

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Estudo da anatomia e bioquímica caulinar de mudas de
***Eucalyptus urophylla* cultivadas em alta concentração de CO₂**

Patricia Sitta Innocente
Bióloga

2019

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

**Estudo da anatomia e bioquímica caulinar de mudas de
Eucalyptus urophylla cultivadas em alta concentração de CO₂**

Patricia Sitta Innocente

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).

2019

I58e Innocente, Patricia Sitta
 Estudo da anatomia e bioquímica caulinar de mudas de
Eucalyptus urophylla cultivadas em alta concentração de
CO₂ / Patricia Sitta Innocente. -- Jaboticabal, 2019
 34 p. : tabs., fotos

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
 Orientador: Tiago Santana Balbuena

 1. Estresse abiótico. 2. Fisiologia vegetal. 3.
 Proteômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DA ANATOMIA E BIOQUÍMICA CAULINAR DE MUDAS DE *Eucalyptus urophylla* CULTIVADAS EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE CO₂

AUTORA: PATRICIA SITTA INNOCENTE

ORIENTADOR: TIAGO SANTANA BALBUENA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA
Departamento de Tecnologia / UNESP/Câmpus de Jaboticabal



Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA
Departamento de Ciências Farmacêuticas-FCFRP/USP / Ribeirão Preto/SP



Jaboticabal, 05 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Patricia Sitta Innocente – nascida em 08 de abril de 1992 em Jaboticabal-SP, é bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal (2012 – 2017 respectivamente). Entre 2014 e 2015 foi estagiária do Laboratório de Fisiologia do Exercício Equino e Farmacologia onde desenvolveu o trabalho de conclusão de curso intitulado: “COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR COM OSTEOARTRITE INDUZIDA E SUBMETIDOS A TERAPIA” sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. Em 2017 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.

“A verdade em ciência pode ser definida como a hipótese de trabalho melhor adequada para abrir caminho para uma próxima que seja melhor”

Konrad Lorenz

DEDICO

Aos meus pais **Marilda T. Sitta Innocente e Luiz Carlos Innocente** pelo exemplo de vida, por sempre acreditarem em mim, por sempre me apoiarem, por todo amor e carinho.

Devo a vocês tudo que sou hoje.

À meu irmão **Jonas Sitta Innocente** por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Santana Balbuena, pela confiança e apoio durante todo o trabalho e por sempre ensinar com muita paciência e disposição.

A minha família, principalmente aos meus pais, pelo apoio, confiança e amor incondicionais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da UNESP/FCAV por ajudarem na minha formação.

Aos colegas do laboratório de proteômica vegetal, Amanda, Letícia, Naiara, Gabriel, Felipe e Emily, por todos os ensinamentos e momentos compartilhados.

As minhas amigas Amanda, Marina, Geovana e Ana Paula pelo companheirismo, pela diversão e risadas.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Tecnologia.

Dr. Eduardo Gasparino e à assistente acadêmica Roseli do Departamento de Biologia aplicada à Agropecuária - Laboratório de Morfologia e Palinologia (LaMPali) (FCAV), pelo auxílio nas análises de microscopia ótica.

Dr. Rinaldo Cesar de Paula e à doutoranda Bruna do Departamento de Produção Vegetal - Laboratório de Sementes e Melhoramento Florestal (FCAV), pelo auxílio na quantificação de lignina.

Dra. Simone de Pádua Teixeira da FCFPR-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e à assistente acadêmica Vani da FMRP-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na técnica de coloração de lâminas.

Ao Jay J. Thelen e Eric Fedosejevs – UM Bound Life Science Center – University of Missouri pelo auxílio na espectrometria de massas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1.OBJETIVO GERAL	3
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. MUDANÇAS CLIMÁTICAS	4
3.2. EUCALIPTO	5
3.3. COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR	7
3.4. A PROTEÔMICA DE PLANTAS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	13
4.2. MASSA SECA	13
4.3. AVALIAÇÕES ANATÔMICAS	14
4.4. TEOR DE LIGNINA CAULINAR	14
4.5. ANÁLISES EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS	23
APÊNDICE	28

Estudo da anatomia e bioquímica caulinar de mudas de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em alta concentração de CO₂

RESUMO - De acordo com o último Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), a atmosfera do planeta Terra apresenta a maior concentração de CO₂ registrada nos últimos 800.000 anos. Modelos de predição da composição atmosférica indicam uma tendência de aumento da concentração desse gás em um futuro próximo. Plantas que possuem fotossíntese do tipo C3, como o eucalipto, devem ter o crescimento e o acúmulo de biomassa favorecidos caso a concentração de CO₂ predita pelo IPCC se confirme. O objetivo do presente trabalho foi verificar as modificações anatômicas no caule induzidas por alta concentração de CO₂ e avaliar o conteúdo de lignina da parede celular em caules de *Eucalyptus urophylla* quando submetidos as concentrações de 410 ppm e 980 ppm desse gás. Para tanto, foram feitas avaliações estruturais (composição anatômica do caule) e bioquímicas (concentração e biossíntese de lignina) de plantas jovens cultivadas em elevada concentração de CO₂. Foi verificado que as plantas avaliadas apresentaram um aumento na espessura do tecido cortical e dos tecidos condutores (xilema e floema) de seiva. Além disso, verificou-se a deposição de menor quantidade de lignina na parede celular de células recém-diferenciadas. Contrariamente, não foram verificadas alterações na quantidade relativa da lignina caulinar, da proteína COMT1 e do proteoma subcelular envolvido na biossíntese de parede celular. Nossos dados indicam que o aumento da concentração de CO₂ em plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* induz aumento no crescimento caulinar e menor lignificação de células recém-diferenciadas.

Palavras chave: Estresse abiótico, fisiologia vegetal, proteômica

Study of the anatomy and biochemistry stem of *Eucalyptus urophylla* seedlings cultivated at high CO₂ concentration

ABSTRACT – According to the latest Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), one atmosphere on planet Earth has the highest CO₂ concentration recorded in the last 800.000 years. Prediction models of atmospheric composition that may cause an increase in concentration of this gas in the future. Plants with C3 type photosynthesis, such as eucalyptus, should have favorable growth and biomass volumen if the IPCC predicted CO₂ concentration is confirmed. The aim of the present study was to verify how anatomical changes in capsules induced by high CO₂ concentration and to evaluate the cell wall lignin content in *Eucalyptus urophylla* stems when submitted to 410 ppm and 980 ppm concentration of this gas. For this, the analyzed compositions (stem anatomical composition) and biochemical (line concentration and biosynthesis) of Young plants cultivated in CO₂ concentration werw used. It was selected that the evaluated plants showed an increase in the thickness of the cortical and conductive tissues (xylem and phloem) of sap. In addition, the deposition of the smallest amount of cell line in the cell Wall of newly differentiated cells was verified. In contrast, there were no changes in the relative amount of causal line, COMT1protein and subcellular proteome and subcellular proteome used in cell Wall biosynthesis. Our data show that increasing CO₂ concentration in young *Eucalyptus urophylla* plants induces increased stem growth and lower lignification of newly differentiated cells.

Keywords: Abiotic stress, plant physiology, proteomics

LISTA DE TABELAS

Tabela 1S. Proteínas caulinares identificadas por espectrometria de massas em mudas de <i>Eucalyptus urophylla</i> expostas nas seguintes concentrações de CO ₂ : 410 e 980ppm, conforme descrito no Material e Métodos. Proteínas pertencentes a classificação parede celular de componentes celulares obtidas pelo Blast2GO.	31
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota biossintética da lignina. Os círculos coloridos indicam os genes que formam o “toolbox” da lignina em *Eucalyptus*, descrito por (Carocha *et al.*, 2014). As setas em preto representam as reações bioquímicas catalisadas pelas mesmas. Adaptado: Carocha et al., 2015.....9

Figura 2: Planta *Eucalyptus urophylla*. A chave vermelha indica a porção de 20 cm da região mediana do caule a ser utilizado.....13

Figura 3: Massa seca de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla*. Barras cinza escuro são plantas que foram cultivadas por 30 dias nas concentrações de CO₂ de 410 ppm e 980 ppm. Barras cinza claro representam as plantas que não tiveram contato com estas duas concentrações de CO₂.....17

Figura 4: Espessura dos tecidos caulinares de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias nas seguintes concentrações de CO₂: 410 e 980 ppm. Espessura do córtex (A), floema secundário (B), xilema secundário (C) e parênquima medular (D). Nos gráficos, os asteriscos indicam diferença significativa de acordo com o teste Mann-Whitney Rank Sum ($p < 0,05$).....18

