dados Kegg Metabolic Pathway (OGATA et al., 1999). O mapeamento foi realizado por homologia, utilizando o organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Alterações na abundância de proteínas fotossintéticas foram avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), somando-se a abundância individual das isoformas para compor a abundância de cada enzima.

2.9 Avaliação do aparato fotossintético

As avaliações de fluorescência foram realizadas utilizando o fluorímetro modelo OS-30p, Opti-Sciences, sendo examinados dois pontos na superfície adaxial da terceira folha totalmente expandida de seis plantas de cada tratamento. Para tanto, antes da medição da eficiência fotoquímica, foi feita uma adaptação ao escuro da área amostrada da folha por 30 minutos. Os diferentes valores de fluorescência obtidos diretamente do aparelho (F_M e F_0) foram utilizadas para avaliação da eficiência quântica potencial (F_V/F_M) do fotossistema II, onde a fluorescência variável (F_V) corresponde à diferença $F_M - F_0$ (SOUZA et al., 2008).

O medidor eletrônico de clorofila utilizado foi o ClorofiLOG modelo CFL 1030 (Falker), que é um sensor comercial nacional que analisa três faixas de frequência de luz na medição e, através de relações de absorção de diferentes frequências, determina um Índice de Clorofila ICF (Índice de clorofila Falker)

levando em consideração a presença de clorofila dos tipos a e b (FALKER, 2008). Foram realizadas três medições na superfície adaxial da terceira folha totalmente expandida de 5 plantas de cada tratamento. Para todas as medidas realizadas, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, através do software ASSISTAT Versão 7.7, para comparar os resultados entre plantas controle e tratadas com enriquecimento de CO₂.

2.10 Microscopia eletrônica de varredura

Tecidos foliares de *E. urograndis* foram coletados para avaliar o número e o grau de abertura dos estômatos. Para isso, secções de aproximadamente 1 cm² foram cortadas no centro de uma folha totalmente expandida de três plantas selecionadas aleatoriamente em cada tratamento. Em seguida, os tecidos foliares foram fixados com tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) contendo 3% de glutaraldeído durante dois dias, seguido de cinco lavagens com o mesmo tampão. Para a fixação de ultra-estruturas, o material foi mantido durante seis horas em 1% de tetróxido de ósmio (O₄O_s) e desidratado através de uma série gradual de álcool etílico (30, 50, 70, 80, 90 e 100%) durante 20 minutos cada. Depois de secas (CO₂, 38 °C e 1200 psi), as amostras foram cobertas com ouro (\pm 30 nm de espessura) e visualizadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado a 15 kV com ampliação de 500x. O número de estômatos abertos (apresentando largura > 1 μ m) e o grau de abertura foram medidos utilizando o software ImageJ 1.48. O teste de normalidade e a análise estatística foram realizadas utilizando o programa Assistant 7.7 beta com o teste Mann-Whitney considerando $p < 0,05$.

2.11 Microscopia de luz

Duas folhas completamente expandidas de quatro plantas de *E. urograndis* foram selecionados aleatoriamente a partir de cada tratamento e fixadas em formalina, ácido acético e álcool etílico. Secções de 1 cm foram

cortadas com um bisturi no centro das folhas para evitar espessura diferencial. A preparação das amostras foliares compreendeu os seguintes passos: fixação, desidratação, inclusão (parafina), seccionamento e montagem das lâminas como descrito em Johansen (1940). Coloração com azul de toluidina e procedimentos desparafinização foram realizadas seguindo o protocolo descrito em Sakai (1973). Foram tomadas medidas do parênquima paliçádico e esponjoso, da epiderme adaxial e abaxial e dos feixes vasculares, em seguida os dados foram submetidos ao teste de normalidade e à análise estatística, conforme descrito na seção anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 O proteoma cloroplastidial de *E. urograndis*

O procedimento de isolamento de cloroplastos resultou na obtenção de plastídeos intactos, com formato globular e coloração verde brilhante, como pode ser observado na Figura 1. Utilizando-se um banco de dados de seqüências protéicas de uma espécie próxima, *Eucalyptus grandis*, foi possível a identificação de 816 proteínas nas amostras de *E. urograndis*, considerando-se ambos os tratamentos avaliados (Anexo I).

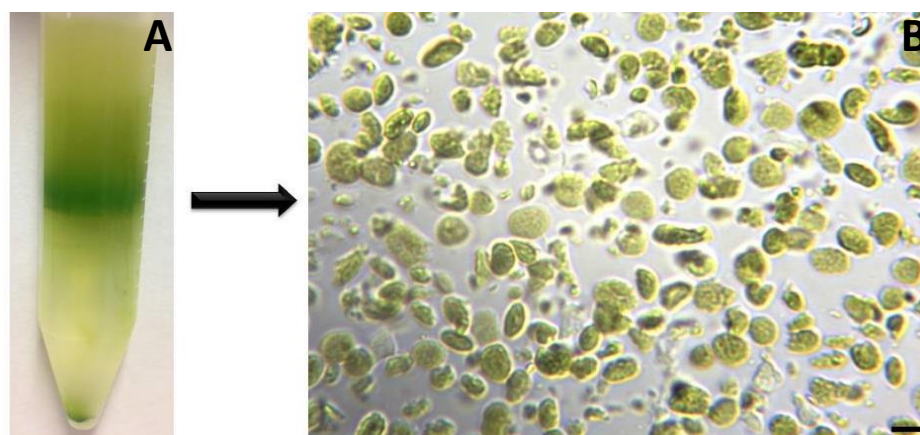


Figura 1. Isolamento de cloroplastos de folhas de *Eucalyptus urograndis*. **A:** Purificação de cloroplastos utilizando o kit comercial CP-ISO (Sigma-Aldrich) com gradiente de densidade de Percoll 80-40%. **B:**

Microscopia de luz de cloroplastos com aumento de 100x. Barra = 10 μm .

Os géis de poliacrilamida carregados com 25 μg de proteínas cloroplastidiais resultaram em alto grau de reprodutibilidade entre as repetições biológicas do mesmo tratamento (Figura 2).

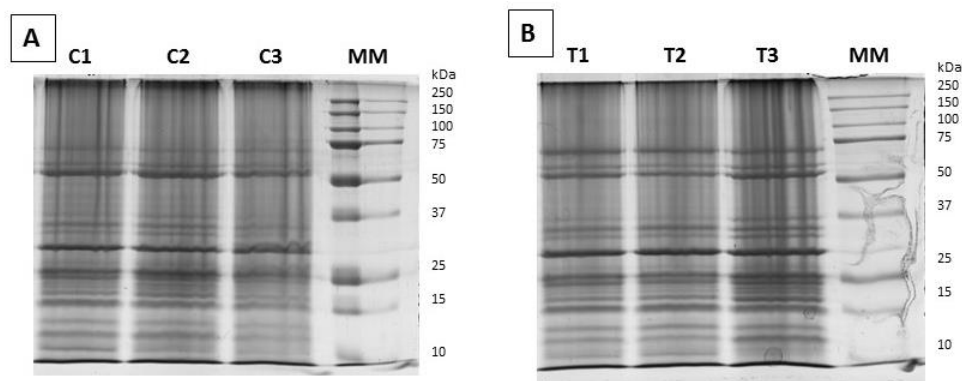


Figura 2. Géis de poliacrilamida a 12% contendo 25 μg de proteínas cloroplastidiais. **A:** Plantas controle cultivadas em 400 ppm e CO_2 , C: repetições biológicas 1 - 3, MM = marcador molecular; **B:** Plantas tratadas, T = tratamento repetições 1, 2 e 3, MM = marcador molecular.

Um dos principais passos em experimentos de proteômica subcelular é a avaliação da qualidade e da pureza das amostras protéicas isoladas. Contaminantes protéicos ou restos celulares indesejados podem levar a atribuições errôneas de proteínas para a organela estudada, bem como erros de quantificação. A fim de investigar o enriquecimento das amostras cloroplastidiais e confirmar os resultados já descritos no capítulo anterior, todas as proteínas identificadas no presente experimento foram submetidas a uma análise *in silico*, utilizando preditores de localização subcelular e bancos de dados de proteômica. Esta abordagem indicou que das 816 proteínas identificadas, 648 (80%) foram designadas como plastidiais por pelo menos uma das ferramentas utilizadas (Figura 3).

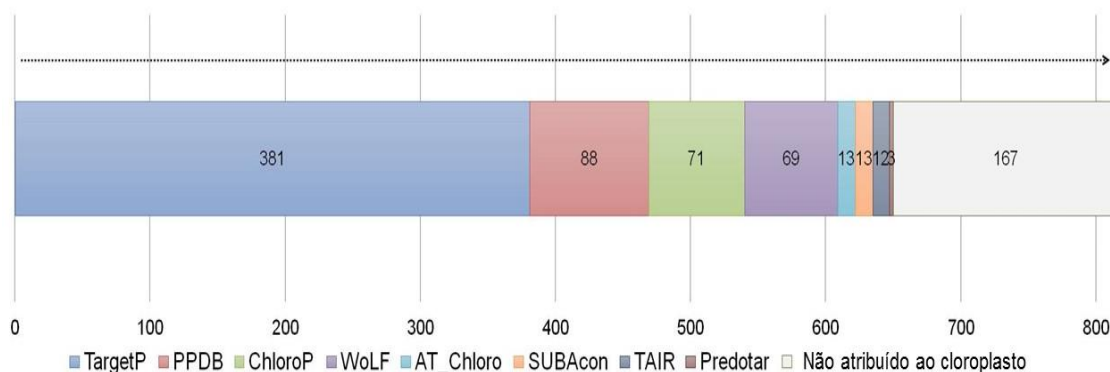


Figura 3. Número de proteínas plastidiais de *Eucalyptus urograndis* identificadas por espectrometria de massas e corroboradas por preditores de localização subcelular *in silico* e bancos de dados especializados.

Observou-se também que 168 proteínas não foram atribuídas a plastídios. Suas identificações após o procedimento de isolamento dos cloroplastos podem ser o resultado de interações inespecíficas das mesmas com plastídios durante a etapa de purificação, ocorrência bastante comum em estudos de proteomas plastidiais (DEMARTINI et al., 2011). Alternativamente, esse resultado pode indicar a existência de novas proteínas localizadas em cloroplastos cujas funções ainda são desconhecidas nesta organela. De forma análoga ao descrito no capítulo anterior, o grau de enriquecimento do proteoma cloroplastidial também foi avaliado através da abundância, representada pelo NSAF, das proteínas “Germin” e “Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase” subunidades pequenas (Figura 4). A proteína RuBisCO é muito utilizada como controle positivo em estudos de proteômica cloroplastidial (WANG et al., 2013). Enquanto proteínas “Germin” são membros da superfamília cupin, localizadas na parede celular de células vegetais (HAM et al., 2012; KISHI-KABOSHI et al., 2014), portanto podem ser utilizadas como controle negativo do grau de enriquecimento do proteoma plastidial. A enzima RuBisCO mostrou-se mais abundante nos proteomas plastidiais em relação à sua quantidade no extrato foliar, confirmando o alto grau de enriquecimento do procedimento aqui adotado. Além disso, e como obtido no experimento descrito no capítulo anterior, o procedimento de isolamento cloroplastidial aumentou a reprodutibilidade da medida de abundância dessa enzima em relação àquelas observadas para os extratos foliares totais (Figura 4). A proteína “Germin”, selecionada com controle negativo, apresentou-se mais abundante no

proteoma foliar, presentes nas três repetições biológicas, e pouco abundante no proteoma plastidial do tratamento com 1000 ppm de CO₂. Além disso, essa proteína estava ausente nas três repetições biológicas do tratamento com 400 ppm de CO₂.

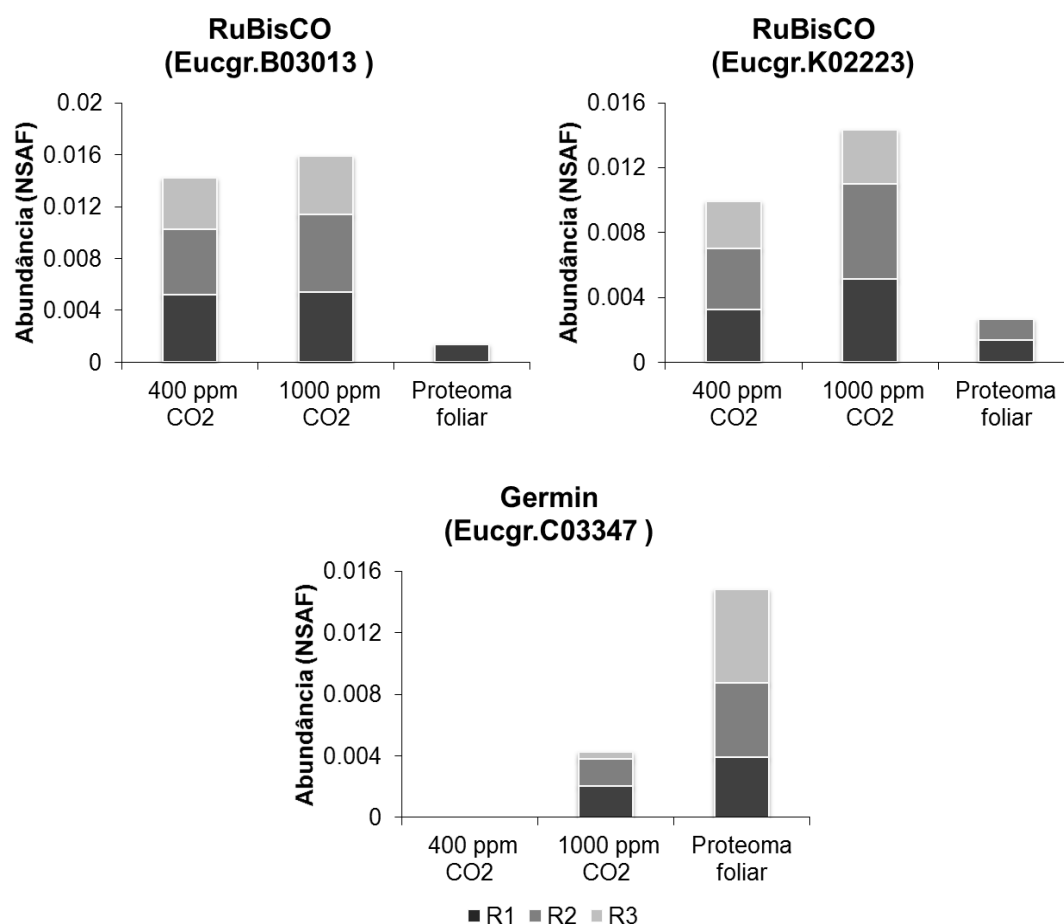


Figura 4. Avaliação da pureza do proteoma cloroplastidial obtido de folhas jovens de *Eucalyptus urograndis*. **R1 - R3**: repetições biológicas 1-3.

O intervalo de variação dinâmica do proteoma de *E. urograndis*, obtido após a normalização por NSAF e transformação em \log_{10} , apresentou aproximadamente quatro ordens de magnitude, revelando uma distribuição típica em forma de S (Figura 5). Esta ampla variação dinâmica significa que para cada cópia da proteína menos abundante detectada, mais de 4,5 mil cópias da proteína mais abundante foram detectadas.

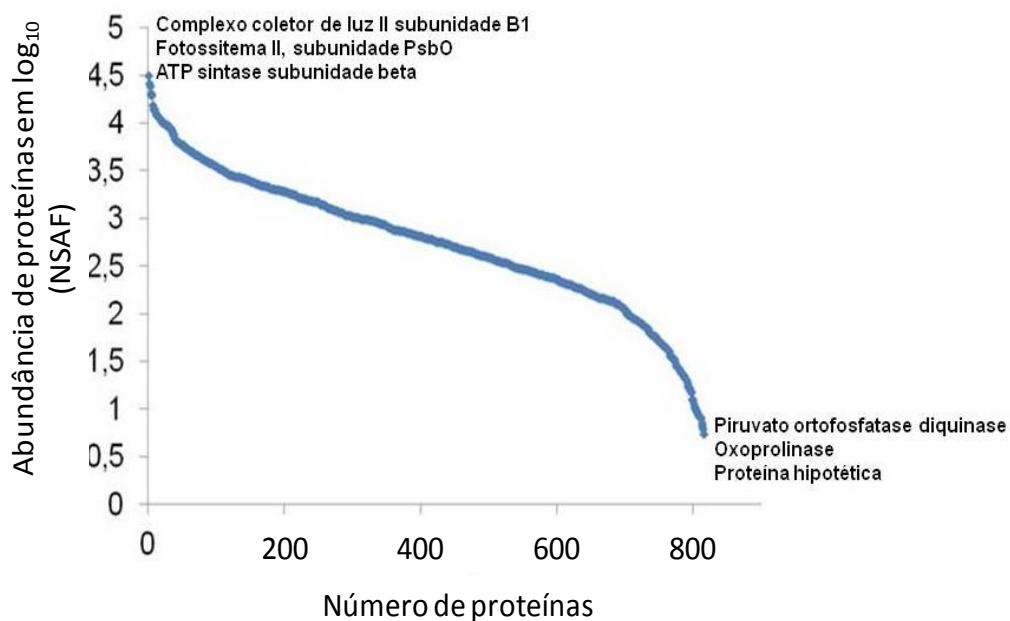


Figura 5. Variação dinâmica do proteoma cloroplastidial isolado de folhas de *Eucalyptus urograndis*.

A proteína mais abundante detectada no presente estudo foi a subunidade B1 do complexo coletor de luz do fotossistema II (Eucgr.E02381.1). A maioria dos fótons que são convertidos em energia bioquímica e biomassa através da fotossíntese são coletados pelo principal complexo antena, localizado próximo ao fotossistema II, e suas proteínas estão entre as mais abundantes no planeta Terra. As proteínas deste complexo são sintetizadas no citosol, pós-traducionalmente importadas para o cloroplasto e inseridas nas membranas tilacóide (PIETRZYKOWSKA et al., 2014). As 11 proteínas mais abundantes identificadas neste estudo compreendem subunidades do fotossistema I e II, complexo coletor de luz, ATP sintase e RuBisCO; enquanto a proteína menos abundante identificada foi uma proteína hipotética (Eucgr.H02751.1), seguida por oxoprolinase e uma piruvato ortofosfato diquinase.

3.2 Proteínas envolvidas no estresse oxidativo estão entre aquelas diferencialmente reguladas frente ao estímulo de CO₂

Visando uma análise geral da resposta do proteoma cloroplastidial ao estímulo de enriquecimento de CO₂, foram determinadas as proteínas diferencialmente reguladas, utilizando o critério de "fold-change" mínimo de 1,5 vezes e $p < 0,05$ de acordo com o teste T de Student. Foram identificadas 12 proteínas com aumento significativo de sua abundância e quatro proteínas que apresentaram redução após o cultivo das plantas em atmosfera enriquecida por CO₂ (Figura 6).