Figura 5: Imagens de microscopia de campo claro da secção transversal do caule de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias. Imagem do caule de plantas mantidas na concentração de 410 ppm, aumento de 4x e escala de 100 µm (A), imagem do caule na concentração de 980 ppm, aumento de 4x e escala de 100 µm (B). CT, córtex; FS, floema secundário, XS, xilema secundário; PM, parênquima medular. Densidade ótica do XS1, XS2 e XS3, XS representa xilema secundário (C). Proporção da espessura em porcentagem dos XS1, XS2 e XS3 (D). Nos gráficos, os asteriscos indicam diferença significativa de acordo com o teste Mann-Whitney Rank Sum ($p < 0,05$).....19

Figura 6: Conteúdo de lignina de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias em duas concentrações de CO₂: 410 e 980 ppm (A), fator de abundância de íons normalizado (NIAF) do peptídeo ILM(+15.994900)ESWYYLK da proteiforme COMT1 (B). Nos gráficos, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).
.....20

Figura 7: Classificação funcional, segundo o termo componente celular, das 56 proteínas identificadas em caules de *Eucalyptus urophylla*. Proteínas identificadas em *Eucalyptus urophylla* cultivadas na concentração de CO₂ a 410ppm (A). Proteínas identificadas em *Eucalyptus urophylla* cultivadas na concentração de CO₂ a 980 ppm (B). Fator de abundância de íons normalizado (NIAF) das proteínas pertencentes a parede celular (C). No gráfico, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).
.....21

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Earth System Research Laboratory (ESRL, 2019), a liberação de dióxido de carbono (CO₂) aumentou de 315 ppm em 1958 para 415 ppm em 2019. Há uma expectativa de que a concentração de CO₂ média atinja a marca de 985 ppm em 2100, dependendo do desenvolvimento sócio-econômico global e de políticas públicas e privadas de mitigação da emissão dos gases de efeito estufa (IPCC, 2014). Em plantas, muitos efeitos são esperados caso exista uma nova condição climática. O aumento do CO₂ pode acarretar um aumento no número, tamanho e área total das folhas, tamanho do ramo, biomassa e taxa de crescimento (Huang et al., 2007), principalmente em mudas e árvores jovens (Wang, 2007). Contudo, é importante ressaltar que estas alterações provocadas pelo aumento da taxa de CO₂ podem variar entre as espécies e cultivares florestais utilizados pelo homem (Voelker et al., 2016).

O gênero *Eucalyptus* está entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao aumento de CO₂. Por ser uma planta do tipo C3, este cenário pode impactar positivamente nas taxas de fixação de carbono e favorecer o seu crescimento (Atwell et al., 2003). Em plantas do tipo C4, nas atuais concentrações de CO₂ (410 ppm) há saturação da enzima PEPCase (fosfoenol piruvato carboxilase) não apresentando efeito direto com o aumento do CO₂ (Pimentel, 2011). Estudos indicam que há crescimento da planta (diferenciação celular) quando todos os recursos abióticos (temperatura, disponibilidade de água, nutrientes) são oferecidos plenamente (Korner, 2015). Mckiernan et al. (2012) realizaram um estudo para verificar as alterações na produção de metabólitos frente à elevação de CO₂ em *Eucalyptus globulus* e *E. paciflora*. Foi observado que o enriquecimento da atmosfera com CO₂ induziu diferenças na produção de metabólitos secundários, em ambas as espécies. Salomón et al. (2019) realizaram um estudo em que plantas de *E. tereticornis* apresentaram aumento no tamanho de células do xilema após cultivo em elevada concentração de CO₂. Ghannoum et al. (2010) estudaram a espécie de eucalipto de rápido crescimento, *E. saligna*, e de crescimento mais lento, *E. Sideroxylon* e observaram que a elevação do CO₂ e temperatura estimularam individualmente o acúmulo de biomassa em ambas as espécies de plantas. De acordo com estudo feito por Hasegawa et al. (2016), em solos florestais de eucalipto no leste da Austrália, a elevação do CO₂ aumenta a disponibilidade das plantas captarem nitrogênio e fósforo no solo, atribuída à microbiota da rizosfera.

A parede celular é uma estrutura pertencente da célula vegetal, constituída por agrupamentos de macromoléculas, dentre elas, polissacarídeos, proteínas e substâncias fenólicas. A parede celular tem, como funções, proporcionar rigidez mecânica, controlar a expansão celular e transportes intracelulares, além de proteger a célula de organismos patogênicos e predadores (Evans et al., 2000).

Dentre os principais constituintes da parede celular, destacam-se a celulose e a lignina. A celulose é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes. Seguido da lignina que é impregnada na parede celular secundária, é uma macromolécula que confere rigidez mecânica, impermeabilidade, auxilia na condução de água, resistência a biodegradação e fundamental mecanismo de defesa da parede celular (Bhuiyan et al., 2009). O processo de lignificação ocorre com a formação dos monolignóis (hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S)) no citoplasma, transporte para a parede celular através da membrana celular e polimerização na parede celular. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina são os compostos de início para a biossíntese da lignina pela rota do ácido cinâmico (Hatfield e Vermerris, 2001).

A qualidade da lignina, assim como os tipos de ligações químicas e sua composição influenciam diretamente no aproveitamento da celulose na indústria de produção de papel (Rencoret et al., 2009), já que maiores concentrações dificultam o processo de deslignificação da produção de celulose. Uma das enzimas-chave na produção de monolignóis é a COMT. Tal enzima possui sete isoformas em eucalipto e está envolvida na conversão da 5-OH álcool coniferílico em álcool sinapílico resultando no monolignól siringil no metabolismo da lignina (Carocha et al., 2015).

O estudo proposto junto com estratégias de melhoramento genético irão contribuir para o processo de deslignificação, reduzindo a porcentagem de lignina total, aumentando a proporção das ligninas reativas (grupo siringil) em relação as menos reativas ou mais difíceis de serem deslignificadas e utilização de cruzamentos artificiais na formação de híbridos e seleção de genótipos mais favoráveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi verificar se o crescimento em atmosfera enriquecida com CO₂ pode influenciar a estrutura anatômica caulinar e o padrão de deposição de lignina em caules jovens em início de estrutura secundária de *Eucalyptus urophylla*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar possíveis alterações anatômicas em caules de plantas jovens submetidas ao estímulo de CO₂;
- ✓ Quantificar o teor relativo de lignina em caules de plantas jovens submetidas ao estímulo de CO₂;
- ✓ Monitorar a biossíntese de monolignóis por meio da quantificação relativa da enzima COMT1;
- ✓ Avaliar alterações na quantidade de proteínas envolvidas na biossíntese de parede celular em plantas jovens submetidas ao estímulo de CO₂.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mudanças climáticas

De acordo com o ESRL (“Earth System Research Laboratory”) (2017), a liberação de dióxido de carbono (CO₂) ocasionada pela queima de combustíveis fósseis oriundas das atividades industriais e agrícolas possivelmente contribuíram para o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, passando de 278 ppm em 1750 para a marca de 415 ppm em 2019 sendo a concentração mais alta registrada pelo Mauna Loa. Atualmente, o planeta Terra apresenta os níveis mais elevados da concentração desse gás nos últimos 800.000 anos e prevê-se um aumento ainda mais expressivo devido à dependência por combustíveis fósseis e ao aumento populacional (IPCC, 2013).

Estima-se que em 2100, segundo o modelo RCP8.5 (modelo do quinto relatório do IPCC), a concentração de CO₂ média será de 985 ppm (794 - 1142 ppm), com 90% de nível de confiança nessa previsão. O aumento de CO₂ associado ao aumento da temperatura e mudanças nos padrões de precipitação podem modificar as taxas de crescimento das plantas terrestres em um futuro próximo, aumentando a taxa fotossintética, produção de biomassa (Norby et al., 2010), respostas fisiológicas (Wang et al., 2012), idade (Norby et al., 2010) e condições ambientais (Ellsworth et al., 2017; IPCC, 2013).

As alterações nas mudanças climáticas terão grandes impactos para os seres humanos, animais e plantas. Frente a este cenário, a agricultura depende diretamente das condições climáticas. Estas grandes mudanças nas temperaturas globais e padrões de precipitação podem tornar as plantas vulneráveis a estress biótico (patógenos, pragas e ervas daninhas) e abióticos (frio, luminosidade, nutrientes e seca) (Vaughan et al., 2016).