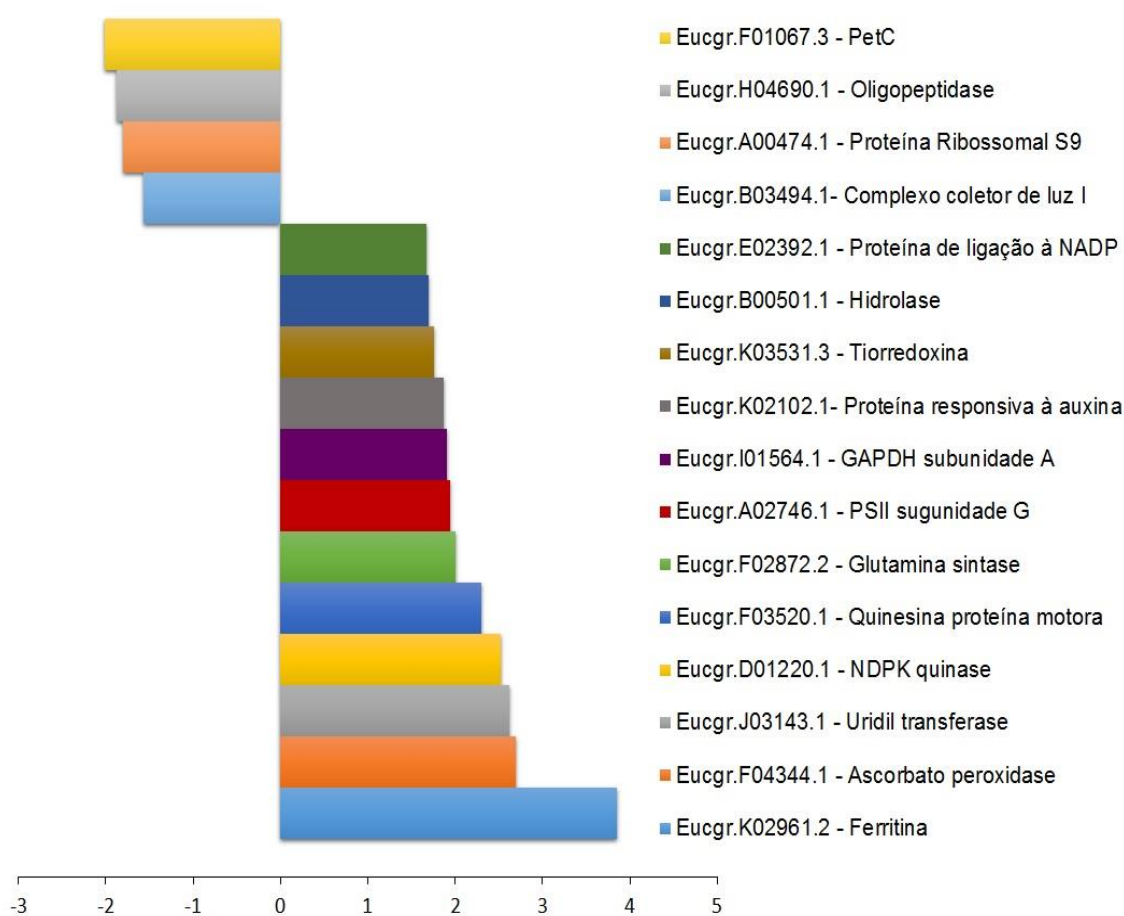


Figura 6. Proteínas diferencialmente reguladas no proteoma cloroplastidial de plantas jovens de *Eucalyptus urograndis* cultivadas em atmosfera enriquecida com 1000 ppm de CO₂ em relação à condição controle de 400 ppm de CO₂.

Dentre as proteínas diferencialmente reguladas, três delas estão relacionadas com o estresse oxidativo: ferritina (Eucgr.K02961.2), ascorbato peroxidase (Eucgr.F04344.1) e tiorredoxina (Eucgr.K03531.3). As duas primeiras identificações são as enzimas do proteoma cloroplastidial que

apresentaram o maior aumento de abundância, com "fold-change" de 3,8 e 2,7, respectivamente, quando as plantas jovens de *E. urograndis* foram cultivadas em atmosfera enriquecida com gás carbônico; enquanto a proteína tiorredoxina aumentou 1,7 vezes quando comparada com a abundância registrada nas plantas cultivadas em atmosfera comum (400 ppm). Ferritinas são proteínas multiméricas, localizadas em ambos cloroplastos e mitocôndrias, que armazenam ferro em sua cavidade central (BRIAT et al., 2010). Ao remover o ferro do ambiente elas evitam que íons livres gerem espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo assim as células contra o estresse oxidativo (RAVET et al., 2009). O acúmulo de ferritina nos cloroplastos pode ser induzido por EROs quando o ferro livre é libertado a partir do aparato fotossintético durante a senescência (BUCHANAN-WOLLASTON & AINSWORTH, 1997) ou após danos causados por luz intensa (MURGIA et al., 2001). Em plantas de tabaco, foi relatado que o acúmulo desta proteína nos cloroplastos forneceu proteção contra a fotoinibição induzida por baixas temperaturas (HEGEDUS et al., 2008).

Ascorbato peroxidase (APX) é uma enzima que reduz o peróxido de hidrogênio à água, utilizando ascorbato como um doador de elétrons (ASADA, 1999). Esta enzima pode proteger a maquinaria fotoquímica contra danos fotooxidativos e fotoinibição por consumir o excesso de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (KANGASJARVI et al., 2008). Um dos genes que codificam a APX apresentou aumento de expressão em condições de estresse por salinidade e seca em *Phaseolus vulgaris*, indicando um papel fundamental nos mecanismos de regulação moleculares induzidos por estes tipos de estresses abióticos (NAGESHBABU & JYOTHI, 2013). A alta concentração de cádmio também resultou em um aumento na atividade da ascorbato peroxidase em plantas jovens de milho (XU et al., 2014). Resultados sugerem que o aumento da atividade APX nos cloroplastos de plantas de tabaco transformadas conferiu maior tolerância à salinidade, aumentando a capacidade de eliminação de EROs (LIU et al., 2013).

A regulação redox é muitas vezes majoritariamente mediada por tiorredoxinas (TRXs), que são capazes de ativar/desativar enzimas através da redução reversível de ligações dissulfureto. As TRXs cloroplastidiais estão

envolvidas na regulação dependente de luz de enzimas relacionadas a várias reações metabólicas. Muitas enzimas localizadas no cloroplasto são inativas no escuro por causa de seu estado oxidado. Na presença de luz, ligações dissulfureto destas enzimas são reduzidas por TRXs, conduzindo à ativação enzimática (BUCHANAN & BALMER, 2005). Diversos estudos relataram aumento da expressão de genes que codificam tiorredoxinas cloroplastidiais quando as plantas foram submetidas a estresse salino (BAISAKH et al., 2008; CHEN et al., 2012; UZILDAY et al., 2015).

O aumento na abundância destas três enzimas é um forte indicativo de que o enriquecimento de CO₂ induziu estresse oxidativo em *E. urograndis*, e conseqüentemente estas plantas aumentaram a abundância de enzimas relacionadas com a eliminação de EROs para reduzir possíveis danos, principalmente protegendo os fotossistemas.

3.3 O proteoma fotossintético de *E. urograndis* é responsivo ao estímulo por CO₂

3.3.1 Proteínas da membrana tilacóide

As análises de espectrometria de massas acopladas às busas restritivas contra o banco de dados do genoma de *E. grandis* traduzido resultaram na identificação de proteínas envolvidas nas reações dependentes de luz nos cloroplastos e das enzimas do ciclo de Calvin-Benson (Figura 7). Um total de 31 proteínas envolvidas com reações luminosas foram identificadas no presente estudo, representando 21 diferentes subunidades dos quatro componentes da membrana tilacóide: fotossistema II (PSII), complexo citocromo b₆f (cyt b₆f), fotossistema I (PSI) e ATP sintase. Uma modificação discreta, porém, significativa, na abundância de cinco proteínas da cadeia de transporte de elétrons foi identificada em plantas cultivadas com 1000 ppm de CO₂ quando comparadas com plantas cultivadas em atmosfera com 400 ppm de CO₂ (Figura 8A). Dentre estas proteínas, apenas a subunidade PsbS do PS II apresentou aumento em sua abundância; enquanto que uma proteína do cyt b₆f, a subunidade PetC, e três proteínas do PSI, as subunidades PsaE, PsaF e PsaN, apresentaram redução em sua abundância.

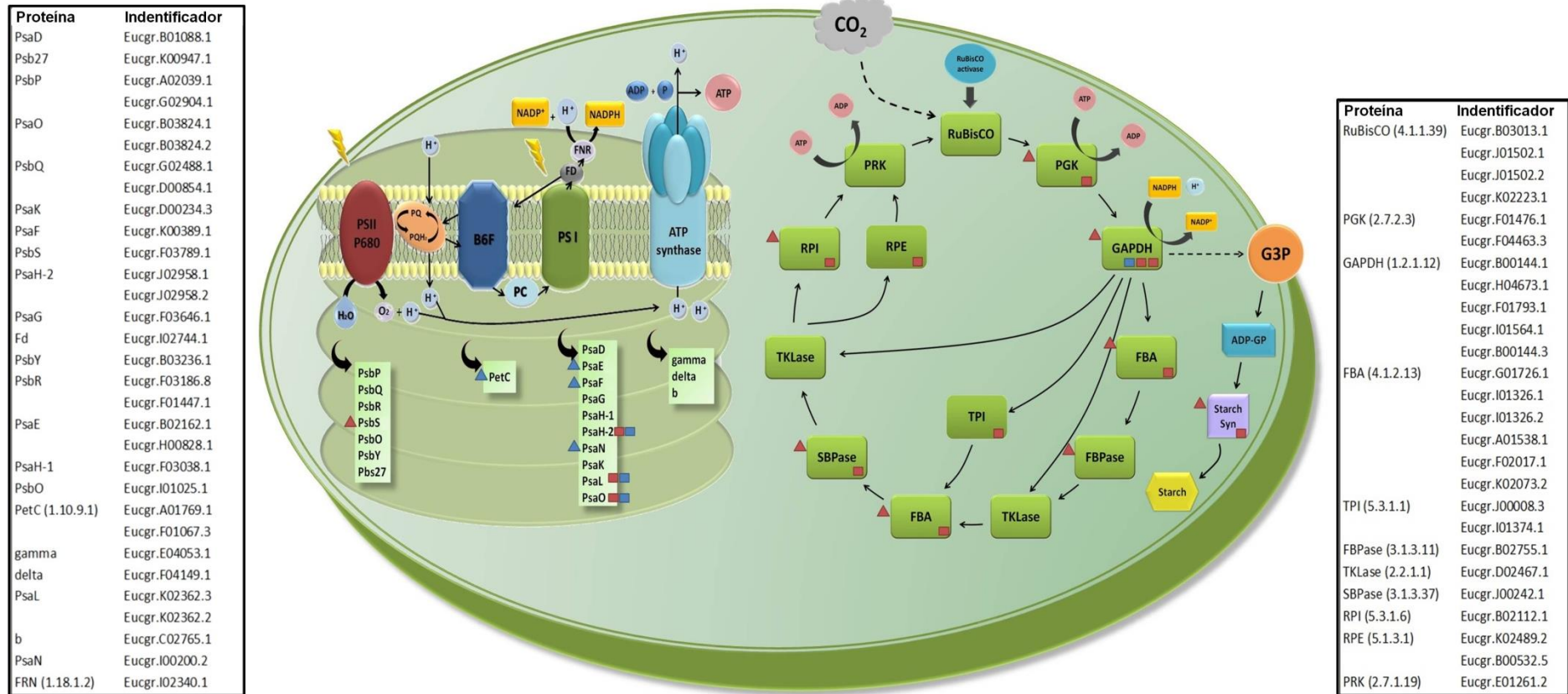


Figura 7. Representação esquemática da fixação de carbono e cadeia de transporte de elétrons em folhas de *Eucalyptus urograndis* cultivado em atmosfera enriquecida com CO₂. Triângulos azuis representam proteínas reprimidas e triângulos vermelhos representam proteínas induzidas após cultivo em atmosfera contendo 1000 ppm de CO₂ (de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Quadrados azuis representam as isoformas de proteínas identificadas apenas no controle (400 ppm) e quadrados vermelhos representam isoformas de proteínas identificadas apenas no tratamento (1000 ppm).

A subunidade PsbS do PS II não está diretamente relacionada com o mecanismo de fluxo de elétrons, mas sim com a proteção do fotossistema contra danos oxidativos através do “quenching” dependente de energia (DEMMIG-ADAMS, 1992; APEL & HIRT, 2004; LI et al., 2002), sendo assim, sugere-se que o aumento na abundância desta proteína pode estar relacionado ao estresse oxidativo em *E. urograndis*, imposto devido ao crescimento sob elevada concentração de CO₂. Por outro lado, a subunidade PetC, também conhecida como proteína ferro-enxofre de Rieske, é um elemento chave no mecanismo de transporte de elétrons, uma vez que transfere elétrons a partir plastoquinona para a plastocianina, acompanhada de libertação de prótons para dentro do lúmen. A oxidação da plastoquinona através do citocromo b₆f é um passo limitante para a taxa de transporte de elétrons na fotossíntese em plantas superiores (KRAMER et al., 1999). Em *Lycopersicon esculentum*, uma redução na abundância da proteína PetC resultou na limitação da capacidade das plantas de sintetizar ATP e realizar a fotossíntese (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2014). A identificação de uma redução na abundância desta proteína em cloroplastos de *E. urograndis* sugere que o crescimento sob alta concentração de CO₂ pode afetar o mecanismo fotossintético de transporte de elétrons nesta espécie.

Corroborando com esta hipótese, as proteínas PsaE, PSAF e PsaN, subunidades do PS I, também foram identificadas com abundância reduzida nas plantas de *E. urograndis* submetidas a elevada concentração de CO₂. PsaE é uma proteína do fotossistema I que canaliza os elétrons provenientes da subunidade PsaD para resto da cadeia de transporte de elétrons (BUSCH & HIPPLER, 2011), enquanto que a subunidade PsaF é um elemento essencial na transferência de elétrons dentro do centro de reação do fotossistema, uma vez que está envolvida na ligação específica entre o doador de elétrons luminal, a plastocianina, e o PSI (HIPPLER et al., 1989). A proteína PsaN é uma subunidade pequena e extrínseca do PSI. Ela é sintetizada com uma pré-sequência dirigindo-a para o lúmen e é a única subunidade localizada exclusivamente no lado luminal do PSI. Esta proteína está envolvida no ancoramento com a plastocianina. As plantas com ausência desta subunidade luminal são prejudicadas na interação entre a plastocianina e

fotossistema I, resultando na diminuição da capacidade de redução de NADP^+ (HALDRUP et al., 1999; SCHELLER et al., 2001).

É importante ressaltar que foi detectada a expressão preferencial de algumas isoformas de subunidades do fotossistema I, que estão indicadas com um quadrado vermelho/azul quadrado na Figura 7. Quando as plantas de *E. urograndis* foram submetidas a atmosfera enriquecida com CO_2 , as isoformas das proteínas PSAH-2 (Eucgr.J02958.2), PsaL (Eucgr.K02362.2) e PsaO (Eucgr.B03824.2) foram identificados nas três repetições biológicas, enquanto que nas plantas de controle, observamos as isoformas PSAH-2 (Eucgr.J02958.1), pSAL (Eucgr.K02362.3) e PsaO (Eucgr.B03824.1). As proteínas PsaH, PsaL e PsaO são subunidades do fotossistema I localizadas próximas umas das outras (JENSEN et al., 2007). Plantas com redução na expressão da proteína PsaL retêm apenas cerca de 10-20% das subunidades PsaH e PsaO (JENSEN et al., 2004). Esta informação explica a expressão preferencial das três isoformas ao mesmo tempo em *E. urograndis*, que estão todas envolvidas na formação de um domínio no PSI responsável pela interação com o complexo coletor de luz II (JENSEN et al., 2004). Um estudo recente sugeriu que as subunidades PsaH e PsaL podem também desempenhar um papel na aclimatação do fotossistema à condições de estresse, provavelmente, através da regulação da interação de LHCII com PSI-LHCI, funcionando como local de ancoramento (SEOK et al., 2014).

3.3.2 Proteínas do estroma cloroplastidial

A extração e a solubilização de proteínas de membrana ainda são um grande desafio para a proteômica, portanto, a identificação de 31 proteínas da cadeia de transporte de elétrons é um resultado importante, uma vez que nenhum procedimento específico foi adotado para o isolamento destas proteínas membranares. No entanto, é interessante notar que estes dados representam apenas uma fração da identificação e da abundância destes complexos protéicos. Uma abordagem experimental dedicada ainda é necessária para investigar mais profundamente as alterações nas enzimas localizadas nos tilacóides. Por outro lado, as proteínas envolvidas no ciclo de Calvin-Benson estão localizadas no estroma dos

cloroplastos. Com o isolamento e a ruptura eficaz destas organelas, as proteínas envolvidas na fixação de carbono são facilmente solubilizadas e disponibilizadas para quantificação por espectrometria de massa. No presente trabalho, todas as onze enzimas do ciclo de Calvin-Benson foram identificadas, e um aumento na abundância de seis enzimas foi observado (Figura 7 e 8B): fosfoglicerato quinase (PGK) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), envolvidas na fase de redução do ciclo, frutose-bisfosfato-aldolase (FBA), frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase), sedoeptulose-1,7-bisfosfatase (FBPase) e ribose-5-fosfato isomerase (RPI), que estão envolvidos na fase de regeneração do aceptor de carbono RuBP.

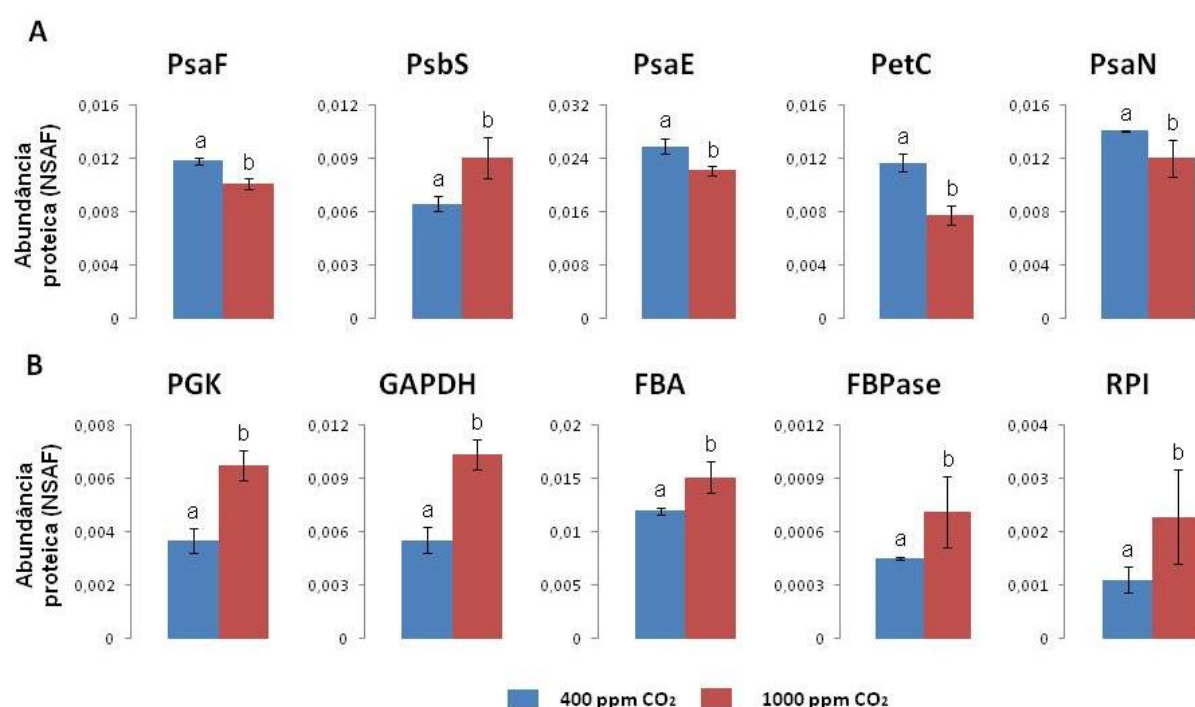


Figura 8. Proteínas fotossintéticas apresentando expressão diferencial. **A:** Cadeia de transporte de elétrons. **B:** Ciclo de Calvin-Benson. Valores representam a média de três repetições biológicas \pm erro padrão.