Diversos estudos baseados no hemisfério norte indicam que as mudanças climáticas terão importantes consequências na distribuição e funcionamento dos ecossistemas e sua biota (Chen et al., 2011). As florestas são vulneráveis às mudanças climáticas, já que podem sofrer reduções significativas na precipitação sazonal, bem como aumentos na temperatura resultantes da expansão dos pólos da zona subtropical (Cai et al., 2012).

Espécies vegetais que possuem metabolismo fotossintético do tipo C3 podem ser favorecidas, pois o primeiro produto estável formado é composto por três carbonos, o fosfoglicerato (3-PGA). O fator limitante à assimilação de carbono em plantas C3 é em relação as propriedades catalíticas de oxigenase e carboxilase da enzima Rubisco (Portis; Parry, 2007). Portanto, estas espécies podem ser impactadas positivamente nas taxas de fixação de carbono. Respostas positivas de crescimento em atmosfera com elevada concentração de CO₂ em espécies de plantas lenhosas têm sido observadas, especialmente nos casos em que outros recursos foram adequadamente fornecidos (Atwell et al., 2003).

As plantas C4, com a enzima primária de carboxilação FosfoEnol Piruvato Carboxilase (PEPCase), tem maior afinidade pelo substrato CO₂, está saturada nas concentrações atuais de CO₂ e não apresenta efeito direto com o aumento de CO₂, ao menos sob falta d'água, pois a menor abertura estomática, nestas condições, permite maior economia de água (Pimentel, 2011).

O aumento do CO₂ atmosférico ao longo da escala de tempo geológico possibilitou a evolução das várias espécies (Becklin et al., 2014). Genótipos de árvores que aumentam sua produtividade em altas concentrações de CO₂ podem ser importantes para sustentar a produtividade de florestas em climas futuros (Aspinwall et al., 2015).

Segundo Atwell et al. (2003), o gênero *Eucalyptus* está entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao aumento de CO₂. Verificou-se que as respostas mais acentuadas ocorrem nas fases iniciais do estabelecimento da árvore, principalmente nos dois primeiros anos de crescimento (Atwell et al., 2003). O caule juvenil se apresenta na forma de cilindro, com diâmetro uniforme, desde a base até o topo (Evans et al., 2000). De maneira geral, ele apresenta elevados valores de densidade, comprimento de fibra e espessura de parede da fase juvenil até que a árvore atinja a maturidade. Na fase juvenil, a taxa de incorporação de biomassa é crescente e tende a se estabilizar, até que a árvore atinja a idade adulta. Desta forma, a árvore juvenil apresenta parede celular delgada, menor porcentagem de celulose, menor resistência mecânica, fibras curtas e maior porcentagem de lignina se comparada com árvore adulta (Truguilho et al., 1996).

3.2 Eucalipto

O gênero *Eucalyptus* é uma planta alógama, pertence a família Myrtaceae, é composto por 850 táxons (Stevens, 2001), é a cultura madeireira mais utilizada nas regiões tropicais e subtropicais. O eucalipto é de ocorrência natural na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania, possuindo cerca de 600 espécies adaptadas a diversas condições de solo e clima (Goulart et al., 2014).

As primeiras plantas de eucalipto trazidas para o Brasil foram em meados do século XIX para utilização da madeira na fabricação de linhas de trem. Há relatos que as primeiras plantas foram plantadas no Jardim Botânico e Museu Nacional do Rio de Janeiro, nos anos de 1825 e 1868 (Goulart et al., 2014). Os primeiros estudos com eucalipto no Brasil iniciaram em 1904, por Edmundo Navarro de Andrade, no Horto Florestal de Rio Claro, SP. O crescimento de áreas florestais aumentou depois de promulgada a Lei de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento, Lei nº 5.106 de 1966. A eucaliptocultura pode se consolidar com o Plano Nacional de Desenvolvimento (II PND), criado pelo Governo Federal, na década de 1970 (Brasil, 1974).

As espécies mais utilizadas no Brasil, em decorrência das características da madeira, são: *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. dunnii*. As espécies de eucalipto em geral são utilizadas por apresentar alta taxa de crescimento, elevada produção de sementes, madeira versátil, potencial econômico, resposta positiva ao manejo, alta adaptabilidade a diferentes condições ambientais, adquirir maior biomassa em pouco tempo e confere grande atratividade ao cultivo de eucalipto tendo alta competitividade de seus produtos nos mercados externo e interno (Silva, 2005).

No mundo, as florestas plantadas correspondem a cerca de 264 milhões de hectares (Fao, 2006) sendo composta por *Pinus* e *Eucalyptus*, no Brasil em 2015 a área plantada era correspondente a 5,6 milhões de hectares, sendo localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%). A produção de eucalipto, além de ser responsável por criar postos de trabalho, se destaca por melhorar a qualidade do ar, redução dos níveis de poluição sonora, conforto térmico, redução da erosão, melhoria da vazão hídrica, redução da pressão sobre florestas nativas, produção de mel, geléia, própolis e aumento da biodiversidade. A principal vantagem do eucalipto é a sua multiplicidade de uso (Ibá, 2015).

Devido às condições edafoclimáticas, o eucalipto se desenvolve bem no Brasil e tem importância econômica para a indústria mundial de madeira como principal fonte

de papel e celulose (Klabin, 2010). Atualmente, o Brasil é o 3º maior produtor mundial de celulose, perdendo somente para os Estados Unidos e o Canadá. Ocupa também a 9ª posição no ranking dos maiores produtores de papel.

Empresas de papel e celulose buscam elaborar medidas de controle e monitoramento genético das plantações de eucalipto com o objetivo de obter genótipos mais adaptados às possíveis alterações climáticas e que permitam expansão das áreas plantadas sem que exista redução da produção. As espécies e híbridos mais utilizadas são *Eucalyptus grandis* e *E. globulus* (Fibria, 2010).

Eucalyptus grandis teve recentemente seu genoma sequenciado por meio de uma geração de auto-fecundação de uma árvore chamada BRASUZ1, acarretando um marco muito importante no campo da biotecnologia de arbóreas. O genoma dessa espécie possui tamanho igual a 640 MB, contendo 36.376 genes preditos e distribuídos em 11 cromossomos (Myburg et al., 2014). Este sequenciamento envolveu 35 instituições e 80 pesquisadores de vários países. Esta informação é importante para que estimule novos estudos em relação à expressão gênica, crescimento e respostas metabólicas em *E. grandis* e espécies relacionadas, já que as informações da constituição gênica foram disponibilizadas publicamente.

3.3 Composição da parede celular

A parede celular é uma estrutura pertencente a célula vegetal, constituída por agrupamentos de macromoléculas heterogêneas, dentre elas, polissacarídeos, proteínas e substâncias fenólicas. A parede celular é uma estrutura muito complexa e possui diversas funções, tais como, proporcionar rigidez mecânica, controlar a expansão celular e transportes intracelulares, proteger a célula de organismos patogênicos e predadores (Taiz & Zeiger, 2013).

A parede celular é dividida por três regiões distintas na maioria das plantas: parede primária, parede secundária e lamela média.

A parede celular primária é formada durante o crescimento celular, sendo delgada, estruturada de forma simples, porém algumas podem ser espessas e multiestratificadas. São formadas por microfibrilas de celulose, polissacarídeos não-celulósicos (hemicelulose e pectina) e proteínas estruturais, a parede primária é produzida por células em expansão.

A parede celular secundária é formada após cessar a expansão da célula. Situa-se entre a membrana plasmática e a parede primária da célula, é estruturalmente mais

complexa. As células apresentam sistema condutor de água (xilema), fibras e vasos com paredes secundárias espessas, multiestratificadas e impermeáveis pela presença da lignina. É formada por uma fina camada de microfibrilas de celulose, microfibrilas mais espessas que conferem propriedades físicas e mecânicas a célula e terceira camada fina de microfibrilas (Taiz & Zeiger, 2013).

A lamela média é uma camada delgada, não lignificada, sendo localizada entre paredes celulares vizinhas, enriquecidas com polissacarídeos pécticos (pectinas), podendo ser incorporados com glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs). Tendo como principal função ser uma camada adesiva flexível entre as células (Rowell, 2005).

A parede celular é composta por biopolímeros tridimensionais, sendo composta por celulose, hemicelulose e lignina. A lignina que está presente na parede celular secundária dos vegetais com proporção de 70% (Rowell, 2005). É formada por um complexo heteropolímero polifenólico, sendo o polímero mais abundante depois da celulose. É um regulador biológico que confere rigidez mecânica, impermeabilidade, auxilia na condução de água, resistência a biodegradação, fundamental mecanismo de defesa e atua preenchendo os espaços entre e entorno da celulose e hemicelulose, conferindo suporte a estrutura da biomassa (Bhuiyan et al., 2009).

Esta macromolécula é formada pela polimerização oxidativa de 3 precursores de álcool p-hidroxicinamil, chamados de monolignóis, são eles, hidroxifenil (H) (não metoxilada, derivada do álcool p-cumarílico), guaiacil (G) (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) e siringil (S) (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico), que se diferem na composição da metilação no anel aromático (Baucher, 2003). Em angiospermas, a lignina é produto do tipo guaiacil-siringil (LGS), oriunda da copolimerização dos álcoois coniferílico e sinapílico (Rowell, 2005).

Nas plantas, o processo de lignificação ocorre com a formação dos monolignóis, transporte para a parede celular e polimerização. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina, são os compostos de início para a biossíntese da lignina pela rota do ácido cinâmico (Hatfield e Vermerris, 2001). A deposição desse polímero confere rigidez e proteção da parede celular contra patógenos e degradação microbiana (Vanholme, 2010).

Os monômeros da lignina são formados pela ação de dez enzimas: fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (4CH), 4-coumarato CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA:shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT), p-cumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), ferulato 5-hidroxilase

(F5H), cafeato O-metiltransferase (COMT), cinamoil-CoA redutase (CCR), cinamil álcool desidrogenase (CAD) (Vanholme et al., 2010). Os monolignóis são sintetizados no citoplasma e transportados para a parede celular através da membrana celular por intermédio de transportadores do tipo ABC (Liu et al., 2011).

Nos últimos anos, diversos estudos foram feitos sobre a via de biossíntese da lignina, pois há grande interesse neste tema devido à possibilidade de se obter plantas mais adequadas aos processos de deslignificação usados na indústria de celulose e papel, e também na crescente indústria de conversão da biomassa lignificada em etanol (Vanholme, 2008).

A figura 1 mostra esquematicamente a rota biossintética da lignina a partir da desaminação da fenilalanina através da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), levando à síntese do grupo cinamoil-CoAs (Chen *et al.*, 1999)

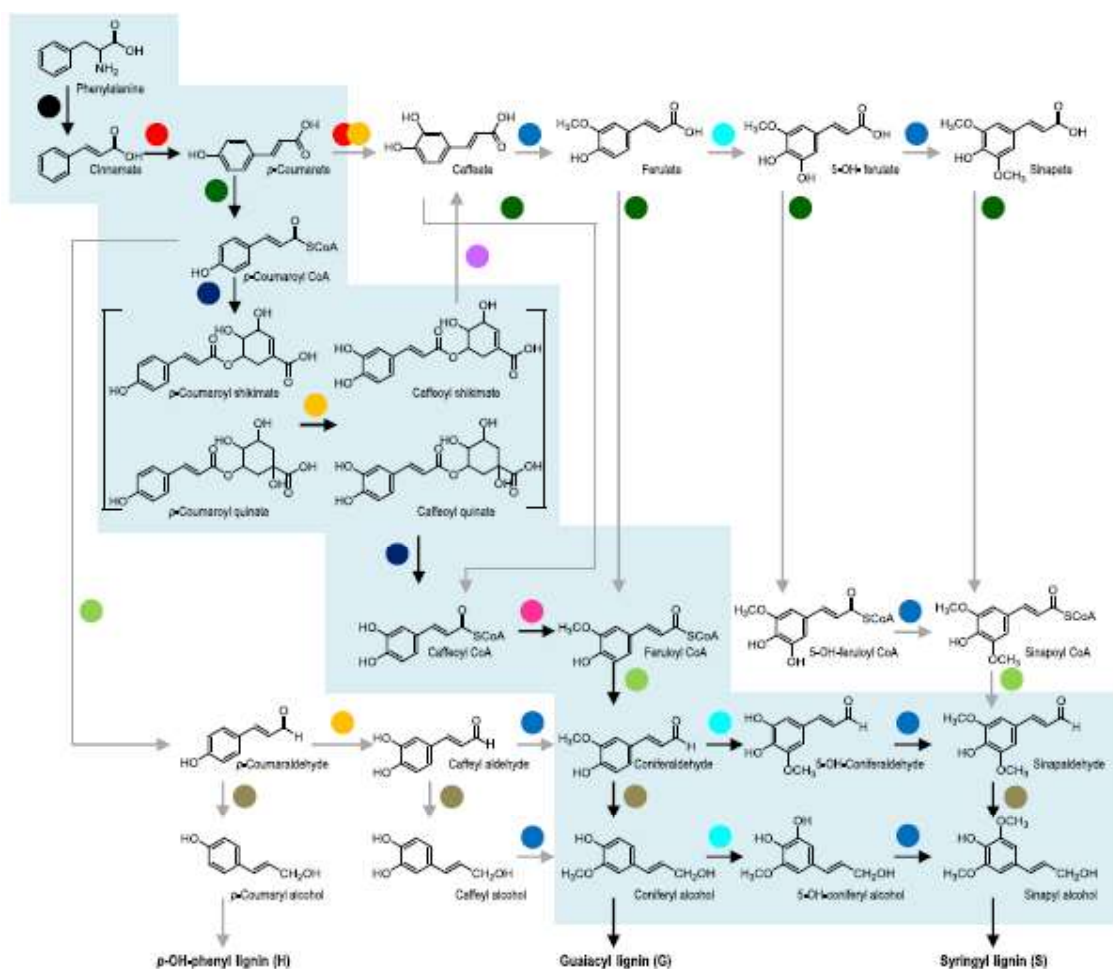


Figura 1: Rota biossintética da lignina. Os círculos coloridos indicam os genes que formam o “toolbox” da lignina em *Eucalyptus*, descrito por (Carocha *et al.*, 2015). As setas em preto representam as reações bioquímicas catalisadas pelas mesmas. Adaptado: Carocha *et al.*, 2015

Em árvores, os tecidos vasculares secundários são oriundos da atividade dos meristemas secundários que promovem o crescimento secundário em espessura do caule. A madeira é amplamente utilizada na indústria de construção de papel e celulose. Recentemente, o aumento global pelo consumo de madeira acarreta uma maior compreensão molecular sobre o desenvolvimento do tronco de arbóreas para melhorar a reprodução de árvores (Baucher *et al.*, 2003).

Durante o processo de diferenciação celular, na parede celular primária, as células jovens do xilema são alongadas e sem aumento de largura, em decorrência do aumento do diâmetro há a formação da parede celular secundária a partir dos elementos de vaso, fibras ou parênquima (Déjardin *et al.*, 2010).

Após essa expansão, a parede secundária é formada e há formação de uma matriz densa de microfibrilas de celulose localizadas transversalmente, limitando a expansão radial. A primeira camada formada é chamada de S1, com característica de ter ângulo microfibrilar quase transversal, a segunda camada é a S2 que tem arranjo longitudinal e camada mais espessa. A última camada é chamada de S3, oriunda de uma abrupta reorientação das microfibrilas retornando a orientação transversal. Estas mudanças na orientação das microfibrilas são sempre paralelas a reorientação dos microtúbulos corticais (Mellerowicz *et al.*, 2001).

Com a finalização da formação dos vasos e fibras na parede celular secundária, inicia o processo de lignificação. A deposição de lignina é gradualmente associada à hemicelulose presente na parede celular, eliminando água e tornando as células impermeáveis e rígidas (Déjardin *et al.*, 2010). A lignificação inicia nos elementos de vaso e células da parede secundária, posteriormente as fibras e células isoladas. A lignina é detectada primeiro na lamela média, nos cantos das células, quando completada a deposição da camada S1. Sequencialmente, avança para o interior durante a formação da camada S2, sendo mais intensa na formação da camada S3 até toda a parede ser lignificada (Mellerowicz *et al.*, 2001).

Quando o processo de lignificação é concluído, as células sofrem morte celular programada, a membrana se dissocia no vacúolo e há liberação de hidrolases

específicas, o pH citosólico baixo ativa hidrolases citosólicas que fazem as organelas e o núcleo desaparecerem. As células do parênquima permanecem vivas e funcionais por um longo tempo, mesmo que tenham sido lignificadas, depois de um tempo elas irão morrer e se tornarão parte do cerne da árvore. (Déjardin et al., 2010)

3.4 A proteômica de plantas

O termo proteômica foi utilizado pela primeira vez na década de 1990 por Marc Wilkins em referência ao termo genômica, que descreve toda a coleção de genes em um organismo (Liebler, 2002).