A PGK é uma enzima envolvida na transferência reversível do fosfato do ATP para o 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato, enquanto GAPDH é uma enzima chave para catalisar a conversão de 1,3-bisfosfoglicerato para gliceraldeído-3-fosfato (G3P) através da utilização de ATP e NADPH. Como a GAPDH pode ter um papel metabólico duplo, agindo como um removedor de excesso de NADPH para proteger PS II contra danos oxidativos, ou como elemento de sumidouro de carbono, dirigindo a assimilação de CO₂ para a síntese de sacarose e amido, a regulação de

GAPDH é crucial para o balanço global do processo fotossintético (WANG et al., 2013; CHANG et al., 2015).

No presente trabalho, foi identificada a enzima amido sintetase (Eucgr.E01068.1) apenas em plantas cultivadas sob atmosfera enriquecida com CO₂, em todas as três repetições biológicas, o que sugere maior acúmulo de amido nas mesmas. A indução da biossíntese de amido é uma estratégia comum em plantas submetidas a estresse, tais como frio (PENG et al., 2015), salinidade (SREE et al., 2015) e acúmulo de metais pesados (HIGUCHI et al., 2015). No entanto, a função precisa do maior acúmulo de amido sob alta concentração de CO₂ ainda não foi esclarecida.

A enzima FBA está envolvida na fase de regeneração do ciclo de Calvin, catalisando a conversão reversível de di-hidroxiacetona fosfato e G3P, para formar frutose-1,6-bisfosfato e eritrose-4-fosfato; e di-hidroxiacetona-fosfato para formar sedoheptulose -1,7-bisfosfato. Foi demonstrado anteriormente que esta enzima tem um grande impacto no fluxo de carbono e que a aclimação da fotossíntese às mudanças das condições ambientais (regimes de luz e CO₂) exige mudanças na atividade desta aldolase plastidial (HAAKE et al., 1998; HAAKE et al., 1999). Em *Nicotiana tabacum*, a elevada atividade da FBA plastidial acelerou a regeneração de RuBP e resultou no aumento da capacidade fotossintética, taxa de crescimento e produção de biomassa (UEMATSU et al., 2012). A enzima FBPase cloroplastidial cataliza a conversão de frutose-1,6-bisfosfato para frutose-6-fosfato. Trata-se de uma proteína limitante no ciclo, envolvida com a regeneração de RuBP e com a via de síntese de amido. Plantas mutantes de *A. thaliana* que não possuem o gene desta enzima plastidial apresentaram deficiências celulares e crescimento reduzido (ROJAS-GONZÁLEZ et al., 2015). A superexpressão de uma enzima FBPase/SBPase de cianobactérias em plantas resultou no aumento da produção de biomassa em *Nicotiana tabacum* (MIYAGAWA et al., 2001) e alface (ICHIKAWA et al., 2010). O aumento da abundância das enzimas FBA e FBPase em plantas de *E. urograndis* cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ sugere a maior taxa de regeneração do aceptor de carbono, o que possibilita maior assimilação de CO₂ atmosférico.

A enzima SBPase (Eucgr.J00242.1), também envolvida com a fase de regeneração do ciclo de Calvin-Benson, foi identificada somente quando as plantas de *E. urograndis* foram submetidos a atmosfera enriquecida com gás carbônico. Sendo assim, esta é a enzima que apresentou o maior aumento em sua abundância frente ao estímulo com CO₂. A fotossíntese tem demonstrado ser sensível a alterações nos níveis SBPase (HARRISON et al., 1998; RAINES et al., 2000; OCLER et al., 2001). Além disso, a capacidade de regeneração RuBP respondeu linearmente a reduções na atividade SBPase, levando a uma redução no acúmulo total de biomassa em plantas SBPase anti-senso (HARRISON et al., 2001). O aumento da atividade desta enzima em plantas transgênicas de tabaco estimulou a fotossíntese e o crescimento na fase inicial do desenvolvimento (LEFEBVRE et al., 2005). A identificação de um aumento na abundância de SBPase em plantas de *E. urograndis* cultivadas sob alta concentração de CO₂ é um bom indicador de uma maior assimilação de carbono nesta condição ambiental.

Finalmente, a enzima ribose-5-fosfato isomerase cataliza a interconversão de ribose-5-fosfato e ribulose-5-fosfato. Em um estudo realizado com cloroplastos de espinafre submetidos a um potencial osmótico reduzido, esta enzima apresentou atividade reduzida, o que contribuiu para redução de fixação de CO₂, devido à redução na regeneração do aceptor de carbono (PLAUT, 1971). Não foram encontrados estudos que comprovem os efeitos do aumento de sua abundância na fotossíntese, sendo este o primeiro estudo a reportar este fato.

Isoformas de algumas enzimas do ciclo de Calvin-Benson (Figura 4, quadrados vermelhos) foram preferencialmente expressas no tratamento com alta concentração de CO₂. Tais identificações podem ser interessantes do ponto de vista genético, uma vez que são possíveis alvos de programas de melhoramento de plantas. São elas PGK (Eucgr.F04463.3), GAPDH (Eucgr.B00144.1 e Eucgr.H04673.1), FBA (Eucgr.K02073.2), TPI (Eucgr.J00008.3), RPE (Eucgr.K02489.2) e RPI (Eucgr.H04380.1).

3.4 Plantas jovens de *E. urograndis* não apresentaram alteração no sistema de captação de energia luminosa frente ao estímulo de CO₂

A eficiência quântica potencial (F_V/F_M) do fotossistema II, aferida por uso do fluorímetro OS-30p (Opti-Sciences), não apresentou diferença significativa entre plantas cultivadas em atmosfera controle (400 ppm) e enriquecida (1000 ppm) com CO₂ (Figura 9A). Esse resultado indica que o tratamento não causou alterações na captação e conversão da energia luminosa nas plantas de *E. urograndis*. A clorofila total medida através do equipamento ClorofiLOG, modelo CFL 1030, também não diferiu estatisticamente entre plantas submetidas às diferentes condições (Figura 9B).

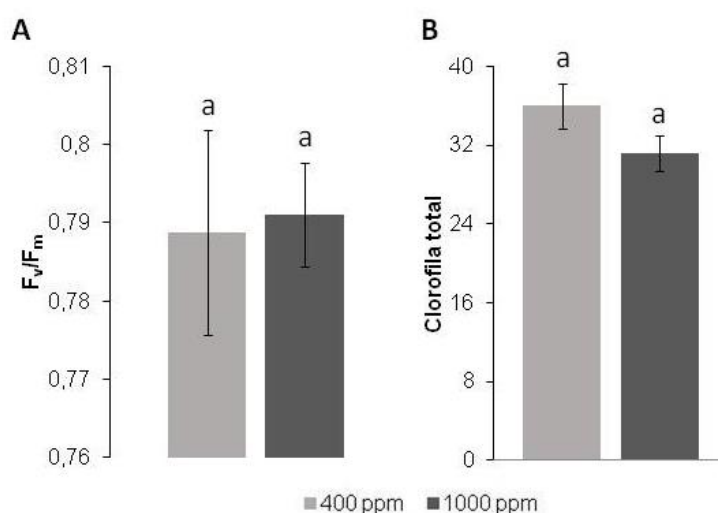


Figura 9. Avaliação fotossintética. **A:** Eficiência máxima potencial do fotossistema II, (F_V/F_M). **B:** Clorofila total. Valores representam a média de cinco repetições biológicas \pm erro padrão.

A avaliação fotossintética pelo parâmetro F_V/F_M é considerado o mais confiável para avaliar a eficiência do PS II, uma vez que qualquer alteração ambiental pode resultar em inibição da atividade fotoquímica e consequente alteração desse parâmetro (KRAUSE & WEIS 1991; LI et al., 2008). O aumento de F_V/F_M é costumeiramente observado em plantas cultivadas em ambiente enriquecido com gás carbônico (SEKHAR et al., 2014; MADHANA et al., 2015; SREEHARSHA et

al., 2015). Contudo, e de forma semelhante ao observado no presente trabalho, Hao e colaboradores não identificaram mudanças significativas nesta variável em *Isatis indigotica* cultivada em atmosfera enriquecida com CO₂ ao ar livre (HAO et al., 2013).

Neste trabalho foi identificado um aumento na abundância de enzimas-chave no ciclo de Calvin-Benson, indicando maior assimilação de carbono nas plantas de *E. urograndis* cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂. Entretanto, como F_V/F_M não foi alterado, é provável que capacidade da cadeia de transporte de elétrons de fornecer ATP e NADPH não seja o fator limitante da fotossíntese nesta condição ambiental, e sim a capacidade das enzimas de regenerar o aceptor de carbono RuBP.

3.5 O cultivo de plantas de *E. urograndis* sob alta concentração de CO₂ causa alterações na anatomia foliar

Após verificar o aumento da expressão de enzimas-chave no ciclo de Calvin-Benson, indicando a ocorrência de maior assimilação de carbono em atmosfera enriquecida com CO₂, fez-se necessário investigar possíveis alterações anatômicas nas folhas de *E. urograndis*, uma vez que elas constituem a principal interface ativa entre o ambiente atmosférico e a planta. Além disso, elas apresentam alta plasticidade frente a estímulos ambientais. Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as folhas jovens de *E. urograndis* apresentaram diferenças significativas quanto ao número de estômatos abertos e grau de abertura dos mesmos (Figura 10A). As plantas cultivadas em atmosfera enriquecida com 1000 ppm de CO₂ apresentaram menor número de estômatos abertos e largura do poro estomático reduzida (Figuras 10B e C). Este tipo de resposta estomática já foi reportado para outras plantas cultivadas em atmosfera com alta concentração de CO₂ (DRAKE et al., 1997; VAVASSEUR & RAGHAVENDRA, 2005; KIM et al., 2010; CHATER et al., 2015).

Essa alteração nos estômatos costumeiramente resulta em diminuição da condutância estomática, o que é um mecanismo adaptativo para conservar a água, porém, mantendo a fotossíntese em níveis elevados devido a alta concentração de

CO₂, como observado por SEKHAR et al. (2014). Sabe-se que a resposta estomática à elevada concentração de CO₂ exige a geração de EROs em células guarda (SHI et al., 2015), uma alteração metabólica comum em plantas submetidas a estresse ambiental. Em neste estudo, a enzima ascorbato peroxidase (Eucgr.F04344.1) apresentou aumento de 2,6 vezes em sua abundância em *E. urograndis* cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂, o que é um forte indicador de que estas plantas estão sofrendo estresse oxidativo, corroborando as identificações de regulação diferencial de enzimas envolvidas em estresse oxidativo já discutidas anteriormente.

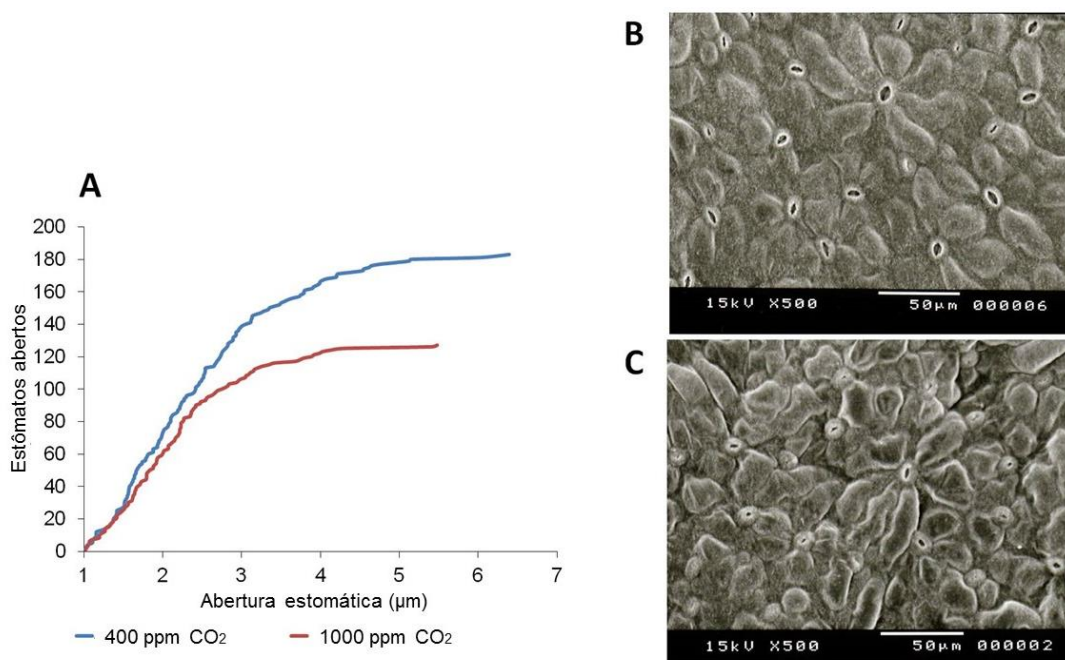


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de folhas de *Eucalyptus urograndis*. **A:** Número de estômatos abertos *versus* abertura estomática. Estômatos foram considerados abertos quando o poro > 1 μm. **B:** Fotomicrografia de folha (tratamento de 400 ppm de CO₂); **C:** Fotomicrografia de folha (tratamento com elevada concentração de CO₂, em 1000 ppm).

Embora haja pouco conhecimento sobre os componentes moleculares envolvidos nas vias de sinalização intracelular pelas quais a concentração de CO₂ controla o desenvolvimento dos estômatos e sua função, os experimentos aqui apresentados indicam que, mesmo após um longo período de cultivo (70 dias), as plantas de *E. urograndis* tratadas com 1000 ppm de este gás mantiveram o fechamento estomático em resposta ao estímulo ambiental.

A fim de obter mais informações sobre outras mudanças estruturais induzidas pelo crescimento sob alta concentração de CO_2 , foi investigada a anatomia foliar de plantas de *E. urograndis* cultivadas em ambos os tratamentos através de microscopia de luz (Figura 11). Constatou-se uma redução significativa do comprimento e da largura de feixes vasculares de plantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO_2 , sugerindo um crescimento reduzido dentro desta região quando as plantas foram mantidas sob estímulo de 1000 ppm de CO_2 .

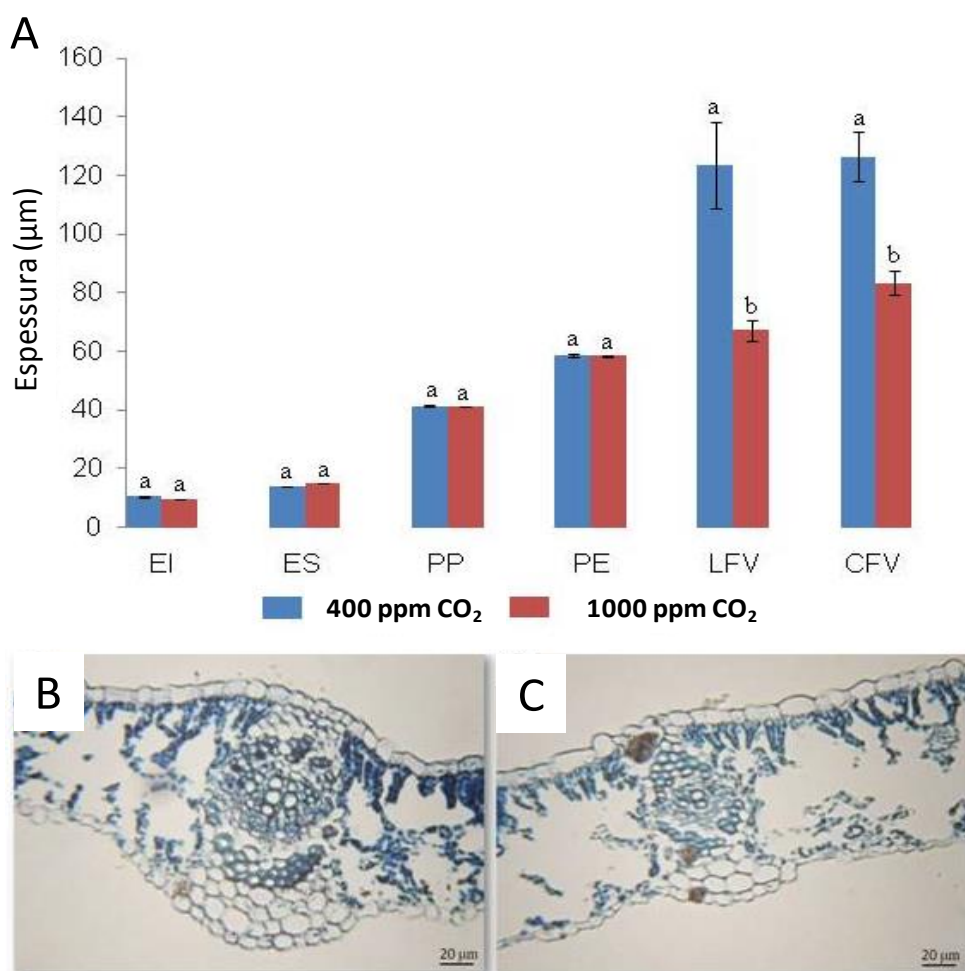


Figura 11. Efeito da alta concentração de CO_2 em características anatômicas foliares de *Eucalyptus urograndis*. **A:** Anatomia foliar. EI = epiderme inferior; ES = epiderme superior; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima esponjoso; LFV = largura do feixe vascular; CFV = comprimento do feixe vascular. Valores correspondem a média de quatro repetições biológicas \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos com $p < 0,05$. **B:** Fotomicrografia de folha (tratamento de 400 ppm de CO_2); **C:** Fotomicrografia de folha (tratamento com elevada concentração de CO_2 , em 1000 ppm).

Os dados do presente estudo se opõem aos obtidos em algumas espécies de *Pinus*, onde um aumento na área de tecido vascular foi relatado em folhas de *P. taeda* (THOMAS & HARVEY, 1983), *P. radiata* (CONROY et al., 1986) e *P. Ponderosa* (PUSHNIK et al., 1995) cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂. No entanto, na espécie *Pinus palustris*, observou-se uma tendência de redução na área de floema foliar (PRITCHARD et al., 1997); enquanto em *Populus*, nenhum efeito sobre os parênquimas paliçádico e esponjoso foi detectado (RADOGLU & JARVIS, 1990). Estas divergências quanto às alterações histológicas foliares impostas pelo crescimento em elevada concentração de CO₂ dificultam afirmações gerais. No entanto, é evidente que o estímulo de 1000 ppm de CO₂ induziu a redução do crescimento do tecido vascular foliar de *E. urograndis*, resposta esta que pode estar relacionada ao direcionamento do carbono assimilado pela fotossíntese para o acúmulo de amido, o que pode ser verificado na Figura 6 pelo aumento da abundância da enzima amido sintetase (Eucgr.E01068.1).

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi apresentada a primeira caracterização do proteoma cloroplastidial e mudanças ultraestruturais foliares de plantas jovens de *E. urograndis* expostas a uma atmosfera enriquecida com CO₂. Dentre as proteínas diferencialmente reguladas que apresentaram aumento significativo em sua abundância, três delas estão relacionadas com a eliminação de EROs. Esse resultado sugere que o enriquecimento de CO₂ induziu estresse oxidativo em *E. urograndis*. O discreto, porém significativo aumento na abundância de enzimas-chave no ciclo de Calvin-Benson indica uma maior assimilação de carbono atmosférico nestas plantas e que a enzima SPBase (Eucgr.J00242.1) pode ser considerada um ponto de controle para a fixação de carbono nas folhas de *E. urograndis*. A redução do crescimento de feixes vasculares em folhas jovens e o fechamento estomático observado também são indicadores de respostas fenotípicas da espécie e corroboram com a hipótese de que plantas jovens de *E. urograndis* respondem ao estímulo de CO₂ atmosférico.

5. REFERÊNCIAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p.373 – 399, 2004.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, v. 50, p. 601 – 639, 1999.

ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; BALL, M. C. Does soil nitrogen influence growth, water transport and survival of snow gum (*Eucalyptus pauciflora* Sieber ex Sprengel.) under CO₂ enrichment? **Plant Cell Environment**, v. 32, p. 553 – 566, 2009.

ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; WHITEHEAD, D. Sapwood development in *Pinus radiata* trees grown for three years at ambient and elevated carbon dioxide partial pressures. **Tree Physiology**, v. 23, p. 13 – 21, 2003.

BAISAKH, N.; SUBUDHI, P. K.; VARADWAJ, P. Primary response to salt stress in a halophyte, smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel.). **Functional and Integrative Genomics**, v. 8, p. 287 – 300, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p. 248–254, 1976.

BRIAT, J. F.; DUC, C.; RAVET, K.; GAYMARD F. Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica & Biophysica Acta**, v.1800, p. 806 – 814, 2010.

BUCHANAN, B. B.; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 187 – 220, 2005.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; AINSWORTH, C. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 821 – 834, 1997.

BUSCH, A.; HIPPLER, M. The structure and function of eukaryotic photosystem I. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 1807, p. 864–77, 2011.

CHANG, L.; GUO, A.; JIN, X.; YANG, Q.; WANG, D.; SUN, Y.; WANG, X. The beta subunit of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is an important factor for

maintaining photosynthesis and plant development under salt stress — Based on an integrative analysis of the structural, physiological and proteomic changes in chloroplast. **Plant Science**, v. 236, p. 223 – 238, 2015.

CHATER, C.; PENG, K.; MOVAHEDI, M.; DUNN, J. A.; WALKER, H. J.; LIANG, Y. K.; HETHERINGTON, A. M. Elevated CO₂-Induced Responses in Stomata Require ABA and ABA Signaling. **Current Biology**, v. 25, n. 20, p. 2709- 2716, 2015.

CHEN, J.; CHENG, T.; WANG, P.; Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 5226 – 5243, 2012.

CONROY, J.; BARLOW, E. W. R.; BEVEGE, D. I. Response of *Pinus radiata* seedlings to carbon dioxide enrichment at different levels of water and phosphorus: growth, morphology and anatomy. **Annals of Botany**, v. 57, p. 165 - 177, 1986.

CROUS, K. Y.; WALTERS, M. B.; ELLSWORTH, D. S. Elevated CO₂ concentration affects leaf photosynthesis–nitrogen relationships in *Pinus taeda* over nine years in FACE. **Tree Physiology**, v. 28, p.607 – 614, 2008.

DEMARTINI, D. R.; JAIN, R.; AGRAWAL, G.; THELEN, J. J. Proteomic comparison of plastids from developing embryos and leaves of *Brassica napus*. *Journal of Proteome Research*, v. 10, n. 5, p. 2226–2237, 2011.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Plant Molecular Biology**, v.43, p. 599 – 626, 1992.

DRAKE, B. G.; GONZALEZ-MELER, M. A.; LONG, S. P. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p. 609 – 639, 1997.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030, **Porto Alegre**, 2008. 4p.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 1178–1186, 2012.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; CAMPOS, A.; AZEVEDO, J.; NEVES, J.; FREITAS, M.; GUZMÁN-GUILLÉN, R.; VASCONCELOS, V. Exposure of *Lycopersicon esculentum*

to microcystin-LR: Effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. **Toxins**, v. 6, p.1837 – 1854, 2014.

HAAKE, V.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; ZRENNER, R.; STITT, M. Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. **The Plant Journal**, v. 17, p. 479 – 489, 1999.

HAAKE, V.; ZRENNER, R.; SONNEWALD, U.; STITT, M. A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. **The Plant Journal**, v. 14, p. 147 – 157, 1998.

HALDRUP, A.; NAVER, H.; SCHELLER, H. V. The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. **The Plant Journal**, v. 17, p. 689 – 698, 1999.

HAM, B. K.; LI, G.; KANG, B. H.; ZENG, F.; LUCAS, W. J. Overexpression of *Arabidopsis* plasmodesmata germin-like proteins disrupts root growth and development. **The Plant Cell**, v. 24, p. 3630 - 3648, 2012.

HAO, X.; LI, P.; FENG, Y.; HAN, X.; GAO, J.; LIN, E. Effects of fully open-air [CO₂] elevation on leaf photosynthesis and ultrastructure of *Isatis indigotica*. **PLoS One**, v. 8, p. 60 - 74, 2013.

HARRISON, E. P.; OLCER, H.; LLOYD, J. C.; LONG, S. P.; RAINES, C. A. Small decreases in SBPase cause a linear decline in the apparent RuBP regeneration rate, but do not affect Rubisco carboxylation capacity. **Journal of Experimental Botany**, v. 1, n. 52, p.1779 – 1784, 2001.

HARRISON, E. P.; WILLINGHAM, N. M.; LLOYD, J. C.; RAINES, C. A. Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. **Planta**, v. 204, p.27–36, 1998.

HEGEDUS, A.; JANDA, T.; HORVÁTH, G. V.; DUDITS, D. Accumulation of overproduced ferritin in the chloroplast provides protection against photoinhibition induced by low temperature in tobacco plants., **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1647–1651, 2008.

HIGUCHI, K.; KANAI, M.; TSUCHIYA, M.; ISHII, H.; SHIBUYA, N.; FUJITA, N.; NAKAMURA, Y.; SUZUI, N.; FUJIMAKI, S.; MIWA, E. Common reed accumulates

starch in its stem by metabolic adaptation under Cd stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.138, 2015.

HIPPLER, M.; RATAJCZAK, R.; HAEHNEL, W. Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem-I. **FEBS Letters**, v.250, p.280 – 284, 1989.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, p. 1 – 32, 1950.

ICHIKAWA, Y.; TAMOI, M.; SAKUYAMA, H.; MARUTA, T.; ASHIDA, H.; YOKOTA, A. Generation of transplastomic lettuce with enhanced growth and high yield. **Genetically Modified Crops**, v. 1, p. 322 – 326, 2010.

IPCC - Climate change: the physical science basis. **Cambridge University Press**, p. 2231, 2013.

JENSEN, P. E.; BASSI, R.; BOEKEMA, E. J.; DEKKER, J. P.; JANSSON, S.; LEISTER, D.; SCHELLER, H. V. Structure, function and regulation of plant photosystem I. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 5, p. 335 – 352, 2007.

JENSEN, P. E.; HALDRUP, A.; ZHANG, S.; SCHELLER, H. V. The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 24212–24217, 2004.

JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. **New York: McGraw-Hill Book Company, Inc**, 1940.

KANGASJARVI, S.; LEPISTO, A.; HANNIKAINEN, K.; PIIPPO, M.; LUOMALA, E. M. ARO, E. M. RINTAMAKI, E. Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. **Biochemical Journal**, v. 412, p. 275–285, 2008.

KIM, T. H.; BOHMER, M.; HU, H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J. I. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 561 – 591, 2010.

KIMBALL, B. A. Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 430 prior observations. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 779 – 788, 1983.

KISHI-KABOSHI, M.; MUTO, H.; TAKEDA, A.; MURATA, T. Localization of tobacco **germin-like protein 1 in leaf intercellular space**. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 2 – 9, 2014.

KRAMER, D. M.; SACKSTEDER, C. A.; CRUZ, J. A. How acidic is the lumen? **Photosynthesis Research**, v. 60, p. 151-163, 1999.

KRATSCH, H. A.; WISE, R. R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant Cell Environ**, v. 23, p.337 – 350, 2000.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 42, p. 313 – 349, 1991.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p.680-685, 1970.

LEFEBVRE, S; LAWSON, T.; FRYER, M.; ZAKHLENIUK, O. V.; LLOYD, J. C.; RAINES, C. A. Increased sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. **Plant Physiology**, v. 138, n. 1, p.451 – 460, 2005.

LI, Q. M.; LIU, B. B.; WU, Y.; ZOU, Z. R. Interactive effects of drought stresses and elevated CO₂ concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50. p. 1307–1317, 2008.

LI, X. P.; GILMORE, A. M.; NIYOGI, K. K. Molecular and global time-resolved analysis of a PsbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 33590–33597, 2002.

LIBERLOO, M.; CALFAPIETRA, C.; LUKAC, M.; GODBOLD, D.; LUO, Z. B. Woody biomass production during the second rotation of a bio-energy *Populus* plantation increases in a future high CO₂ world. **Global Change Biology**, v. 12. p. 1094–1106, 2006.

LIU, Z.; BAO, H.; CAI, J.; HAN, J.; ZHOU, L. A novel thylakoid ascorbate peroxidase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance in transgenic tobacco. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 71–185, 2013.

MADHANA, K.; SEKHAR, R.; VENKATA, S. A.; REDDY, R. Differential responses in photosynthesis, growth and biomass yields in two mulberry genotypes grown under

elevated CO₂ atmosphere. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 151, p. 172 – 179, 2015.

MIYAGAWA, Y.; TAMOI, M.; SHIGEOKA, S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 965 – 969. 2001.

MURGIA, I.; BRIAT, J. F.; TARANTINO, D.; SOAVE, C. Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 797–805, 2001.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; VAN DER MERWE, K.; SINGH, P.; VAN JAARVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C.; PETROLI, P.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T. J.; YE, C-Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M.; SAN CLEMENTE, H.; SAIDI, N.; CASSAN-WANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C. A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A. R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSER, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; KULHEIM, C.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JR, G. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J.; VAN DE PEER, I.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 19, p. 356-362, 2014.

NAGESHBABU, R.; JYOTHI, M. N. Profile of small interfering RNAs from French bean *Phaseolus vulgaris* under abiotic stress conditions. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, p. 176–185, 2013.

OGATA, H.; GOTO, S.; SATO, K.; FUJIBUCHI, W.; BONO, H.; KANEHISA, M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 29–34, 1999.

OLCER, H.; LLOYD, J. C.; RAINES, C. A. Photosynthetic capacity is differentially affected by reductions in sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity during leaf development in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, v. 125, p. 982–989, 2001.

PENG, X.; TENG, L.; YAN, X.; ZHAO, M.; SHEN, S. The cold responsive mechanism of the paper mulberry: decreased photosynthesis capacity and increased starch accumulation. **BMC Genomics**, v. 16, p.898, 2015.

PIETRZYKOWSKA, M.; SUORSA, M.; SEMCHONOK, D. A.; TIKKANEN, M.; BOEKEMA, E. J.; ARO, E.; JANSSON, S. The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 1, p. 1–16, 2014.

PLAUT, Z. Inhibition of photosynthetic carbon dioxide fixation in isolated spinach chloroplasts exposed to reduced osmotic potentials. **Plant Physiology**, v. 48, p. 591–595, 1971.

PRITCHARD, S. G.; PETERSON, C. M.; PRIOR, S. A.; ROGERS, H. H. Elevated atmospheric CO₂ differentially affects needle chloroplast ultrastructure and phloem anatomy in *Pinus palustris*: interactions with soil resource availability. **Plant, Cell & Environment**, v. 20, p. 461-471, 1997.

PUSHNIK, J. C.; DEMAREE, R. S.; HOUPIS, J. L. J.; FLORY, W. B.; BAUER, S. M.; ANDERSON, P. D. The effect of elevated carbon dioxide on a Sierra-Nevadan dominant species: *Pinus ponderosa*. **Journal of Biogeography**, v. 22, p. 249-254, 1995.

RADOGLU, K. M.; JARVIS, P. G. Effects of CO₂ enrichment on four poplar clones: growth and leaf anatomy. **Annals of Botany**, v. 65, p. 617-626, 1990.

RAINES, C. A.; HARRISON, E. P.; OLCER, H.; LLOYD, J. C. Investigating the role of the thiol-regulated enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in the control of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 303–308, 2000.

RAVET, K.; TOURAINÉ, B.; BOUCHÉREZ, J.; BRIAT, J. F.; GAYMARD, F.; CELLIER, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 57, p. 400 – 412, 2009.

ROJAS-GONZÁLEZ, J. A.; SOTO-SÚAREZ, M.; GARCÍA-DÍAZ, A.; ROMERO-PUERTAS, M. C. SANDALIO, L. M.; MÉRIDA, A. Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 2673–2689, 2015.

SAKAI, W. S. Staining technique. Department of Botany, **University of Hawaii**, Honolulu v. 5, p. 247-249, 1973.

SCHELLER, H. V.; JENSEN, P. E.; HALDRUP, A.; LUNDE, C.; KNOETZEL, J. Role of subunits in eukaryotic. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1507, p. 41-60, 2001.

SEKHAR, K. M.; RACHAPUDI, V. S.; MUDALKAR, S.; REDDY, A. R. Persistent stimulation of photosynthesis in short rotation coppice mulberry under elevated CO₂ atmosphere. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 137, p. 21 – 30, 2014.

SEOK, M. S.; YOU, Y. N.; PARK, H. J.; LEE, S. S.; AIGEN, F.; LUAN, S.; CHO, H. S. AtFKBP16-1, a chloroplast luminal immunophilin, mediates response to photosynthetic stress by regulating PsaL stability. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 4, p. 620 – 631, 2014.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SHI, K.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; LIU, X.; XIA, X.; YU, J. Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂ -induced stomatal movement in tomato. **New Phytologist**, p. 342–353, 2015.

SHIRAYA, T., KANEKO, K., MITSUI, T. Quantitative Proteomic Analysis of Intact Plastids. Jorin-NOVO, J.V., KOMATSU, S., WECKWERTH, W., WIENKOOP, S. **Plant Proteomics Methods and Protocols Series: Methods in Molecular Biology**, v. 1072, p. 469-480, 2014.

SOUZA AP, GASPAR M, SILVA EA, ULIAN EC, WACLAWOSKY AJ, NISHIYAMA MY, SANTOS RV, TEIXEIRA MM, GLAUCIA M. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell and Environment** 31, 1116-1127, 2008.

SREE, S.; ADELMANN, K.; GARCIA, C.; LAM, E.; APPENROTH, K. J. Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds K. **Planta**, v. 241, p. 1395 – 1404, 2015.

SREEHARSHA, R. V.; SEKHAR, K. M.; REDDY, A. R. Delayed flowering is associated with lack of photosynthetic acclimation in Pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) grown under elevated CO₂. **Plant Science**, v. 231, p. 82–93, 2015.

THOMAS, J. F.; HARVEY, C. H. Leaf anatomy of four species grown under continuous CO₂ enrichment. **Botanical Gazette**, v.144, p.303 – 309, 1983.

TIMPERIO, A. M.; EGIDI, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 391 - 411, 2008.

UEMATSU, K.; SUZUKI, N.; IWAMAE, T.; INUI, M.; YUKAWA, H. Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 3001-3009, 2012.

UZILDAY, B.; OZGUR, R.; SEKMEN, A. H.; YILDIZTUGAY, E.; TURKAN, I. Changes in the alternative electron sinks and antioxidant defence in chloroplasts of the extreme halophyte *Eutrema parvulum* (*Thellungiella parvula*) under salinity. **Annals of Botany**, v. 115, p. 449 – 463, 2015.

VAVASSEUR, A.; RAGHAVENDRA, A. S. Guard cell metabolism and CO₂ sensing. **New Phytologist**, v. 165, p. 665–682, 2005.

WANG, L.; LIANG, W.; XING, J.; TAN, F.; CHEN, Y.; HUANG, L. Dynamics of chloroplast proteome in salt-stressed mangrove *Kandelia candel* (L.) druce, **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 5124 – 5136, 2013.

WANG, X. C.; CHANG, L. L.; WANG, B. C.; WANG, D.; LI, P. H.; WANG, L. M.; YI, X. P.; HUANG, Q. X.; PENG, M.; GUO, A. P. Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 12, p. 2174–2195, 2013.

XU, X.; LIU, C.; ZHAO, X.; LI, R.; DENG, W. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to cadmium in maize seedlings (*Zea mays* L.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p. 618–24, 2014.

ZYBAILOV, B.; MOSLEY, A. L.; SARDIU, M. E.; COLEMAN, M. K.; FLORENS, L.; WASHBURN, M, P. Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2339-2347, 2006.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este é o primeiro estudo sobre o proteoma cloroplastidial de *Eucalyptus urograndis* e de suas alterações frente ao estímulo CO₂. Foi estabelecida uma metodologia de isolamento de cloroplastos a partir de folhas jovens da espécie, a qual pode ser reproduzida e monitorada utilizando-se os parâmetros e abordagens aqui descritos. Os resultados aqui apresentados sugerem que o cultivo de plantas em ambiente com concentração de CO₂ igual a 1000 ppm induz resposta oxidativa e que um discreto, porém significativo, aumento no número de cópias das proteínas envolvidas na fixação de carbono atmosférico pode ser observado em *E. urograndis* quando cultivadas nessas condições. Além disso, a expressão preferencial de isoformas gênicas de enzimas fotossintéticas na condição de elevada concentração de CO₂ pode contribuir para programas de melhoramento genético vegetal que visem o aumento na assimilação de carbono atmosférico e, conseqüentemente, no rendimento de plantas cultivadas.