Segundo Wilkins et al. (1995) o proteoma é o complemento expresso de um genoma, ou seja, são todas as proteínas codificadas por um genoma. Mesmo a expressão gênica revelando informações importantes, como a abundância de mRNA, nem sempre esta informação é correlacionada com a abundância de proteínas expressas. Isso porque a abundância de proteínas expressas depende da transcrição, tradução e modificações pós-traducionais que podem resultar na modificação da função das classes proteicas (Chen & Harmon, 2006).

Neste sentido, a proteômica é uma ferramenta muito importante para o estudo de sistemas biológicos complexos e dinâmicos, pois permite a análise de um vasto número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, fornecendo informações sobre o estado biológico ou mudanças sistêmicas (Chen & Harmon, 2006).

A proteômica tem por objetivo caracterizar mudanças na abundância de proteínas em sistemas biológicos, sendo necessários procedimentos que sejam muito sensíveis e acurados. O'Farrell (1975) publicou um trabalho que mostrava resultados da caracterização do proteoma a partir da eletroforese bidimensional. Porém, esta técnica tem limitações na sensibilidade e é ineficiente para analisar proteínas insolúveis. Afim de solucionar esta limitação, a proteômica do tipo "shotgun" tem como metodologia digerir proteínas de alta complexidade obtendo peptídeos, seguida pela separação em cromatografia líquida e análises por espectrometria de massas (Old et al., 2005).

Atualmente, há uma grande variedade de métodos de quantificação de proteínas a partir da espectrometria de massas envolvendo marcações isobáricas de peptídeos. Há limitações neste método, como a utilização de grandes quantidades de material

biológico e alto custo dos reagentes. Neste sentido, os métodos de quantificação que não utilizam marcação têm sido usados com frequência e são mais baratos. Destaca-se a quantificação por contagem espectral que tem alta eficiência, consiste em analisar o número de espectros de fragmentação (MS2) adquiridos e confrontados em bancos de dados para identificação da proteína (Old et al., 2005).

Na literatura, encontramos nos artigos as palavras “gel eletroforese” e “proteômica” representando cerca de 30% das publicações em proteômica entre os períodos de 2000-2005 (Jorrín-Novo et al., 2009). Dentre eles, a grande maioria dos estudos de proteômica de plantas tratam de caracterizar o perfil do proteoma de vários órgãos, tecidos, células e organelas das principais culturas. Segundo Gion et al. (2005), estudos em espécies arbóreas são feitos em relação à formação da parede celular, através da comparação de tecidos sob diferentes idades e condições ambientais. As pesquisas com eucalipto são recentes, Cledon et al. (2007) descreveram as principais proteínas expressas durante a formação da madeira juvenil de *Eucalyptus grandis* em três diferentes idades.

Recentemente, foi divulgado o proteoma do arroz (*Oriza sativa* L.) (Agrawal & Rakwal, 2006), utilizando as técnicas de gel 2D, espectrometria de massas, sequenciamento de Edman e tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPit), muitas proteínas e genes foram identificados a partir de folhas, órgãos reprodutivos, raízes, sementes e organelas de arroz (Imin et al., 2004). Milho e trigo também já tiveram seu proteoma analisados quando submetidos a estresses bióticos e abióticos (Majoul et al., 2004). *Pinus pinaster* foi a primeira árvore a ter seu proteoma analisado, onde foram caracterizados 63 proteínas relacionadas com os tecidos fotossintetizantes e xilema (Costa et al., 1999).

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e condições de cultivo

Mudas clonais de *Eucalyptus urophylla* (I-144) com aproximadamente 30 dias de crescimento foram adquiridas em tubetes no viveiro AGRIFLORA (Araraquara - SP), transferidas para vasos de 15L contendo substrato florestal e cultivadas por uma semana na estufa do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal – SP). Após esse período, as mesmas foram acondicionadas em câmaras de crescimento (Fitotron - Weiss Gallenkamp) a 27 °C de temperatura, 40% de umidade relativa, 12 horas de fotoperíodo e concentrações de dióxido de carbono controladas: 410 ppm (controle), 700 ppm (tratamento) 980 ppm (tratamento). Após 30 dias de cultivo, um segmento de 20 cm da parte mediana dos caules jovens (Figura 2) foi coletado e submetido às análises para massa seca, anatomia caulinar, quantificação de lignina e espectrometria de massas. O delineamento utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC).



Figura 2: Planta *Eucalyptus urophylla*. A chave vermelha indica a porção de 20 cm da região mediana do caule a ser utilizado.

4.2 Massa seca

Para determinar a massa seca, dois lotes de plantas tiveram porções caulinares pesadas para obter o peso da massa fresca, secas no liofilizador por 24 horas, após o material foi pesado por 3 vezes até obter peso constante e por fim, peso da massa seca. Ao mesmo tempo, dois lotes de plantas foram cultivadas por 30 dias em câmaras de crescimento nas concentrações de 410 ppm e 700 ppm respectivamente, as porções caulinares foram pesadas para obter o peso da massa fresca, secas no liofilizador por 24 horas, após o material foi pesado por 3 vezes até obter peso constante e por fim, peso da massa seca.

Cada lote foi composto por 10 plantas, sendo 5 repetições biológicas com dois caules cada. A análise estatística foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk a 95% de confiança.

4.3 Avaliações anatômicas

Porções caulinares de *Eucalyptus urophylla* foram fixadas em FAA (álcool butílico 95%, ácido acético glacial, formaldeído 30-40% e água destilada) (Johansen, 1940) e, posteriormente, desidratados utilizando uma série crescente de álcool absoluto (70%, 85%, 95% e 100%). As amostras desidratadas foram incluídas em parafina, cortadas com micrótomo (10 μ m) e, finalmente, foram confeccionadas lâminas contendo os cortes histológicos. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina (O'Brien et al., 1964) e Ácido Periódico-Schiff (PAS) (Pearse, 1980). A montagem da lâmina com lamínula foi realizada utilizando bálsamo-do-canadá.

Para o preparo das lâminas, a porção mediana de cada amostra caulinar foi dividida em 5 segmentos de até 1cm e cada valor médio registrado para os tecidos das plantas controle e tratamento foi composto por 50 medições. Utilizando a régua na ocular do microscópio de luz foram feitas medidas de espessura dos seguintes tecidos: córtex, floema secundário, xilema secundário e parênquima medular. As imagens foram feitas com auxílio do microscópio de luz LEICA DM 1000 LED com câmera acoplada. Para análise da densidade ótica utilizou-se o programa ImageJ. A análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney a 95% de confiança.

4.4 Teor de lignina caulinar

Para determinar o conteúdo de lignina, o material coletado foi desidratado em estufa e completamente pulverizado. Posteriormente, o material foi lavado extensivamente em água quente até a adição de solução de tolueno e álcool (2:1, v/v) por 10 min. Finalmente, as amostras foram secas em estufa por 3 horas à 105°C.

Uma alíquota de 0,3 g do material foi então transferida para um balão volumétrico. Adicionou-se ácido sulfúrico e manteve-se a mistura por 1h a 25°C. Finalmente, foi adicionada água deionizada e a mistura foi mantida em estufa por 2 horas. O material foi então filtrado e pesado em balança analítica.

Para as determinações do conteúdo de lignina, foram utilizadas cinco repetições biológicas no controle e tratamento, em cada repetição foi utilizado três caules de plantas. Foi realizada a análise estatística segundo o teste de Shapiro-Wilk a 95% de confiança.

4.5 Análises em espectrometria de massas

Alíquotas de 2g de material pulverizado em nitrogênio líquido foram solubilizadas em 10 mL de tampão de amostra (125 mM Tris pH 6,8, 20% glicerol, 1% SDS, 1% DTT). Após agitação das amostras e centrifugação à 3200 rcf (15 min, 4°C), o sobrenadante foi transferido para um novo frasco. As proteínas foram então semi-purificadas por precipitação (12 h à -30°C), após adição de 10x volume de acetona em relação ao volume da amostra. Finalmente, o pellet protéico foi ressuspendido em 75 µL tampão de amostra. A quantidade de proteínas isoladas foi estimada pelo método de Bradford, utilizando a proteína albumina bovina sérica como padrão.

Previamente às análises por espectrometria de massas, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Para tanto, 100 µg de proteínas foram submetidas à migração (a 20 mA) por apenas 30 min (1 cm de deslocamento). A visualização da migração parcial foi realizada por coloração com Coomassie Coloidal durante 16h. Finalmente, cada banda protéica foi segmentada em quatro partes e as proteínas digeridas por adição de 4 µg de tripsina por reação (Shevchenko et al., 2006). A eluição dos peptídeos digeridos foi realizada utilizando 5% ácido fórmico:acetonitrila (1:2, v/v) por três ciclos de 15 minutos, seguidos de um ciclo de 10 minutos de acetonitrila 100%.

Os peptídeos tripticos foram separados em sistema cromatográfico de alto desempenho (LC Thermo Finnigan Surveyor com válvula de derivação em linha para

obter taxas de fluxo nano-LC) por 120 min, em coluna de fase reversa (150µm, 15 cm de comprimento, empacotada com Hamilton C18 HxSil) e utilizando gradiente de água e acetonitrila em concentrações crescentes. Os espectros de massas foram adquiridos em um instrumento do tipo LTQ-Orbitrap XL (Thermo) operado no modo positivo. Os peptídeos selecionados para fragmentação foram excluídos do próximo ciclo de aquisição de dados por 20s.

A identificação das proteínas foi realizada pela abordagem de correlação espectral e as sequências de proteínas do genoma da espécie *Eucalyptus grandis* v. 2.0 foram obtidas a partir do website Phytozome (Goodstein et al., 2012). As buscas contra o banco de dados foram realizadas a partir do programa PatternLab for Proteomics version 4.1.0.12 pela ferramenta Comet (Eng; Jahan; Hoopmann, 2013) utilizando a carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina, como modificação estática e dinâmica respectivamente. Os alinhamentos de espectros peptídicos PSM (“peptide spectrum matches”) foram filtrados utilizando o software SePro (Carvalho et al., 2012, 2016) e a taxa de falsos positivos (FDR) ajustados para 1%. As proteínas que compartilharam peptídeos comuns foram agrupados de acordo com o princípio da máxima parcimônia. A abundância do peptídeo comum da proteína COMT1 (Eucgr.A01397) foi registrado utilizando a abordagem do “normalized ion abundance factor” (NIAF) normalizado dividindo a área do pico cromatográfico do peptídeo comum pela soma da área do pico cromatográfico de todos os peptídeos. Adicionalmente, os componentes celulares das proteínas foram determinados via Blast2GO (Conesa et al., 2005) e o NIAF das proteínas relacionadas à parede celular foram determinados e identificados (Tabela 1S). Foram utilizadas três repetições biológicas do controle e do tratamento, em cada repetição foram utilizados três caules, a análise estatística segundo o teste de Shapiro-Wilk a 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de *E. urophylla* apresentaram aumento de massa seca quando cultivadas a 410 ppm (Figura 3), diferentemente foi encontrado quando cultivadas a 700 ppm não havendo diferença na quantidade de massa seca.

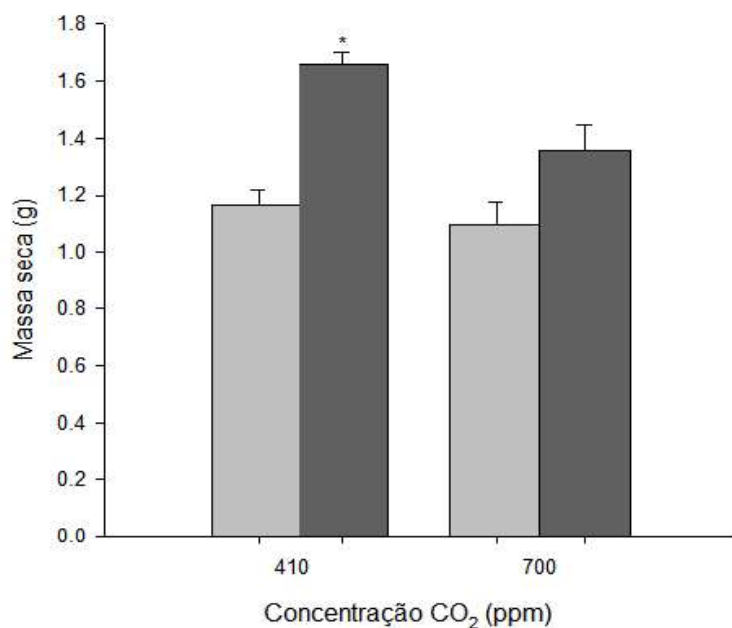


Figura 3: Massa seca de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla*. Barras cinza escuro são plantas que foram cultivadas por 30 dias nas concentrações de CO₂ de 410 ppm e 980 ppm. Barras cinza claro representam as plantas que não tiveram contato com estas duas concentrações de CO₂.

As plantas jovens de *E. urophylla* apresentaram alteração na estrutura anatômica após cultivo à 980ppm de CO₂ por 30 dias. Houve diferença significativa entre as plantas cultivadas a 410 e 980 ppm em relação à espessura do córtex (Figura 4A), floema secundário (Figura 4B) e xilema secundário (Figura 4C). Contrariamente, não foi observada diferença no parênquima medular das plantas submetidas ao estímulo aqui avaliado (Figura 4D). Tais variações podem ser o resultado do aumento do volume celular que ocorreu nas plantas cultivadas em alta concentração de CO₂. Evidenciando os efeitos do cultivo em alta concentração de CO₂ na diferenciação tecidual de plantas de eucalipto.

Resultado semelhante foi encontrado por Domec et al., 2017, em que plantas cultivadas em ambientes com elevado CO₂ tiveram aumento na espessura do xilema e consequentemente espessamento na parede celular. Pritchard et al., 1999, observou aumento modesto na biomassa total do caule, por aumento no diâmetro do caule e não com comprimento do caule, indicando a alocação preferencial de carbono para o crescimento secundário (xilema e floema) sobre o crescimento primário..