A relação entre a expressão e atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e o cultivo em atmosfera enriquecida por CO₂ merece estudos mais aprofundados de enzimas-chave e que façam uso de cultivo de plantas em concentrações mais amplas de CO₂. Além disso, sugere-se a confirmação dos resultados de aumento na regulação de proteínas envolvidas na assimilação de carbono atmosférico por uso da estratégia proteômica dirigida e quantificação de metabólitos primários, principalmente de mono e dissacarídeos. Finalmente, as novas identificações cloroplastidiais descritas no Capítulo 3 necessitam de estudos por microscopia confocal ou microscopia imunoeletrônica visando a confirmação da localização subcelular das mesmas.

ANEXO I

Tabela complementar 1. Lista de proteínas identificadas a partir de cloroplastos de *Eucalyptus urograndis*. Plantas jovens foram cultivadas por 70 dias sob as seguintes concentrações de CO₂: 400 ppm e 1000 ppm. Proteínas plastidiais foram isoladas utilizando o kit de isolamento de cloroplastos (CP-ISO Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante com modificações descritas na seção Materiais e Métodos do capítulo 3. Os dados de espectrometria de massas foram adquiridos no instrumento Q-Exactive (Thermo) operado no modo positivo. Os espectros de fragmentação foram continuamente obtidos através do modo DDA ("data dependent acquisition"), selecionando os 10 íons mais abundantes para fragmentação durante 60 minutos de separação cromatográfica. Os dados de expressão de proteínas estão representados pela transformação de contagem espectral de cada proteína em NSAF ("Normalized Spectral Abundance Factor", Zybailov et al., 2006).

ID do transcrito ^a	Descrição funcional ^b	Localização ^c	Varição de abundância ^d
Eucgr.A00010.3	Hypothetical protein	Plastídio	1.359481284
Eucgr.A00018.1	PTAC4,VIPP1 plastid transcriptionally active 4	Plastídio	-1.677310236
Eucgr.A00052.1	IMS1,IPMS2,MAML-3 2-isopropylmalate synthase	Plastídio	1.217609359
Eucgr.A00264.1	photosystem II reaction center protein B	Plastídio	1.064719742
Eucgr.A00348.1	LPD1,ptlpd1 lipoamide dehydrogenase 1	Plastídio	1.32529911
Eucgr.A00474.1	RPS9,TWN3 ribosomal protein S9	Plastídio	1.801448209
Eucgr.A00746.1	ATLTP1,LP1,LTP1 lipid transfer protein 1	Plastídio	1.107429488
Eucgr.A00992.1	ROC4rotamase CYP 4	Plastídio	-1.123595322
Eucgr.A01004.3	AGY1,AtcpSecA Albino or Glassy Yellow 1	Plastídio	-6.535629139
Eucgr.A01047.1	LHCB2,LHCB2.2 photosystem II light harvesting	Plastídio	1.143217592
Eucgr.A01241.1	HTA12 histone H2A 12	Plastídio	1.033145119
Eucgr.A01406.1	30S ribosomal protein, putative	Plastídio	1.317004453
Eucgr.A01423.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily	Plastídio	-1.167645979

Eucgr.A01428.1	ATB5-A,ATCB5-E,B5 2,CB5-Ecytochrome B5	Plastídio	1.539630758
Eucgr.A01555.1	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-1.32096959
Eucgr.A01711.1	emb2394 Ribosomal protein L6 family	Plastídio	1.079680134
Eucgr.A01769.1	PETC,PGR1 photosynthetic electron transfer C	Plastídio	1.395765525
Eucgr.A01774.1	PSB29,THF1photosystem II reaction center PSB29	Plastídio	-1.038396483
Eucgr.A01801.1	POR C,PORCprotochlorophyllide oxidoreductase C	Plastídio	1.192377935
Eucgr.A01929.2	Ribosomal L5P family protein	Plastídio	1.156300862
Eucgr.A01933.1	FTSH2,VAR2FtsH extracellular protease family	Plastídio	1.212095621
Eucgr.A02039.1	OE23,OEE2,PSBP-1,PSII-P photosystem II subunit	Plastídio	1.059926659
Eucgr.A02042.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily	Plastídio	-1.073040338
Eucgr.A02177.1	ACSF,CHL27,CRD1 dicarboxylate diiron protein, putative	Plastídio	1.836181132
Eucgr.A02394.1	ADSSadenylosuccinate synthase	Plastídio	-1.450621924
Eucgr.A02451.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin	Plastídio	-1.181733742
Eucgr.A02519.1	ATRPS5B,RPS5B ribosomal protein 5B	Plastídio	-1.662960591
Eucgr.A02571.1	CP33,PDE322 chloroplast RNA-binding protein 33	Plastídio	1.177722652
Eucgr.A02662.1	SOUL heme-binding family protein	Plastídio	1.096790261
Eucgr.A02746.1	photosystem II reaction center protein G	Plastídio	-1.944408573
Eucgr.A02747.1	NADH dehydrogenase subunit J	Plastídio	-1.154715278
Eucgr.A02878.1	LPA2low psii accumulation2	Plastídio	1.123685489
Eucgr.B00131.1	ADK1adenylate kinase 1	Plastídio	-2.358705343
Eucgr.B00177.1	ATRBP31,ATRBP33,CP31,RBP3131-kDa RNA	Plastídio	-2.630024049
Eucgr.B00189.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	1.460352873
Eucgr.B00193.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase	Plastídio	1.173415077
Eucgr.B00343.3	Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC	Plastídio	-3.097731476
Eucgr.B00357.1	ALDH2,ALDH2A,ALDH2B4aldehyde dehydrogenase 2B4	Plastídio	-3.790202357
Eucgr.B00425.1	Protein of unknown function (DUF1118)	Plastídio	1.15813046
Eucgr.B00501.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-1.692453873
Eucgr.B00511.1	MDH malate dehydrogenase	Plastídio	-1.283618484

Eucgr.B00512.1	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	Plastídio	1.09226567
Eucgr.B00523.1	CAB4,LHCA4light-harvesting chlorophyll-protein complex	Plastídio	1.106465476
Eucgr.B00532.5	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Plastídio	1.6974924
Eucgr.B00604.1	Protein of unknown function (DUF1118)	Plastídio	3.223358253
Eucgr.B00847.1	NAD(P)H dehydrogenase subunit H	Plastídio	1.963321591
Eucgr.B01088.1	PSAD-2photosystem I subunit D-2	Plastídio	1.239054554
Eucgr.B01108.2	ADG2,APL1 ADP glucose pyrophosphorylase large	Plastídio	-1.364635639
Eucgr.B01424.1	ATF2,TRXF2thioredoxin F2	Plastídio	1.739344379
Eucgr.B01600.1	Ribosomal L22e protein family	Plastídio	-1.302139822
Eucgr.B01870.1	Hypothetical protein	Plastídio	-1.386842147
Eucgr.B02112.1	Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein	Plastídio	-2.571757102
Eucgr.B02162.1	PSAE-2photosystem I subunit E-2	Plastídio	1.266248242
Eucgr.B02180.1	AVDE1,NPQ1non-photochemical quenching 1	Plastídio	-1.385542237
Eucgr.B02306.1	PTAC16plastid transcriptionally active 16	Plastídio	-1.046796609
Eucgr.B02310.1	RCA rubisco activase	Plastídio	1.076382293
Eucgr.B02380.3	ALB363 kDa inner membrane family protein	Plastídio	-2.280036359
Eucgr.B02496.1	ATPDI2,ATPDIL1-4,PDI2,PDIL1-4 PDI-like 1-4	Plastídio	1.138984691
Eucgr.B02711.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Plastídio	-1.798781905
Eucgr.B02755.1	HCEF1 high cyclic electron flow 1	Plastídio	-1.99067556
Eucgr.B03013.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family	Plastídio	-1.11909873
Eucgr.B03110.1	,Hsp88.1,HSP90.5Chaperone protein htpG family protein	Plastídio	-3.443293451
Eucgr.B03236.1	PSBY,YCF32photosystem II BY	Plastídio	1.145066309
Eucgr.B03494.1	LHCA2 photosystem I light harvesting complex gene 2	Plastídio	1.572428756
Eucgr.B03593.2	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	Plastídio	1.140290265
Eucgr.B03632.1	EDA3DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily	Plastídio	-1.592938746
Eucgr.B03691.1	SIR sulfite reductase	Plastídio	-1.848455331
Eucgr.B03692.1	Photosystem II 5 kD protein	Plastídio	-1.351088738
Eucgr.B03720.1	AGT,AGT1,SGAT alanine:glyoxylate aminotransferase	Plastídio	-1.082671143

Eucgr.C00416.5	adenylate kinase family protein	Plastídio	1.488348349
Eucgr.C00774.1	ATPRX Q Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-1.528979604
Eucgr.C01104.2	SOUL heme-binding family protein	Plastídio	-1.064444781
Eucgr.C01113.1	ATRAN3,RAN3 RAN GTPase 3	Plastídio	1.883019022
Eucgr.C01174.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.079243579
Eucgr.C01175.1	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	Plastídio	-1.346758476
Eucgr.C01279.1	emb2726 elongation factor Ts family protein	Plastídio	-3.649076114
Eucgr.C02102.1	selenium binding	Plastídio	5.125519434
Eucgr.C02765.1	ATPase, F0 complex, subunit B/B', bacterial/chloroplast	Plastídio	1.128254071
Eucgr.C02909.1	tocopherol cyclase, chloroplast / vitamin E deficient 1	Plastídio	-2.157402823
Eucgr.C03020.1	KH domain-containing protein	Plastídio	-4.140495782
Eucgr.C03047.1	AtGLDP1,GLDP1 glycine decarboxylase P-protein 1	Plastídio	-3.368441987
Eucgr.C03150.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	Plastídio	-1.326775389
Eucgr.C03295.1	ATCPN21,CHCPN10,CPN10,CPN20,CPN21 chaperonin	Plastídio	-1.201843739
Eucgr.C03307.1	LHCA2*1,LHCA6 photosystem I light harvesting complex	Plastídio	1.244490015
Eucgr.C03525.1	ribulose-bisphosphate carboxylases	Plastídio	-1.078733845
Eucgr.C03704.1	Insulinase (Peptidase family M16) protein	Plastídio	2.073432836
Eucgr.C03817.1	PLSP1 plastidic type i signal peptidase 1	Plastídio	-1.261535668
Eucgr.C04044.1	ATTIL,TIL temperature-induced lipocalin	Plastídio	2.346854879
Eucgr.C04082.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	1.208354585
Eucgr.C04235.1	chloroplast thylakoid lumen protein	Plastídio	1.40183531
Eucgr.D00234.3	PSAKphotosystem I subunit K	Plastídio	-1.071416969
Eucgr.D00320.1	AB140,CAB1,CAB140,LHCB1.3 chlorophyll A/B binding	Plastídio	1.29502121
Eucgr.D00321.1	Light-harvesting chlorophyll-protein complex II	Plastídio	1.162677294
Eucgr.D00322.1	LHB1B1,LHCB1.4light-harvesting chlorophyll-protein	Plastídio	1.08534451
Eucgr.D00551.1	CHL I2,CHLI-2,CHLI2 magnesium chelatase i2	Plastídio	2.062273502
Eucgr.D00854.1	PSBQ,PSBQ-2,PSII-Qphotosystem II subunit Q-2	Plastídio	1.024179658
Eucgr.D00973.1	Phosphoglycerate mutase family protein	Plastídio	1.171340387

Eucgr.D01093.1	Ribosomal protein L4/L1 family	Plastídio	1.688232687
Eucgr.D01115.1	Ribosomal protein L3 family protein	Plastídio	-1.053746345
Eucgr.D01220.1	NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	Plastídio	-2.519124633
Eucgr.D01602.6	Dihydrolipoamide succinyltransferase	Plastídio	1.788371255
Eucgr.D01648.1	PRPL11plastid ribosomal protein l11	Plastídio	-2.269825093
Eucgr.D01759.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.070749632
Eucgr.D01888.1	ATOSM34,OSM34 osmotin 34	Plastídio	1.377846167
Eucgr.D01944.1	PGR5-LIKE A PGR5-LIKE A	Plastídio	-1.980253855
Eucgr.D02017.3	Hypothetical protein	Plastídio	1.580512634
Eucgr.D02028.2	Pentapeptide repeat-containing protein	Plastídio	1.20459024
Eucgr.D02094.1	formyltetrahydrofolate deformylase, putative	Plastídio	1.126536415
Eucgr.D02179.2	Single hybrid motif superfamily protein	Plastídio	-2.697804164
Eucgr.D02207.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Plastídio	-1.218425213
Eucgr.D02221.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	1.137821204
Eucgr.D02227.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	-1.311824834
Eucgr.D02319.1	Ribosomal L5P family protein	Plastídio	3.597087132
Eucgr.D02339.2	Hypothetical protein	Plastídio	1.668543036
Eucgr.D02467.1	Transketolase	Plastídio	-1.961252973
Eucgr.D02502.5	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	-1.125344436
Eucgr.D02588.1	ATBBC1,BBC1,RSU2breast basic conserved 1	Plastídio	1.237124122
Eucgr.D02642.2	Hypothetical protein	Plastídio	1.082603172
Eucgr.E00068.1	TROLthylakoid rhodanese-like	Plastídio	1.13509454
Eucgr.E00102.3	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	Plastídio	-4.016051943
Eucgr.E00355.1	LIL3:1Chlorophyll A-B binding family protein	Plastídio	-1.487281375
Eucgr.E00484.1	CLP2,CLPR2,NCLPP2 CLP protease proteolytic subunit 2	Plastídio	-3.659491376
Eucgr.E01024.1	BIP,BIP2Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	Plastídio	-2.418144712
Eucgr.E01113.1	photosynthetic electron transfer A	Plastídio	-1.041917971
Eucgr.E01144.1	CCD4,NCED4nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	Plastídio	1.079204075

Eucgr.E01249.1	Domain of unknown function (DUF1995)	Plastídio	2.313802076
Eucgr.E01261.2	PRK phosphoribulokinase	Plastídio	-1.54371942
Eucgr.E01417.1	Hypothetical protein	Plastídio	4.563578503
Eucgr.E02381.1	LHB1B1,LHCB1.4light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	Plastídio	1.035322512
Eucgr.E02392.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	-1.676173796
Eucgr.E02606.1	photosynthetic electron transfer A	Plastídio	1.07584451
Eucgr.E02608.1	unfolded protein binding	Plastídio	-1.356629506
Eucgr.E02785.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	1.100311564
Eucgr.E03558.1	ribosomal protein S8	Plastídio	1.101484068
Eucgr.E03981.1	FIB fibrillin	Plastídio	-1.237891909
Eucgr.E04053.1	ATPC1 ATPase, F1 complex, gamma subunit protein	Plastídio	1.019841026
Eucgr.E04322.1	ATFKBP13,FKBP13 FK506-binding protein 13	Plastídio	-1.101525152
Eucgr.F00763.1	endoribonuclease L-PSP family protein	Plastídio	1.023269397
Eucgr.F01001.1	HTA10 histone H2A 10	Plastídio	-1.234659645
Eucgr.F01067.3	PETC,PGR1 photosynthetic electron transfer C	Plastídio	2.015268412
Eucgr.F01077.1	LHCB3,LHCB3*1 light-harvesting chlorophyll B-binding	Plastídio	1.122496176
Eucgr.F01089.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-1.138732304
Eucgr.F01098.1	PORAprtochlorophyllide oxidoreductase A	Plastídio	1.166323108
Eucgr.F01206.1	FTSH5,VAR1FtsH extracellular protease family	Plastídio	1.23771832
Eucgr.F01219.1	cobalt ion binding	Plastídio	9.92861957
Eucgr.F01365.2	emb1473 Ribosomal protein L13 family protein	Plastídio	1.304188656
Eucgr.F01413.2	Aldolase-type TIM barrel family protein	Plastídio	-1.050972228
Eucgr.F01447.1	PSBRphotosystem II subunit R	Plastídio	1.138882875
Eucgr.F01476.1	Phosphoglycerate kinase family protein	Plastídio	-1.249641953
Eucgr.F01627.1	Histone superfamily protein	Plastídio	-1.391135419
Eucgr.F01793.1	GAPBglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	Plastídio	-1.445166506
Eucgr.F01878.1	emb2184 Ribosomal protein L31	Plastídio	-1.918312151

Eucgr.F01880.1	OTC ornithine carbamoyltransferase	Plastídio	1.189011423
Eucgr.F01883.2	GAMMA CA1 gamma carbonic anhydrase 1	Plastídio	1.784893759
Eucgr.F01893.1	Hypothetical protein	Plastídio	2.736687724
Eucgr.F02016.1	ATSUFE,CPSUFE,EMB1374,SUFE1 chloroplast sulfur E	Plastídio	-1.262766992
Eucgr.F02017.1	Aldolase superfamily protein	Plastídio	1.061865826
Eucgr.F02457.1	FLU Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	Plastídio	1.15717005
Eucgr.F02481.1	APE1acclimation of photosynthesis toenvironment	Plastídio	1.144407533
Eucgr.F02506.1	MAB1Transketolase family protein	Plastídio	4.548371707
Eucgr.F02626.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Plastídio	-1.584779547
Eucgr.F02729.1	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	2.367619504
Eucgr.F02754.1	ATHM2 Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-1.242865196
Eucgr.F02872.2	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1glutamine synthase	Plastídio	-1.998813939
Eucgr.F02916.1	ATP synthase subunit beta	Plastídio	1.35933916
Eucgr.F02968.1	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	Plastídio	-1.007626076
Eucgr.F02973.1	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	Plastídio	-1.649557683
Eucgr.F03012.1	MFP1MAR binding filament-like protein 1	Plastídio	-1.375208404
Eucgr.F03038.1	PSAH-1photosystem I subunit H-1	Plastídio	1.193703651
Eucgr.F03039.1	CS17,PRPS17,RPS17 ribosomal protein S17	Plastídio	-1.380341419
Eucgr.F03055.2	NDF4NDH-dependent cyclic electron flow 1	Plastídio	1.324956583
Eucgr.F03173.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	1.78132325
Eucgr.F03186.8	PSBRphotosystem II subunit R	Plastídio	1.250723231
Eucgr.F03245.1	photosystem II reaction center protein H	Plastídio	1.129225557
Eucgr.F03251.1	mMDH1 Lactate/malate dehydrogenase family protein	Plastídio	-1.581791434
Eucgr.F03445.1	CHL chloroplastic lipocalin	Plastídio	1.241616335
Eucgr.F03520.1	Kinesin motor family protein	Plastídio	-2.30262627
Eucgr.F03557.1	CAT2catalase 2	Plastídio	-1.252675804
Eucgr.F03646.1	PSAGphotosystem I subunit G	Plastídio	1.223206858
Eucgr.F03703.1	ATGSTF5,ATGSTF8,GST6,GSTF8glutathione S-transferase	Plastídio	-2.191414165

Eucgr.F03707.1	ATCDSP32,CDSP32 chloroplastic drought-induced stress	Plastídio	1.328277233
Eucgr.F03789.1	NPQ4,PSBS Chlorophyll A-B binding family protein	Plastídio	-1.403274037
Eucgr.F03852.1	NDH-M subunit NDH-M of NAD(P)H:plastoquinone	Plastídio	1.050012538
Eucgr.F03862.2	PLD,PLDALPHA1 phospholipase D alpha 1	Plastídio	-4.497561066
Eucgr.F03965.2	LPA3LowPSII Accumulation 3	Plastídio	1.574211909
Eucgr.F04018.1	Ribosomal protein L30/L7 family protein	Plastídio	1.7572401
Eucgr.F04099.1	LHCB5 light harvesting complex of photosystem II 5	Plastídio	1.162790765
Eucgr.F04149.1	ATPDATP synthase delta-subunit gene	Plastídio	-1.116415869
Eucgr.F04195.1	Peroxidase superfamily protein	Plastídio	2.025365733
Eucgr.F04198.1	Peroxidase superfamily protein	Plastídio	1.809632102
Eucgr.F04344.1	TAPXthylakoidal ascorbate peroxidase	Plastídio	-2.693425892
Eucgr.F04417.1	ATGER3,GER3,GLP3,GLP3A,GLP3Bgermin 3	Plastídio	-1.083712682
Eucgr.G00478.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	1.412597028
Eucgr.G00777.1	CP24,LHCB6light harvesting complex photosystem II	Plastídio	-1.004685089
Eucgr.G00991.2	atylmg3,CCB3,YLMG3cofactor assembly, complex C (B6F)	Plastídio	1.586724468
Eucgr.G01726.1	FBA2fructose-bisphosphate aldolase 2	Plastídio	-1.242624217
Eucgr.G01834.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	1.20760964
Eucgr.G01934.1	CCL CCR-like	Plastídio	1.216274918
Eucgr.G01947.1	Rho termination factor	Plastídio	-1.430721901
Eucgr.G01979.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-1.055667961
Eucgr.G02043.1	CHLMmagnesium-protoporphyrin IX methyltransferase	Plastídio	1.021841231
Eucgr.G02317.1	RPL15 ribosomal protein L15	Plastídio	1.33349681
Eucgr.G02332.1	LTA2,PLE2 2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase	Plastídio	2.324447433
Eucgr.G02347.1	STN7STT7 homolog STN7	Plastídio	-1.230439957
Eucgr.G02488.1	PQL1,PQL2 PsbQ-like 2	Plastídio	1.668214132
Eucgr.G02521.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Plastídio	1.43958201
Eucgr.G02539.1	ATWHY1,PTAC1,WHY1 ssDNA-binding transcriptional	Plastídio	-1.07880052
Eucgr.G02593.1	DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family	Plastídio	2.154518171

Eucgr.G02804.1	ATPQATP synthase D chain,	Plastídio	1.209210661
Eucgr.G02904.1	PPL1PsbP-like protein 1	Plastídio	-1.013367967
Eucgr.G02907.2	PPL2PsbP-like protein 2	Plastídio	-1.122614066
Eucgr.G02956.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Plastídio	-1.177741022
Eucgr.G03042.1	Ribosomal protein L10 family protein	Plastídio	3.017510616
Eucgr.G03060.1	LHCB4.3 light harvesting complex photosystem II	Plastídio	-1.082195215
Eucgr.G03331.1	Protein of unknown function (DUF3411)	Plastídio	-1.61924167
Eucgr.G03333.2	Ribosomal protein L1p/L10e family	Plastídio	1.307864577
Eucgr.G03390.1	-like photosystem II reaction center PsbP family protein	Plastídio	1.071010984
Eucgr.H00078.2	MPPBETA Insulinase (Peptidase family M16) protein	Plastídio	-1.808562828
Eucgr.H00112.1	coenzyme F420 hydrogenase family / dehydrogenase,	Plastídio	1.126003436
Eucgr.H00144.2	FIB4Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family p	Plastídio	-1.322751875
Eucgr.H00663.2	Hypothetical protein	Plastídio	-1.14270205
Eucgr.H00828.1	PSAE-2photosystem I subunit E-2	Plastídio	-1.055145329
Eucgr.H00878.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.235719352
Eucgr.H01180.1	Ribosomal protein S7p/S5e family protein	Plastídio	-1.342515567
Eucgr.H01287.4	Photosystem II reaction center PsbP family protein	Plastídio	1.311403029
Eucgr.H01473.3	AtcpRRF,cpRRF,HFP108,RRFribosome recycling factor,	Plastídio	-1.227030657
Eucgr.H01479.1	CSP41Achloroplast stem-loop binding protein of41 kDa	Plastídio	1.21412104
Eucgr.H01629.1	ATF2,TRXF2thioredoxin F2	Plastídio	1.093521707
Eucgr.H01941.1	HCF164Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	1.699176333
Eucgr.H02333.1	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-1.2734321
Eucgr.H02489.1	Photosystem II reaction center PsbP family protein	Plastídio	-1.044782429
Eucgr.H02625.1	PDE226,PDS,PDS3 phytoene desaturase 3	Plastídio	1.281333659
Eucgr.H02679.1	SHM4serine hydroxymethyltransferase 4	Plastídio	-1.015206622
Eucgr.H02772.1	emb2444 RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family	Plastídio	6.053971573
Eucgr.H02963.1	PGR5proton gradient regulation 5	Plastídio	1.305345306
Eucgr.H02991.1	ATPase, F0 complex, subunit B/B', bacterial/chloroplast	Plastídio	1.070866274

Eucgr.H03302.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	Plastídio	1.059324638
Eucgr.H03409.1	ATP synthase subunit beta	Plastídio	-1.148961268
Eucgr.H03771.1	PCB2NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	1.462812746
Eucgr.H04084.1	ARRPS1,RPS1 ribosomal protein S1	Plastídio	1.296169394
Eucgr.H04210.2	Hypothetical protein	Plastídio	-1.061327508
Eucgr.H04427.1	EMB3004,MEE32 dehydroquininate dehydratase, putative	Plastídio	6.792988637
Eucgr.H04456.1	TLP18.3 thylakoid lumen 18.3 kDa protein	Plastídio	-1.052682968
Eucgr.H04606.1	ATCYP20-2,CYP20-2 cyclophilin 20-2	Plastídio	1.050831535
Eucgr.H04662.1	PLAT/LH2 domain-containing lipoxygenase family protein	Plastídio	-2.221884087
Eucgr.H04690.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.875356406
Eucgr.H05051.1	ATFC-II,FC-II,FC2 ferrocyclase 2	Plastídio	-1.121684302
Eucgr.I00053.1	KH domain-containing protein	Plastídio	1.04488669
Eucgr.I00200.2	PSANphotosystem I reaction center subunit PSI-N	Plastídio	1.170022127
Eucgr.I00205.1	NDH-O NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex	Plastídio	-1.120627138
Eucgr.I00240.1	ACT7actin 7	Plastídio	1.074479871
Eucgr.I00323.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.181891194
Eucgr.I00381.3	FKBP16-2FK506-binding protein 16-2	Plastídio	-3.418051263
Eucgr.I00441.1	Ribosomal L29 family protein	Plastídio	-1.240796915
Eucgr.I00554.2	Hypothetical protein	Plastídio	1.323307888
Eucgr.I00580.2	SHM1,SHMT1,STMserine transhydroxymethyltransferase	Plastídio	1.079677701
Eucgr.I00922.1	NPQ2,ZEPzeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)	Plastídio	-2.812818697
Eucgr.I01025.1	OEC33,PSBO-2,PSBO2photosystem II subunit O-2	Plastídio	1.064017813
Eucgr.I01073.1	CLPR1,NCLPP5,SVR2 CLP protease proteolytic subunit 1	Plastídio	-1.043433615
Eucgr.I01326.1	FBA2fructose-bisphosphate aldolase 2	Plastídio	-1.211686469
Eucgr.I01326.2	FBA1fructose-bisphosphate aldolase 1	Plastídio	-1.249195346
Eucgr.I01374.1	PDTPI,TIM triosephosphate isomerase	Plastídio	1.963272573
Eucgr.I01541.1	Peptidase M20/M25/M40 family protein	Plastídio	3.031011702
Eucgr.I01564.1	GAPA-2glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A	Plastídio	-1.907536972

Eucgr.I01598.1	CCB1cofactor assembly of complex C	Plastídio	1.03899362
Eucgr.I01649.1	Peptidase family M48 family protein	Plastídio	-1.348396043
Eucgr.I01790.1	ATBCA1,ATSABP3,CA1,SABP3carbonic anhydrase 1	Plastídio	-1.481597754
Eucgr.I01792.1	Deg1,DEGP1DegP protease 1	Plastídio	-1.105749004
Eucgr.I01816.1	ATCYP38,CYP38 cyclophilin 38	Plastídio	-1.031599731
Eucgr.I01982.1	APG6,CLPB-P,CLPB3 casein lytic proteinase B3	Plastídio	-1.63105664
Eucgr.I02340.1	ATLFNR1,FNR1ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	Plastídio	1.11432349
Eucgr.I02452.1	SDH1-1succinate dehydrogenase 1-1	Plastídio	1.979274004
Eucgr.I02457.1	Hypothetical protein	Plastídio	-1.718115166
Eucgr.I02677.1	CP24,LHCB6light harvesting complex photosystem II	Plastídio	-1.014941302
Eucgr.I02693.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	Plastídio	1.014275902
Eucgr.I02716.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	1.050615778
Eucgr.I02744.1	ATFD2,FED A 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	Plastídio	-2.160165946
Eucgr.I02771.1	cpHsc70-2,CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70	Plastídio	1.287713011
Eucgr.J00176.1	ATFER4,FER4 ferritin 4	Plastídio	1.539992345
Eucgr.J00234.1	ethylene-dependent gravitropism-deficient	Plastídio	-2.518698356
Eucgr.J00743.1	Y14 RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Plastídio	1.464739738
Eucgr.J00819.1	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2	Plastídio	-2.639829065
Eucgr.J00820.1	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2	Plastídio	-2.858056745
Eucgr.J00865.1	HCF136photosystem II stability/assembly factor	Plastídio	1.206010595
Eucgr.J01096.2	LHCA1 photosystem I light harvesting complex gene 1	Plastídio	-1.18403531
Eucgr.J01165.1	Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)	Plastídio	1.12884106
Eucgr.J01234.1	RCA rubisco activase	Plastídio	1.003385166
Eucgr.J01250.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Plastídio	1.73632153
Eucgr.J01502.1	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family	Plastídio	-1.109218804
Eucgr.J01502.2	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family	Plastídio	-1.18180852
Eucgr.J01621.1	CI76,EMB1467NADH-ubiquinone dehydrogenase,	Plastídio	1.134564737
Eucgr.J01758.1	ZKT protein containing PDZ domain, a K-box domain	Plastídio	-1.107826028

Eucgr.J01939.1	RPL4ribosomal protein L4	Plastídio	2.47926926
Eucgr.J02030.1	RCA rubisco activase	Plastídio	1.025575535
Eucgr.J02030.3	RCA rubisco activase	Plastídio	1.027174008
Eucgr.J02175.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	Plastídio	1.09055613
Eucgr.J02207.3	FDH formate dehydrogenase	Plastídio	1.077952877
Eucgr.J02313.1	Oxidoreductase family	Plastídio	2.178107424
Eucgr.J02605.2	RPSAb 40s ribosomal protein SA B	Plastídio	-2.105808629
Eucgr.J02731.1	ATP synthase epsilon chain	Plastídio	1.162810886
Eucgr.J02738.1	ATP synthase subunit beta	Plastídio	1.191801035
Eucgr.J03072.1	Molecular chaperone Hsp40/DnaJ family protein	Plastídio	1.144945079
Eucgr.J03143.1	uridylyltransferase-related	Plastídio	-2.625010689
Eucgr.K00001.1	PTAC4,VIPP1 plastid transcriptionally active 4	Plastídio	-1.213540994
Eucgr.K00099.1	ENH1rubredoxin family protein	Plastídio	-1.023057747
Eucgr.K00110.6	FSD2Fe superoxide dismutase 2	Plastídio	1.431956397
Eucgr.K00215.2	Hypothetical protein	Plastídio	1.021892729
Eucgr.K00389.1	PSAFphotosystem I subunit F	Plastídio	1.172059625
Eucgr.K00402.3	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Plastídio	-2.339454334
Eucgr.K00410.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily p	Plastídio	-2.20054314
Eucgr.K00558.1	Oxidoreductase family	Plastídio	-1.480138853
Eucgr.K00727.1	GSA1glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase	Plastídio	2.363104968
Eucgr.K00776.1	CYP74B2,HPL1hydroperoxide lyase 1	Plastídio	-3.610887739
Eucgr.K00947.1	PSB27 photosystem II family protein	Plastídio	1.152948732
Eucgr.K01102.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases	Plastídio	-1.268073925
Eucgr.K01256.1	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	Plastídio	1.057929633
Eucgr.K01283.1	ATLTP1,LP1,LTP1 lipid transfer protein 1	Plastídio	1.019573187
Eucgr.K01354.1	ATCPO-I,HEMF1,LIN2Coproporphyrinogen III oxidase	Plastídio	-1.245076646
Eucgr.K01362.1	LHCA3 photosystem I light harvesting complex gene 3	Plastídio	1.108859812
Eucgr.K01372.1	ADG1,APS1 ADP glucose pyrophosphorylase	Plastídio	-1.121738317

Eucgr.K01497.1	NDF2,NDH45NDH-dependent cyclic electron flow 1	Plastídio	-1.354216527
Eucgr.K01549.1	EMB1241 Co-chaperone GrpE family protein	Plastídio	8.91861408
Eucgr.K01620.1	NAD(P)H dehydrogenase subunit H	Plastídio	1.49298667
Eucgr.K01671.1	Photosystem II reaction center PsbP family protein	Plastídio	1.293141895
Eucgr.K01713.1	ATSFGH,SFGH S-formylglutathione hydrolase	Plastídio	-1.427919662
Eucgr.K02032.1	Thioredoxin family protein	Plastídio	1.209113328
Eucgr.K02067.1	photosystem II reaction center protein A	Plastídio	-1.297308138
Eucgr.K02102.1	AIR12 auxin-responsive family protein	Plastídio	-1.868029865
Eucgr.K02190.1	Rubredoxin-like superfamily protein	Plastídio	-2.188222196
Eucgr.K02198.1	CLPC,CLPC1,DCA1,HSP93-V CLPC homologue	Plastídio	-1.282724568
Eucgr.K02215.1	Hypothetical protein	Plastídio	-1.284939585
Eucgr.K02223.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family	Plastídio	-1.440839447
Eucgr.K02266.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	4.703368733
Eucgr.K02308.1	ATBTF3,BTF3 basic transcription factor 3	Plastídio	1.981366123
Eucgr.K02475.1	MDH malate dehydrogenase	Plastídio	-3.504213135
Eucgr.K02487.3	NDF6NDH dependent flow 6	Plastídio	-1.193625951
Eucgr.K02642.1	CaS calcium sensing receptor	Plastídio	1.006968792
Eucgr.K02650.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-1.330686278
Eucgr.K02783.1	OLD5,QS,SUFE3 quinolinate synthase	Plastídio	-1.106748544
Eucgr.K02786.1	ATRAB8D,ATRABE1B,RABE1b RAB GTPase homolog	Plastídio	1.096017893
Eucgr.K02950.4	Tautomerase/MIF superfamily protein	Plastídio	-3.736640137
Eucgr.K02961.2	ATFER1,FER1 ferretin 1	Plastídio	-3.849269289
Eucgr.K02980.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	1.312742855
Eucgr.K02983.1	LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II	Plastídio	1.054530262
Eucgr.K03108.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.191046003
Eucgr.K03340.1	DNAJ heat shock family protein	Plastídio	-2.153282366
Eucgr.L00011.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	1.664107894
Eucgr.L00052.2	ACT domain-containing small subunit of acetolactate	Plastídio	1.889769584

Eucgr.L00742.2	Hypothetical protein	Plastídio	1.5712
Eucgr.L01079.1	Ribosomal L18p/L5e family protein	Plastídio	1.399075385
Eucgr.L01155.1	CRK42 cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase)	Plastídio	-2.823524448
Eucgr.L02349.1	Hypothetical protein	Plastídio	1.341933993
Eucgr.L02773.1	Glycine cleavage T-protein family	Plastídio	1.167752807
Eucgr.L02929.1	FAD-binding Berberine family protein	Plastídio	-1.179035695
Eucgr.A00511.1	Histone superfamily protein	Outro	1.126745487
Eucgr.A00781.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family	Outro	-1.498230194
Eucgr.A01538.1	Aldolase superfamily protein	Outro	-1.091851007
Eucgr.A02714.1	ATSGT1B,EDM1,ETA3,RPR1,SGT1Bphosphatase-related	Outro	5.448041328
Eucgr.B02294.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily	Outro	3.017797908
Eucgr.B02456.4	APX1,ATAPX01,ATAPX1,CS1,MEE6ascorbate peroxidase	Outro	1.250073824
Eucgr.B02588.2	SNRNP-G probable small nuclear ribonucleoprotein G	Outro	-1.23207754
Eucgr.C00370.1	ATTIL,TIL temperature-induced lipocalin	Outro	-1.13113211
Eucgr.C00625.1	KH domain-containing protein	Outro	1.926146157
Eucgr.C02594.2	ALDH11A3aldehyde dehydrogenase 11A3	Outro	1.98177804
Eucgr.C03812.1	TPX1thioredoxin-dependent peroxidase 1	Outro	-1.033260724
Eucgr.D00484.1	XBCP3 xylem bark cysteine peptidase 3	Outro	-6.84153639
Eucgr.D02098.1	Exostosin family protein	Outro	-1.038840957
Eucgr.D02239.1	AT-SRP40,ATRSP35,ATRSP40,RSP35arginine/serine-rich	Outro	1.760533776
Eucgr.E03509.1	WAK2wall-associated kinase 2	Outro	8.555343806
Eucgr.F00368.1	EMB3010,RPS6B Ribosomal protein S6e	Outro	1.893331253
Eucgr.F01151.1	AtENODL2,ENODL2 early nodulin-like protein 2	Outro	1.136844012
Eucgr.F01217.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Outro	-1.025019268
Eucgr.F01428.1	ATGSTU19,GST8,GSTU19glutathione S-transferase TAU	Outro	2.156490269
Eucgr.F01663.1	TUB1tubulin beta-1 chain	Outro	1.278285852
Eucgr.F01776.1	CAT2catalase 2	Outro	-1.301848829
Eucgr.F02012.1	ARC domain-containing disease resistance protein	Outro	-1.145440132