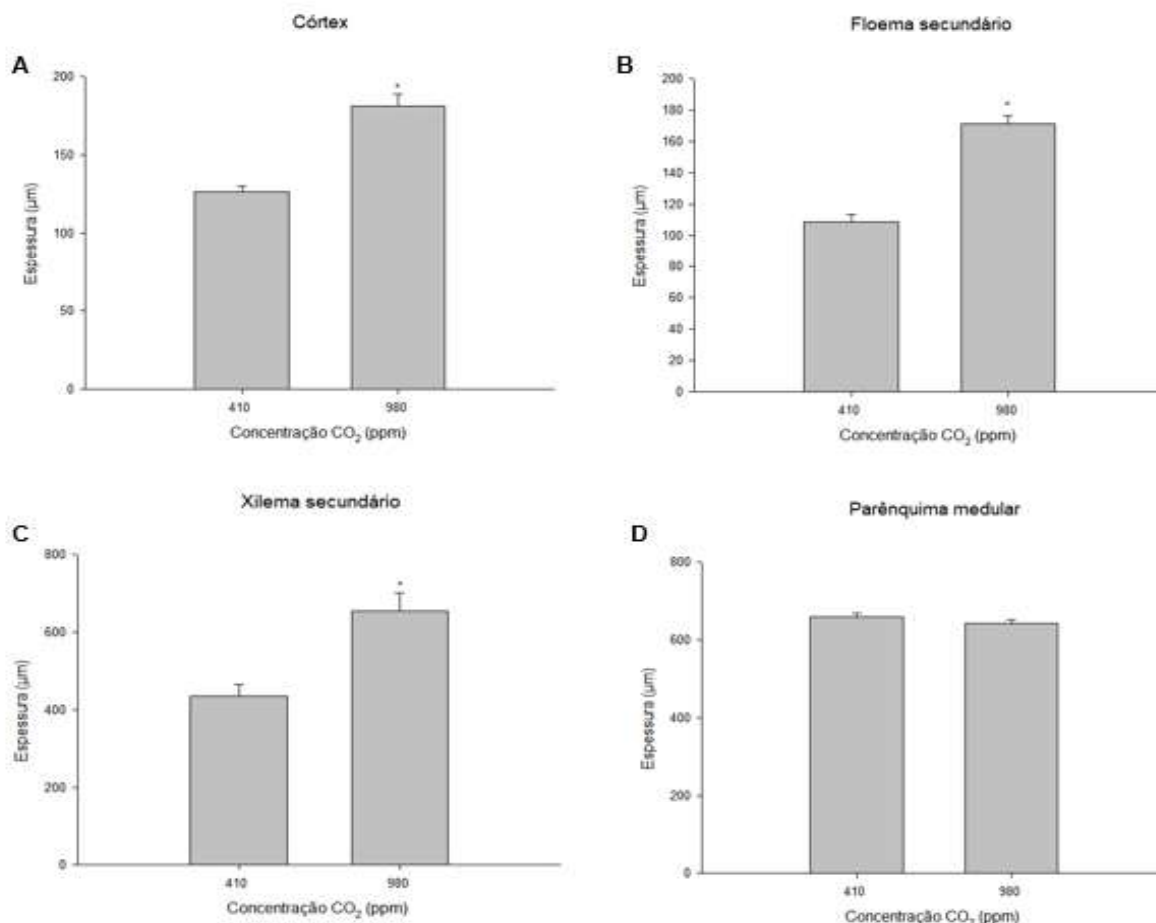


Figura 4: Espessura dos tecidos caulinares de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias nas seguintes concentrações de CO₂: 410 e 980 ppm. Espessura do córtex (A), floema secundário (B), xilema secundário (C) e parênquima medular (D). Nos gráficos, os asteriscos indicam diferença significativa de acordo com o teste Mann-Whitney Rank Sum ($p < 0,05$).

A coloração conjunta de Azul de Toluidina e PAS permitiu maior detalhamento dos tecidos em análise. Quando as plantas jovens de *E. urophylla* foram cultivadas em alta concentração de CO₂, o xilema secundário apresentou um segundo padrão de coloração. Este tecido recém-diferenciado de xilema secundário apresentou menor

reação com o corante Azul de Toluidina, que em pH 6.8 cora tecidos com parede celular secundária de azul, detectando lignina. Já paredes arroxeadas sugerem a detecção de celulose e hemicelulose (polissacarídeos), sugerindo menor acúmulo de lignina nesses novos tecidos do xilema secundário (Figura 5A e 5B). O estudo da densidade ótica desse tecido corroborou quantitativamente com a menor coloração observada visualmente (Figura 5C), enquanto o tecido condutor adjacente apresentou a mesma densidade ótica do xilema secundário das plantas cultivadas em baixa concentração de CO₂ (410ppm). O tecido recém-diferenciado tem espessura de 39% em relação ao total do xilema secundário (Figura 5D). Esses resultados sugerem que esse tecido foi diferenciado em condições de alta concentração de CO₂ e que as células do mesmo apresentam menores quantidades de lignina depositada em suas paredes.

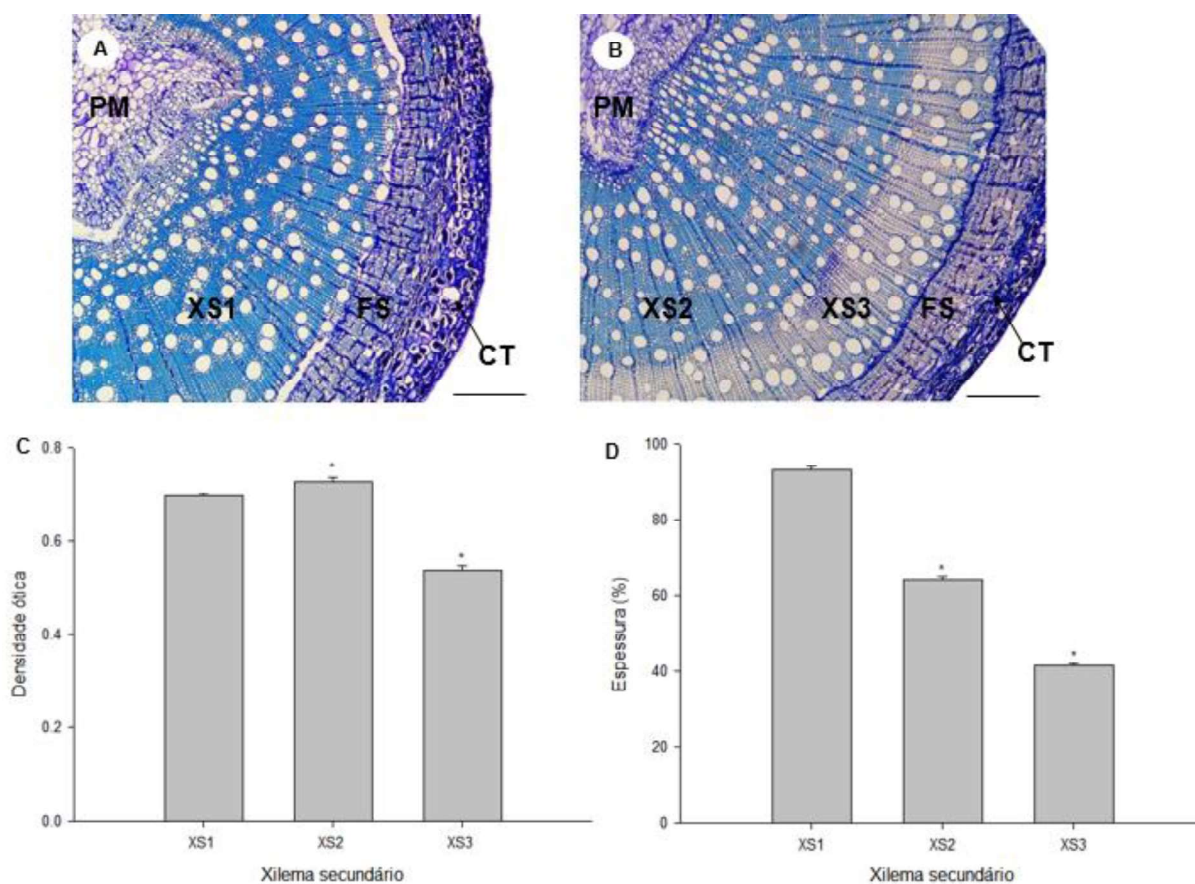


Figura 5: Imagens de microscopia de campo claro da secção transversal do caule de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias. Imagem do caule de plantas mantidas na concentração de 410 ppm, aumento de 4x e escala de 100 μ m (A), imagem do caule na concentração de 980 ppm, aumento de 4x e escala de 100 μ m (B). CT, córtex; FS, floema secundário, XS, xilema secundário; PM, parênquima medular. Densidade ótica do XS1, XS2 e XS3, XS representa xilema secundário (C). Proporção

da espessura em porcentagem dos XS1, XS2 e XS3 (D). Nos gráficos, os asteriscos indicam diferença significativa de acordo com o teste Mann-Whitney Rank Sum ($p < 0,05$).

Plantas cultivadas nas concentrações de CO₂ iguais a 410 ppm e 980 ppm não apresentaram diferença significativa em relação ao acúmulo de lignina (Figura 6A). Além disso, a quantificação do peptídeo da enzima-chave na biossíntese de lignina (Figura 6B), a COMT1, não indicou variação na biossíntese de lignina nos caules jovens de *E. urophylla*. Tais resultados sugerem que alterações no metabolismo da lignina ocorram somente nos tecidos recém-diferenciados, já que nas análises de teor de lignina e na quantificação da enzima COMT1 foi utilizado tecido caulinar total e não somente o tecido recém-diferenciado.