Eucgr.F02033.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Outro	-2.131035404
Eucgr.F04219.1	Hypothetical protein	Outro	-1.90731629
Eucgr.F04398.1	PAA220S proteasome subunit PAA2	Outro	-1.104829247
Eucgr.G01730.1	LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein	Outro	-1.463539558
Eucgr.G02544.1	ATVDAC1,VDAC1 voltage dependent anion channel 1	Outro	-1.667043635
Eucgr.G02807.1	GTP binding Elongation factor Tu family protein	Outro	-2.749922625
Eucgr.G03132.1	ATMSD1,MEE33,MSD1 manganese superoxide dismutase	Outro	5.885334575
Eucgr.H00492.1	Exostosin family protein	Outro	-1.251983983
Eucgr.H00618.1	ATBTF3,BTF3 basic transcription factor 3	Outro	-1.261401084
Eucgr.H00653.1	Protein of unknown function (DUF789)	Outro	2.026914476
Eucgr.H00972.1	AtHsp90-7,AtHsp90.7,HSP90.7,SHD Chaperone protein	Outro	-1.159216525
Eucgr.H02358.5	PMDH1 peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 1	Outro	1.158812164
Eucgr.H02866.1	HSP60,HSP60-3Bheat shock protein 60	Outro	1.049622898
Eucgr.H04314.1	FLK RNA-binding KH domain-containing protein	Outro	-1.556940068
Eucgr.H05045.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance	Outro	1.093316721
Eucgr.I01129.1	ATPAB2,PAB2,PABP2 poly(A) binding protein 2	Outro	-3.064867789
Eucgr.I02018.1	ATVDAC1,VDAC1 voltage dependent anion channel 1	Outro	1.070422498
Eucgr.I02029.1	GR-RBP5 glycine-rich RNA-binding protein 5	Outro	1.715575809
Eucgr.I02239.1	AAE1acyl activating enzyme 1	Outro	1.224804765
Eucgr.I02271.1	ATHCHIB,B-CHI,CHI-B,HCHIB,PR-3,PR3basic chitinase	Outro	-1.092291411
Eucgr.J00624.1	SEC2H2 zinc-finger protein SERRATE (SE)	Outro	-4.537684876
Eucgr.J00854.1	SWAP surp domain-containing protein / ubiquitin	Outro	-1.749023149
Eucgr.J00965.1	APX1,ATAPX01,ATAPX1,CS1,MEE6ascorbate peroxidase	Outro	-2.050054536
Eucgr.J01599.3	HMGAhigh mobility group A	Outro	1.940972003
Eucgr.J02072.1	Hypothetical protein	Outro	1.200218122
Eucgr.J02133.1	ATVDAC1,VDAC1 voltage dependent anion channel 1	Outro	1.179354339
Eucgr.J02737.1	ATP synthase subunit 1	Outro	-1.571695056
Eucgr.K00399.1	ACBP2 acyl-CoA binding protein 2	Outro	1.012826877

Eucgr.K02283.1	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1glutamine synthase	Outro	1.024390382
Eucgr.K02508.2	Ribosomal protein S19e family protein	Outro	1.37025647
Eucgr.K03531.3	ATPDI11,ATPDIL2-1,MEE30,PDI11,UNE5thioredoxin	Outro	-1.758413878
Eucgr.A00378.1	60S acidic ribosomal protein family	Plastídio	-
Eucgr.A00909.1	EDA27,NOP10 nucleolar RNA-binding Nop10p family	Plastídio	-
Eucgr.A01100.2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein	Plastídio	-
Eucgr.A01273.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.A01324.1	CESA4,IRX5,NWS2 cellulose synthase A4	Plastídio	-
Eucgr.A01813.1	ATHM2 Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.A02249.1	FD-GOGAT,GLS1,GLU1,GLUS glutamate synthase 1	Plastídio	-
Eucgr.A02464.1	WCRKC1WCRKC thioredoxin 1	Plastídio	-
Eucgr.A02664.3	FTSZ2-2 Tubulin/FtsZ family protein	Plastídio	-
Eucgr.A02812.2	crr1Dihydrodipicolinate reductase, bacterial/plant	Plastídio	-
Eucgr.B00593.1	GR-RBP3 glycine-rich RNA-binding protein 3	Plastídio	-
Eucgr.B00652.1	UGT89B1 UDP-glucosyl transferase 89B1	Plastídio	-
Eucgr.B01163.1	ATGSL1,GLN2,GS2 glutamine synthetase 2	Plastídio	-
Eucgr.B01425.1	CAC1A chloroplastic acetylcoenzyme A carboxylase 1	Plastídio	-
Eucgr.B01439.2	ATPGLP1,PGLP1 2-phosphoglycolate phosphatase 1	Plastídio	-
Eucgr.B01475.1	APG1,E37,IEP37,VTE3 S-adenosyl-L-methionine	Plastídio	-
Eucgr.B02312.1	MAR1,TOC75-IIItranslocon at the outer envelope	Plastídio	-
Eucgr.B02532.1	CH-CPN60A,CPN60A,SLPchaperonin-60alpha	Plastídio	-
Eucgr.B02608.3	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	-
Eucgr.B02718.1	PYRR,UPPuracil phosphoribosyltransferase	Plastídio	-
Eucgr.B02792.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.B02879.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase	Plastídio	-
Eucgr.B03096.1	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.B03156.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.B03349.1	ALDH2B,ALDH2B7aldehyde dehydrogenase 2B7	Plastídio	-

Eucgr.B03411.2	NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit, putative	Plastídio	-
Eucgr.B03803.1	ATMBD11,MBD11 methyl-CPG-binding domain 11	Plastídio	-
Eucgr.B03824.2	PSAPhotosystem I subunit O	Plastídio	-
Eucgr.C00588.1	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase	Plastídio	-
Eucgr.C02103.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	-
Eucgr.C02177.2	CAC2acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin carboxylase	Plastídio	-
Eucgr.C02535.1	Uncharacterised BCR, YbaB family COG0718	Plastídio	-
Eucgr.C02615.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.C02661.3	TAF5TBP-associated factor 5	Plastídio	-
Eucgr.C02720.1	AAT3,ASP5,ATAAT1aspartate aminotransferase 5	Plastídio	-
Eucgr.C03178.1	Protein of unknown function (DUF1350)	Plastídio	-
Eucgr.C03347.1	ATGER3,GER3,GLP3,GLP3A,GLP3Bgermin 3	Plastídio	-
Eucgr.D00178.2	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.D01515.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-
Eucgr.D02015.3	AtHip1,HIP1 HSP70-interacting protein 1	Plastídio	-
Eucgr.D02274.1	DTA2downstream target of AGL15 2	Plastídio	-
Eucgr.D02591.1	Ankyrin repeat family protein	Plastídio	-
Eucgr.E00194.1	CPFTSY,FRD4 signal recognition particle receptor protein	Plastídio	-
Eucgr.E00293.1	RING/U-box superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.E00356.1	CLPR4 CLP protease R subunit 4	Plastídio	-
Eucgr.E00451.3	APT3adenine phosphoribosyl transferase 3	Plastídio	-
Eucgr.E00872.1	UGE5UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 5	Plastídio	-
Eucgr.E00877.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.E01068.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.E01779.1	Calcium-binding EF-hand family protein	Plastídio	-
Eucgr.E01881.2	IMPL1 myo-inositol monophosphatase like 1	Plastídio	-
Eucgr.E02747.1	GF14 MU,GRF9general regulatory factor 9	Plastídio	-
Eucgr.E03850.3	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	Plastídio	-

Eucgr.F00243.1	SDH5succinate dehydrogenase 5	Plastídio	-
Eucgr.F00373.3	APX4,TL29 ascorbate peroxidase 4	Plastídio	-
Eucgr.F00601.3	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F00627.1	Ribosomal protein S8e family protein	Plastídio	-
Eucgr.F01167.1	chloroplast 30S ribosomal protein S20, putative	Plastídio	-
Eucgr.F01375.4	ATMSRB1,MSRB1 methionine sulfoxide reductase B 1	Plastídio	-
Eucgr.F01987.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases	Plastídio	-
Eucgr.F02133.1	PGI,PGI1phosphoglucose isomerase 1	Plastídio	-
Eucgr.F02551.1	Rubredoxin-like superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F02574.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases	Plastídio	-
Eucgr.F02663.1	Protein kinase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F02710.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	Plastídio	-
Eucgr.F02835.1	pfkB-like carbohydrate kinase family protein	Plastídio	-
Eucgr.F02960.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F03319.1	ATHM4,ATM4,TRX-M4 thioredoxin M-type 4	Plastídio	-
Eucgr.F03433.1	THI1,THI4,TZthiazole biosynthetic enzyme, chloroplast	Plastídio	-
Eucgr.F03639.2	Protein kinase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F03746.2	Ribosomal protein S13/S18 family	Plastídio	-
Eucgr.F03755.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F03922.1	PTAC17plastid transcriptionally active 17	Plastídio	-
Eucgr.F03933.1	ATIMD2,IMD2 isopropylmalate dehydrogenase 2	Plastídio	-
Eucgr.F03988.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F04120.1	N-terminal nucleophile aminohydrolases	Plastídio	-
Eucgr.F04128.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F04463.3	PGK phosphoglycerate kinase	Plastídio	-
Eucgr.G00854.1	DHS23-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate	Plastídio	-
Eucgr.G00874.1	ATGCH,ATRIBA1,GCH,RFD1GTP cyclohydrolase II	Plastídio	-
Eucgr.G01121.1	AtPPa6,PPa6 pyrophosphorylase 6	Plastídio	-

Eucgr.G01124.1	AGD2Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases	Plastídio	-
Eucgr.G01375.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	Plastídio	-
Eucgr.G01465.1	ATPREP2,PREP2 presequence protease 2	Plastídio	-
Eucgr.G02115.3	JAI3,JAZ3,TIFY6Jasmonate-zim-domain protein 3	Plastídio	-
Eucgr.G02224.1	ATP synthase alpha/beta family protein	Plastídio	-
Eucgr.G02462.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.G02464.6	uvrB/uvrC motif-containing protein	Plastídio	-
Eucgr.G02791.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.G03148.1	Protein kinase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.G03205.1	proline-rich family protein	Plastídio	-
Eucgr.H00026.1	GR-RBP4,GRP4glycine-rich RNA-binding protein 4	Plastídio	-
Eucgr.H00073.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.H00128.2	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Plastídio	-
Eucgr.H00243.2	CLPD,ERD1,SAG15 Clp ATPase	Plastídio	-
Eucgr.H00279.1	UGT74F2 UDP-glucosyltransferase 74F2	Plastídio	-
Eucgr.H00307.1	FAB2,SSI2 Plant stearyl-acyl-carrier-protein desaturase	Plastídio	-
Eucgr.H00431.1	Phosphoenolpyruvate carboxylase family protein	Plastídio	-
Eucgr.H00466.1	ATB2NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.H00894.3	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport	Plastídio	-
Eucgr.H01006.1	CLPP5,NCLPP1,NCLPP5 nuclear encoded CLP protease	Plastídio	-
Eucgr.H01158.1	ATTOC159,PPI2,TOC159,TOC160,TOC86 translocon	Plastídio	-
Eucgr.H01162.2	LPA1tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	Plastídio	-
Eucgr.H01172.1	GSTF6 glutathione S-transferase 6	Plastídio	-
Eucgr.H01195.2	APG3Peptide chain release factor 1	Plastídio	-
Eucgr.H01393.1	Isopentenyl pyrophosphate isomerase	Plastídio	-
Eucgr.H01432.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.H01482.3	FZL FZO-like	Plastídio	-
Eucgr.H01681.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-

Eucgr.H02351.2	HSL2HAESA-like 2	Plastídio	-
Eucgr.H02605.2	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	Plastídio	-
Eucgr.H03049.1	F-box family protein	Plastídio	-
Eucgr.H03311.1	CRB,CSP41Bchloroplast RNA binding	Plastídio	-
Eucgr.H03642.1	PPDKpyruvate orthophosphate dikinase	Plastídio	-
Eucgr.H03983.1	MLP423MLP-like protein 423	Plastídio	-
Eucgr.H04380.1	Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein	Plastídio	-
Eucgr.H04384.1	PDE181,SPC1,ZDS zeta-carotene desaturase	Plastídio	-
Eucgr.H04394.1	ACS1,ATCS-B,CPACS1,OASB O-acetylserine (thiol) lyase	Plastídio	-
Eucgr.H04433.1	G-H2AX,GAMMA-H2AX,H2AXB,HTA3gamma histone	Plastídio	-
Eucgr.H04455.1	Photosystem II reaction center PsbP family protein	Plastídio	-
Eucgr.H04551.1	RPL18 ribosomal protein L18	Plastídio	-
Eucgr.H04652.2	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.H04673.1	GAPC-2,GAPC2glyceraldehyde-3-phosphate	Plastídio	-
Eucgr.H04692.1	HSP21 heat shock protein 21	Plastídio	-
Eucgr.H04753.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily	Plastídio	-
Eucgr.H04776.2	PAC120S proteasome alpha subunit C1	Plastídio	-
Eucgr.H04880.1	MGP1copper ion binding;cobalt ion binding;zinc ion	Plastídio	-
Eucgr.H05078.1	NDC1NAD(P)H dehydrogenase C1	Plastídio	-
Eucgr.H05081.4	ALDH3,ALDH3I1 aldehyde dehydrogenase 3I1	Plastídio	-
Eucgr.I00068.1	F-box and associated interaction domains-containing	Plastídio	-
Eucgr.I00724.3	Alpha-helical ferredoxin	Plastídio	-
Eucgr.I00930.1	ACD2,ATRCCR accelerated cell death 2 (ACD2)	Plastídio	-
Eucgr.I01066.1	OXP1oxoprolinase 1	Plastídio	-
Eucgr.I01182.2	oxidoreductases, NAD or NADP as acceptor;copper ion	Plastídio	-
Eucgr.I01237.2	AHB1,ARATH GLB1,ATGLB1,GLB1,HB1,NSHB1	Plastídio	-
Eucgr.I01384.1	Amidase family protein	Plastídio	-
Eucgr.I01408.1	APX3ascorbate peroxidase 3	Plastídio	-

Eucgr.I01423.1	ATHPR1,HPRhydroxypyruvate reductase	Plastídio	-
Eucgr.I01479.1	Chloroplast signal recognition particle component (CAO)	Plastídio	-
Eucgr.I01668.3	Cytochrome C1 family	Plastídio	-
Eucgr.I01987.1	ATP5delta subunit of Mt ATP synthase	Plastídio	-
Eucgr.I02035.3	CRR7chlororespiratory reduction 7	Plastídio	-
Eucgr.I02084.1	ARM repeat superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.I02316.2	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.I02583.1	HSC70-5,MTHSC70-2 HSO70 2	Plastídio	-
Eucgr.I02676.1	Thioesterase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.J00023.3	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1heat shock	Plastídio	-
Eucgr.J00164.3	biotin/lipoyl attachment domain-containing protein	Plastídio	-
Eucgr.J00242.1	SBPASEsedoheptulose-bisphosphatase	Plastídio	-
Eucgr.J00389.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.J00617.1	SMAD/FHA domain-containing protein	Plastídio	-
Eucgr.J00682.1	PYD2pyrimidine 2	Plastídio	-
Eucgr.J00982.1	ACT domain-containing protein	Plastídio	-
Eucgr.J01037.1	lactate/malate dehydrogenase family protein	Plastídio	-
Eucgr.J01477.1	GF14 NU,GRF7general regulatory factor 7	Plastídio	-
Eucgr.J01595.1	DHAR3 dehydroascorbate reductase 1	Plastídio	-
Eucgr.J01847.2	Oxidoreductases, acting on NADH or NADPH	Plastídio	-
Eucgr.J01957.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.J02172.3	ferredoxin thioredoxin reductase catalytic beta chain	Plastídio	-
Eucgr.J02293.1	ATPHB3,PHB3 prohibitin 3	Plastídio	-
Eucgr.J02596.2	PAE220S proteasome alpha subunit E2	Plastídio	-
Eucgr.J02666.1	ribosomal protein L14	Plastídio	-
Eucgr.J02958.2	PSAH-2,PSAH2,PSI-Hphotosystem I subunit H2	Plastídio	-
Eucgr.J03033.1	HTA9histone H2A protein 9	Plastídio	-
Eucgr.J03079.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-

Eucgr.J03199.1	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	Plastídio	-
Eucgr.K00068.2	G-TMT,TMT1,VTE4 gamma-tocopherol methyltransferase	Plastídio	-
Eucgr.K00253.2	Remorin family protein	Plastídio	-
Eucgr.K00732.1	ATPDI10,ATPDIL2-2,PD110,PDIL2-2 PDI-like 2-2	Plastídio	-
Eucgr.K00785.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K00881.1	ATTPS03,TPS03 terpene synthase 03	Plastídio	-
Eucgr.K01045.1	AAC3,ATAAC3 ADP/ATP carrier 3	Plastídio	-
Eucgr.K01105.1	ketol-acid reductoisomerase	Plastídio	-
Eucgr.K01217.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.K01243.3	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Plastídio	-
Eucgr.K01296.2	ATNSI,NSI nuclear shuttle interacting	Plastídio	-
Eucgr.K01707.1	HINT1,HIT3HIS triad family protein 3	Plastídio	-
Eucgr.K01824.4	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	-
Eucgr.K02073.2	Aldolase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K02359.2	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	-
Eucgr.K02362.2	PSALphotosystem I subunit I	Plastídio	-
Eucgr.K02414.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-
Eucgr.K02489.2	EMB2728,RPE D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Plastídio	-
Eucgr.K02566.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.K02606.2	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K02753.1	NDPK2 nucleoside diphosphate kinase 2	Plastídio	-
Eucgr.K02765.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily	Plastídio	-
Eucgr.K02778.1	CP31B chloroplast RNA-binding protein 31B	Plastídio	-
Eucgr.K03285.1	ATPARP2,PARP2 poly(ADP-ribose) polymerase 2	Plastídio	-
Eucgr.K03409.1	RPH1resistance to phytophthora 1	Plastídio	-
Eucgr.L00543.2	fumarylacetoacetase, putative	Plastídio	-
Eucgr.L00744.1	GTP binding;GTP binding	Plastídio	-
Eucgr.L01448.1	ATGLX1,GLX1 glyoxalase I homolog	Plastídio	-

Eucgr.L02937.1	ATCBR,CBR,CBR1NADH:cytochrome B5 reductase 1	Plastídio	-
Eucgr.A00159.1	MLP423MLP-like protein 423	Outro	-
Eucgr.A00347.1	ASAR1,ATSAR2,ATSARA1C,SAR2secretion-associated	Outro	-
Eucgr.A00373.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily	Outro	-
Eucgr.A00506.2	HMGB1,NFD1high mobility group B1	Outro	-
Eucgr.A01152.1	Ribosomal protein L11 family protein	Outro	-
Eucgr.A01238.1	AtPPa4,PPa4 pyrophosphorylase 4	Outro	-
Eucgr.A02763.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Outro	-
Eucgr.A02940.2	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Outro	-
Eucgr.B00034.1	14-3-3PHI,GF14 PHI,GRF4 GF14 protein phi chain	Outro	-
Eucgr.B00144.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	Outro	-
Eucgr.B00427.1	ATHIR1,HIR1 SPFH/Band 7/PHB domain-containing	Outro	-
Eucgr.B00913.1	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	Outro	-
Eucgr.B01579.3	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Outro	-
Eucgr.B02461.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	Outro	-
Eucgr.B03507.2	NTF2B nuclear transport factor 2B	Outro	-
Eucgr.B03603.1	Mitochondrial substrate carrier family protein	Outro	-
Eucgr.B03604.2	TUA3tubulin alpha-3	Outro	-
Eucgr.C00539.1	TAO1target of AVRb operation1	Outro	-
Eucgr.C00931.1	Ribosomal protein L31e family protein	Outro	-
Eucgr.C01159.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family	Outro	-
Eucgr.C01350.1	TPL,WSIP1 Transducin family protein / WD-40 repeat	Outro	-
Eucgr.C01355.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	Outro	-
Eucgr.C01749.2	DEAD/DEAH box RNA helicase family protein	Outro	-
Eucgr.C02133.1	PBA1N-terminal nucleophile aminohydrolases	Outro	-
Eucgr.C03901.1	ACG1,ATMSI4,FVE,MSI4,NFC04,NFC4 Transducin family	Outro	-
Eucgr.C04382.1	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	Outro	-
Eucgr.D01807.1	ATSGT1B,EDM1,ETA3,RPR1,SGT1Bphosphatase-related	Outro	-

Eucgr.D02118.2	Hyaluronan / mRNA binding family	Outro	-
Eucgr.D02177.1	ATKAO2,CYP88A4,KAO2 ent-kaurenoic acid hydroxylase	Outro	-
Eucgr.D02461.1	ATRPS13A,PFL2,RPS13,RPS13Aribosomal protein S13A	Outro	-
Eucgr.E00182.2	ATPMM,PMM phosphomannomutase	Outro	-
Eucgr.E00655.6	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein	Outro	-
Eucgr.E00871.2	Nucleoside diphosphate kinase family protein	Outro	-
Eucgr.E00889.1	RPN12aregulatory particle non-ATPase 12A	Outro	-
Eucgr.E01107.1	ATCAD1,CAD1 cinnamyl-alcohol dehydrogenase	Outro	-
Eucgr.E01297.1	RPM1,RPS3 NB-ARC domain-containing	Outro	-
Eucgr.E01836.2	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	Outro	-
Eucgr.E02842.1	RKF1receptor-like kinase in flowers 1	Outro	-
Eucgr.E03242.1	APE2,TPTGlucose-6-phosphate/phosphate	Outro	-
Eucgr.F00129.1	AWI31,VEP1NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily	Outro	-
Eucgr.F00184.1	RD21,RD21AGranulin repeat cysteine protease family	Outro	-
Eucgr.F00192.1	RAP2.1related to AP2 1	Outro	-
Eucgr.F00370.1	14-3-3OMEGA,GF14 OMEGA,GRF2 general regulatory	Outro	-
Eucgr.F01586.1	ARS5,ATPSM30,PAF1 proteasome alpha subunit F1	Outro	-
Eucgr.F01600.1	AAA-type ATPase family protein	Outro	-
Eucgr.F02130.2	14-3-3lambda,AFT1,GRF6G-box regulating factor 6	Outro	-
Eucgr.F03036.1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family	Outro	-
Eucgr.F03673.3	AtHsp90.4,Hsp81.4 HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	Outro	-
Eucgr.F04036.1	Protein kinase protein with adenine nucleotide	Outro	-
Eucgr.F04448.1	ATRUB1,NEDD8,RUB1 related to ubiquitin 1	Outro	-
Eucgr.G00957.3	PFD1PREFOLDIN 1	Outro	-
Eucgr.G01768.1	FIO1methyltransferases	Outro	-
Eucgr.H00595.1	GAD4glutamate decarboxylase 4	Outro	-
Eucgr.H01628.2	Eukaryotic aspartyl protease family protein	Outro	-
Eucgr.H02116.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	Outro	-

Eucgr.H02875.1	ATMYA2,MYA2,XI-2,XI-6 myosin 2	Outro	-
Eucgr.H03281.1	AIMP ALPHA,AT-IMP,ATKAP ALPHA,IMPA	Outro	-
Eucgr.H03939.1	Ribosomal L22e protein family	Outro	-
Eucgr.H04374.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Outro	-
Eucgr.H04941.1	Ribosomal protein L17 family protein	Outro	-
Eucgr.I00375.1	SAP domain-containing protein	Outro	-
Eucgr.I02137.3	RPSAb 40s ribosomal protein SA B	Outro	-
Eucgr.I02246.1	ATHCHIB,B-CHI,CHI-B,HCHIB,PR-3,PR3basic chitinase	Outro	-
Eucgr.I02334.1	PAD2proteasome alpha subunit D2	Outro	-
Eucgr.J00008.3	ATCTIMC,CYTOTPI,TPI triosephosphate isomerase	Outro	-
Eucgr.J00048.4	ADF4,ATADF4 actin depolymerizing factor 4	Outro	-
Eucgr.J00605.1	Glycosyl hydrolase family protein	Outro	-
Eucgr.J00793.1	MIF4G domain-containing protein / MA3 domain	Outro	-
Eucgr.J01697.1	U2A' U2 small nuclear ribonucleoprotein A	Outro	-
Eucgr.J02210.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Outro	-
Eucgr.J02246.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Outro	-
Eucgr.K00931.1	Hypothetical protein	Outro	-
Eucgr.L00153.1	NF-YB3nuclear factor Y, subunit B3	Outro	-
Eucgr.L02145.1	HTB4Histone superfamily protein	Outro	-
Eucgr.J02958.1	PSAH-2,PSAH2,PSI-Hphotosystem I subunit H2	Plastídio	-
Eucgr.K02606.1	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F00373.1	APX4,TL29 ascorbate peroxidase 4	Plastídio	-
Eucgr.K02362.3	PSALphotosystem I subunit I	Plastídio	-
Eucgr.B01163.2	ATGSL1,GLN2,GS2 glutamine synthetase 2	Plastídio	-
Eucgr.A01257.1	ribosomal protein L14	Plastídio	-
Eucgr.A02021.1	tRNA (guanine-N-7) methyltransferase	Plastídio	-
Eucgr.A02249.2	FD-GOGAT,GLS1,GLU1,GLUS glutamate synthase 1	Plastídio	-
Eucgr.B00853.1	MOS4modifier of snc1,4	Plastídio	-

Eucgr.B02455.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.B02495.1	CLB4,CSB3,GCPE,HDS,ISPG 4-hydroxy-3-methylbut	Plastídio	-
Eucgr.B02749.1	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.B03411.3	NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit, putative	Plastídio	-
Eucgr.C01838.1	chloroplast ribosomal protein S15	Plastídio	-
Eucgr.C02515.1	Ribosomal protein L35	Plastídio	-
Eucgr.C02605.1	AtENODL15,ENODL15 early nodulin-like protein 15	Plastídio	-
Eucgr.C04181.1	ATNUDT19,ATNUDX19,NUDX19nudix hydrolase homolog	Plastídio	-
Eucgr.D00007.1	PTAC14plastid transcriptionally active 14	Plastídio	-
Eucgr.D00178.3	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.D02023.1	ATSCO1,ATSCO1/CPEF-G,SCO1 Translation elongation	Plastídio	-
Eucgr.D02030.1	Aldolase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.E02404.1	Light harvesting chlorophyll-protein complex II	Plastídio	-
Eucgr.F01066.2	ATUBP14,PER1,TTN6,UBP14 ubiquitin-specific protease	Plastídio	-
Eucgr.F01462.1	LOS1Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V	Plastídio	-
Eucgr.F02096.1	Protein kinase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F02613.1	Ribosomal protein L21	Plastídio	-
Eucgr.F03148.3	SNARE-like superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.F03957.1	NDF1,NDH48NDH-dependent cyclic electron flow 1	Plastídio	-
Eucgr.G01188.2	ATEGY3,EGY3 ethylene-dependent gravitropism-deficient	Plastídio	-
Eucgr.G02539.2	ATWHY1,PTAC1,WHY1 ssDNA-binding transcriptional	Plastídio	-
Eucgr.G03224.2	TRX P,TRX z Thioredoxin z	Plastídio	-
Eucgr.H01482.2	FZL FZO-like	Plastídio	-
Eucgr.H02402.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.H05040.1	Ribosomal protein L14p/L23e family protein	Plastídio	-
Eucgr.I01148.1	ATHNIR,NIR,NIR1 nitrite reductase 1	Plastídio	-
Eucgr.I01814.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.I02035.2	CRR7chlororespiratory reduction 7	Plastídio	-

Eucgr.J02957.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.J03079.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K02831.1	SPPA,SPPA1signal peptide peptidase	Plastídio	-
Eucgr.K03198.3	Thioredoxin superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K03317.1	Histone acetyltransferase of the GNAT family 1	Plastídio	-
Eucgr.K03368.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.L00005.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	Plastídio	-
Eucgr.L01179.6	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	Plastídio	-
Eucgr.L03049.1	ATHM4,ATM4,TRX-M4 thioredoxin M-type 4	Plastídio	-
Eucgr.B02532.2	CH-CPN60A,CPN60A,SLPchaperonin-60alpha	Plastídio	-
Eucgr.B02878.1	ATP synthase alpha/beta family protein	Plastídio	-
Eucgr.K01824.3	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily	Plastídio	-
Eucgr.C01792.1	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit	Plastídio	-
Eucgr.F00601.2	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.B03824.1	PSAPhotosystem I subunit O	Plastídio	-
Eucgr.G03205.2	proline-rich family protein	Plastídio	-
Eucgr.K02414.2	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	Plastídio	-
Eucgr.B02608.2	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	-
Eucgr.F01209.1	mMDH1 Lactate/malate dehydrogenase family protein	Plastídio	-
Eucgr.K00283.2	Translocation protein mttA/Hcf106	Plastídio	-
Eucgr.F00312.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.L01603.1	Peroxidase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.B02031.1	G-H2AX,GAMMA-H2AX,H2AXB,HTA3gamma histone	Plastídio	-
Eucgr.J00425.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F03697.1	Ribosomal protein S10p/S20e family protein	Plastídio	-
Eucgr.E03887.1	AtCEST,CEST	Plastídio	-
Eucgr.J01037.3	lactate/malate dehydrogenase family protein	Plastídio	-
Eucgr.I02316.5	Hypothetical protein	Plastídio	-

Eucgr.F00470.1	TUA2tubulin alpha-2 chain	Plastídio	-
Eucgr.C02498.1	Uncharacterised BCR, YbaB family COG0718	Plastídio	-
Eucgr.A01410.1	60S acidic ribosomal protein family	Plastídio	-
Eucgr.J00023.1	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1heat shock	Plastídio	-
Eucgr.C02387.2	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.L00637.1	ATS6A.2,RPT5A regulatory particle triple-A ATPase 5A	Plastídio	-
Eucgr.J01176.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	Plastídio	-
Eucgr.C02177.1	CAC2acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin carboxylase	Plastídio	-
Eucgr.D01192.1	CYP71B7 cytochrome P450, family 71 subfamily B,	Plastídio	-
Eucgr.H02992.4	plastid developmental protein DAG, putative	Plastídio	-
Eucgr.I01653.1	GHS1Ribosomal protein S21 family protein	Plastídio	-
Eucgr.I00236.1	GRAS family transcription factor	Plastídio	-
Eucgr.I01423.2	ATHPR1,HPRhydroxypyruvate reductase	Plastídio	-
Eucgr.J02573.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.H00675.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.F02546.1	Hypothetical protein	Plastídio	-
Eucgr.H00243.1	CLPD,ERD1,SAG15 Clp ATPase	Plastídio	-
Eucgr.K00245.1	MSBP2 progesterone binding protein 3	Plastídio	-
Eucgr.A02656.1	54CP,CPSRP54,FFC,SRP54CPchloroplast signal	Plastídio	-
Eucgr.A01100.1	Lycopene beta/epsilon cyclase protein	Plastídio	-
Eucgr.I02715.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family	Plastídio	-
Eucgr.G01045.1	HSC70-5,MTHSC70-2 HSO70 2	Plastídio	-
Eucgr.C00059.2	CYP716A1cytochrome P450, family 716, subfamily A	Plastídio	-
Eucgr.H05078.2	NDC1NAD(P)H dehydrogenase C1	Plastídio	-
Eucgr.B03986.1	UPL6ubiquitin protein ligase 6	Plastídio	-
Eucgr.L02103.1	PDE181,SPC1,ZDS zeta-carotene desaturase	Plastídio	-
Eucgr.F03689.1	FLA1FASCICLIN-like arabinogalactan 1	Plastídio	-
Eucgr.J03059.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	Plastídio	-

Eucgr.F04345.2	ATPDI5,ATPDIL1-1,PD15,PDIL1-1 PDI-like 1-1	Plastídio	-
Eucgr.F02746.1	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center	Plastídio	-
Eucgr.I01939.1	DEG8,DEGP8Trypsin family protein with PDZ domain	Plastídio	-
Eucgr.H00942.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family	Plastídio	-
Eucgr.A00911.1	CYP97B3 cytochrome P450, family 97, subfamily B,	Plastídio	-
Eucgr.C03090.1	Wall-associated kinase family protein	Plastídio	-
Eucgr.J03011.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	Plastídio	-
Eucgr.K02023.1	EMB2167,ERD16,HAP4,UBQ1 ubiquitin extension protein	Outro	-
Eucgr.B03925.1	H2B,HTB9Histone superfamily protein	Outro	-
Eucgr.A02541.1	Hypothetical protein	Outro	-
Eucgr.B01563.1	Hypothetical protein	Outro	-
Eucgr.C00579.1	ATSPLA2-ALPHA,PLA2-ALPHAphospholipase A2 family	Outro	-
Eucgr.C00824.2	ELF8,VIP6 binding	Outro	-
Eucgr.C04195.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family	Outro	-
Eucgr.D00301.2	Ribosomal protein S11 family protein	Outro	-
Eucgr.D02118.1	Hyaluronan / mRNA binding family	Outro	-
Eucgr.F02025.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Outro	-
Eucgr.F04114.1	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride	Outro	-
Eucgr.G02564.1	TAF15 TBP-associated factor 15	Outro	-
Eucgr.H01051.2	ASAR1,ATSAR2,ATSARA1C,SAR2secretion-associated	Outro	-
Eucgr.H01229.1	Protein of unknown function (DUF677)	Outro	-
Eucgr.H01660.2	ATCEN2,CEN1,CEN2centrin2	Outro	-
Eucgr.H02751.1	Histidine kinase, DNA gyrase BATPase family protein	Outro	-
Eucgr.H04099.1	ATHAK5,HAK5 high affinity K+ transporter 5	Outro	-
Eucgr.I01515.1	PUB15 Plant U-Box 15	Outro	-
Eucgr.H03928.1	TCTPtranslationally controlled tumor protein	Outro	-
Eucgr.H00057.2	Ribosomal protein L13 family protein	Outro	-
Eucgr.H01111.4	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	Outro	-

Eucgr.H00136.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Outro	-
Eucgr.J00048.6	ADF4,ATADF4 actin depolymerizing factor 4	Outro	-
Eucgr.B00144.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	Outro	-
Eucgr.E03875.1	ATOMT1,OMT1 O-methyltransferase 1	Outro	-
Eucgr.F02387.1	Hypothetical protein	Outro	-
Eucgr.G02684.1	MMZ4,UEV1D,UEV1D-4ubiquitin E2 variant 1D-4	Outro	-
Eucgr.D01313.1	ATRBP45B,RBP45B RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs)	Outro	-
Eucgr.K03247.1	Ribosomal protein L11 family protein	Outro	-
Eucgr.E03874.2	ATOMT1,OMT1 O-methyltransferase 1	Outro	-
Eucgr.I02418.2	AtPPa2,PPa2 pyrophosphorylase 2	Outro	-
Eucgr.J02850.2	NAP1;2,NFA02,NFA2 nucleosome assembly protein 1;2	Outro	-
Eucgr.B02275.1	ATSTP6,STP6 sugar transporter 6	Outro	-
Eucgr.B03443.3	Protein of unknown function (DUF1666)	Outro	-
Eucgr.H03550.1	CYCT1;4 Cyclin family protein	Outro	-
Eucgr.L03076.1	RING/U-box superfamily protein	Outro	-
Eucgr.G01193.1	Xylose isomerase family protein	Outro	-
Eucgr.B01032.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance	Outro	-
Eucgr.F00101.1	ATCSLC12,CSLC12 Cellulose-synthase-like C12	Outro	-
Eucgr.F00654.1	AtRLP31,RLP31 receptor like protein 31	Outro	-
Eucgr.I00210.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	Outro	-

a: de acordo com o genoma *Eucalyptus grandis* BRASUZ1 montagem v2 publicamente disponível no portal Phytozome.

b: de acordo com o genoma *Eucalyptus grandis* BRASUZ1 montagem v2 publicamente disponível no portal Phytozome.

c: Uma proteína foi considerada plastidial quando designada como tal por pelo menos um dos quatro programas de predição de localização subcelular in silico (TargetP, ChloroP, WoLF e Predotar) ou quando apresentou uma proteína homóloga em qualquer um dos quatro bancos de dados utilizados (PPDB, AT-Chloro, SUBA e TAIR).

d: variação da abundância proteica derivados de contagem espectral e normalização NSAF (Zybailov et al., 2006), comparando-se três repetições biológicas de plantas tratadas com 400 ppm de CO₂ contra três repetições biológicas de plantas tratadas com 1000 ppm de CO₂. Valores positivos indicam aumento da abundância da proteína em plantas cultivadas com 1000 ppm de CO₂ e valores negativos indicam redução da abundância proteica nessa condição atmosférica.

ANEXO II

ERRATA

A espécie vegetal utilizada neste trabalho é *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, cultivar PL – 3335 / I144 / AC 144, de acordo com o termo de conformidade de muda florestal fornecido pelo produtor Agriflora – Mudanças Florestais.

TERMO DE CONFORMIDADE DE MUDA FLORESTAL Nº: A.30-14

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTOR

Nome: Agriflora Viveiro de Mudanças Florestais – EPP	
Inscrição no RENAME Nº: SP – 01835/2008	
Endereço: Rod. Washington Luiz, km 273, s/n	
Município/UF: Araraquara - SP	CEP: 14.800-670
Endereço eletrônico: agriflora@agriflora.com.br	TEL: 16 – 3322 6488

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL TÉCNICO DO PRODUTOR

Nome: José Zani Filho	
Credenciamento no RENAME Nº: SP – 15194/2014	
Endereço: Av. Irmã Antonia de Arruda Camargo, 286	
Município/UF: Araraquara - SP	CEP: 14.806-033
Endereço eletrônico: zanifilho@agriflora.com.br	TEL: 16- 3322 6488

Atesto que as mudas das espécies florestais, abaixo discriminadas, foram produzidas de acordo com as normas e os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelos quais assumo a responsabilidade pela identidade e qualidade:

Espécie	Nome Comum	Cultivar	Porta-enxerto	Identificação do Lote	Categoria do Material que Originou a Muda	Qtde de Mudanças (unidades)
<i>Eucalyptus urophylla</i> S. T. Blake	Eucalipto	PL – 3335	--	35/30	Selecionada	172.800

Obs: Cultivares: PL – 3335 (=I-144).

Araraquara - SP

, 15 de Dezembro de 2014

Assinatura do Responsável Técnico