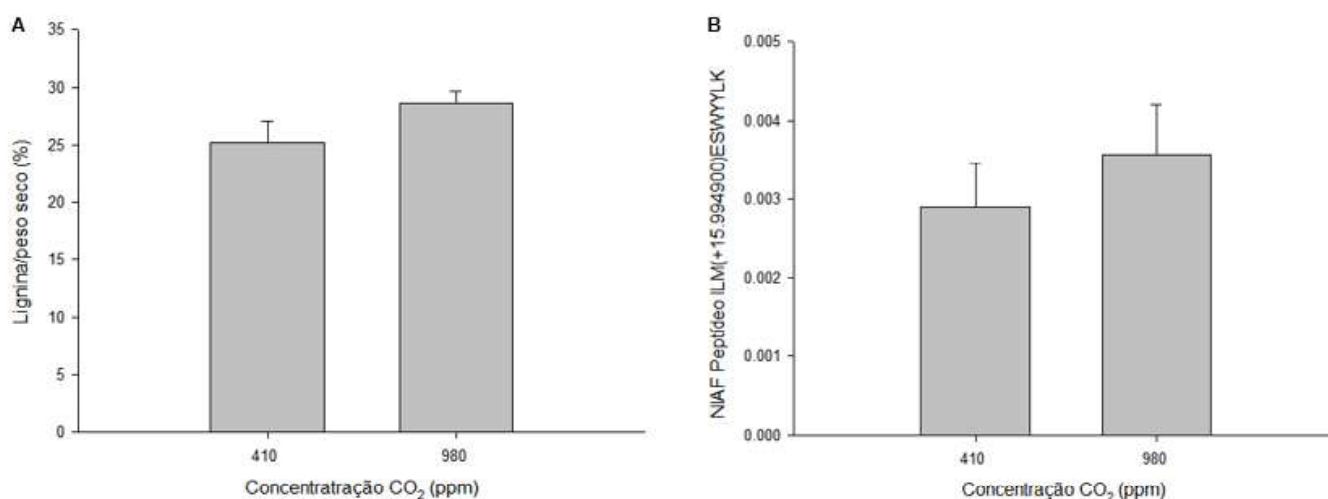


Figura 6: Conteúdo de lignina de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas por 30 dias em duas concentrações de CO₂: 410 e 980 ppm (A), fator de abundância de íons normalizado (NIAF) do peptídeo ILM(+15.994900)ESWYYLK da proteoforma COMT1 (B). Nos gráficos, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

Resultado semelhante foi encontrado pelos autores K. Kim et al., (2015) em que plantas *Liquidambar styraciflua* foram submetidas a duas concentrações diferentes de CO₂ (391ppm e 550ppm) por 11 anos. A porcentagem de lignina teve tendência de diminuição quando comparada com o controle. Porém, este resultado não apresentou

diferença significativa em lignina quando comparado o controle com a condição de aumento de CO₂.

Estas informações também corroboram com trabalhos anteriores (Olszyk et al., 2005; Atwell et al., 2003), que mostram que não há diferença significativa nos componentes estruturais da madeira quando a concentração de CO₂ é elevada (Norby et al., 2010).

Gibeaut et al., (2001) especulam que o aumento ou diminuição do acúmulo de lignina é decorrente de um maior ou menor direcionamento de carboidratos para a parede celular e/ou ao aumento/diminuição de atividades enzimáticas em alta concentração atmosférica de gás carbônico. Entretanto, em outras espécies arbóreas como *Betula pendula* o conteúdo de celulose, ácidos urônicos e lignina apresentaram diminuição em alto CO₂, indicando que árvores tendem a investir mais carboidratos no crescimento (respiração e divisão celular) em detrimento dos componentes da parede celular quando cultivadas sob elevada concentração de gás carbônico (Oksanen et al., 2005, Poorter et al., 1997).

A quantidade e composição da lignina varia nos tecidos e células, camadas da parede celular e condições ambientais (Rencoret et al., 2011). Com o aumento do CO₂, a planta pode realocar esqueletos de carbono para crescimento, espessamento da parede celular e lignificação. A biossíntese da lignina inicia com o aminoácido fenilalanina e no final formam três monolignóis, que diferem no grau da metoxilação do anel aromático, sendo hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringa (S) (Carocha et al., 2015). O monolignól siringila é formado por meio da metilação do 5-hidroxiconiferil aldeído em sinapaldeído por meio da proteína COMT (Eucgr.A01397). A proteína COMT1 tem alta expressão no desenvolvimento do xilema e formação de lignina (Carocha et al., 2015).

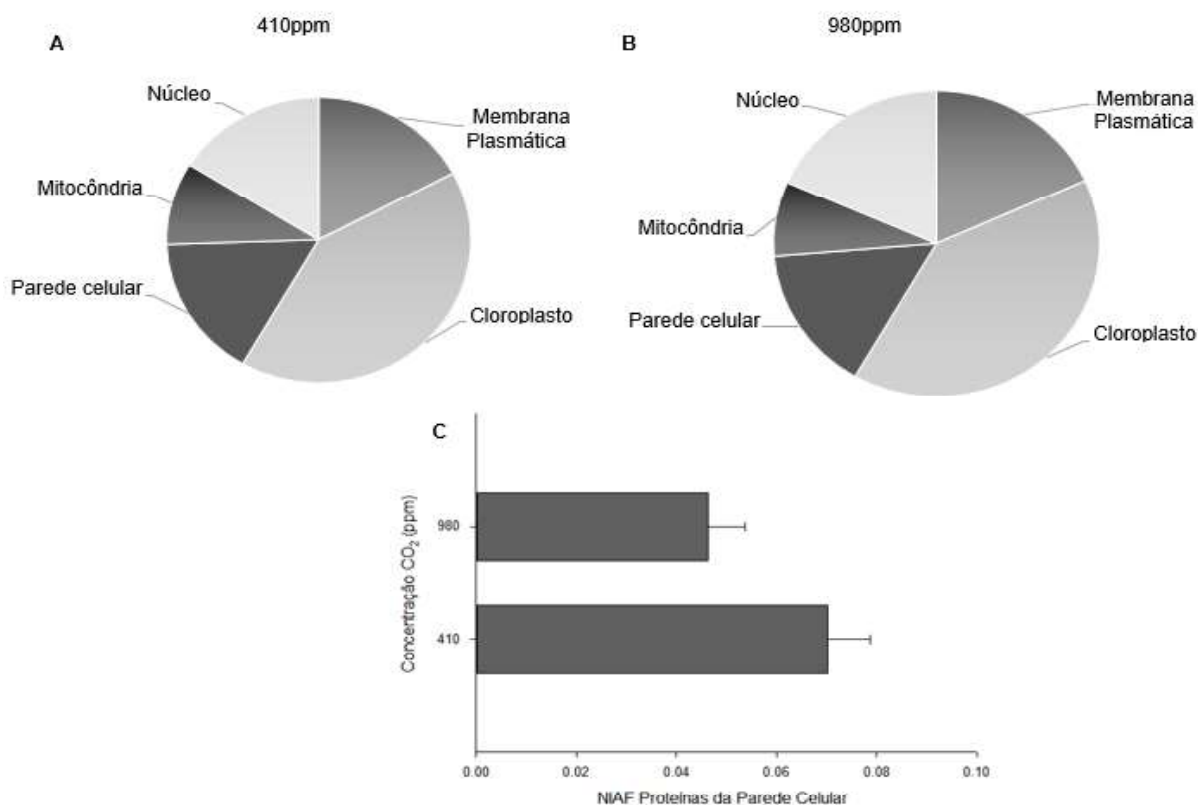


Figura 7: Classificação funcional, segundo o termo componente celular, das 56 proteínas identificadas em caules de *Eucalyptus urophylla*. Proteínas identificadas em *Eucalyptus urophylla* cultivadas na concentração de CO₂ a 410ppm (A). Proteínas identificadas em *Eucalyptus urophylla* cultivadas na concentração de CO₂ a 980 ppm (B). Fator de abundância de íons normalizado (NIAF) das proteínas pertencentes a parede celular (C). No gráfico, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

Foram identificadas 56 proteínas (Tabela 1S) nos caules jovens de plantas *E. urophylla* cultivadas a 410 e 980 ppm. Considerando a localização celular das identidades em núcleo (GO:0005634), mitocôndria (GO:0005740), parede celular (GO:0005618), cloroplasto (GO:0009507) e membrana plasmática (GO:0005886) (Figura 7 A e B), não foi verificada alteração na proporção das proteínas classificadas em cada um desses termos. Além disso, a análise quantitativa das proteínas classificadas como sendo de parede celular (Figura 7C) não indicou variação entre os tratamentos de CO₂. Esses resultados sugerem que não houve aumento na biossíntese de enzimas relacionadas ao acúmulo dos componentes da parede celular (celulose e lignina) e de proteínas estruturais de parede. Como não foram detectadas variações na

quantidade da enzima-chave da biossíntese de lignina COMT1 e foram verificados aumentos na espessura de diferentes tecidos caulinares, os resultados aqui indicados corroboram com aqueles verificados na Figura 5 em que novos tecidos caulinares foram diferenciados quando as plantas foram submetidas a altas concentrações de CO₂ e que esses tecidos possivelmente apresentam menor quantidade de lignina depositada.

6. CONCLUSÃO

A alta concentração de CO₂ (980ppm) atmosférico induziu no aumento do número de células e de camadas celulares em mudas de *Eucalyptus urophylla*. Entretanto, este estímulo não resulta em aumento no teor total de lignina.

7. REFERÊNCIAS

Agrawal G. K., Jwa N. S., Iwahashi Y., Yonekura M., Iwahashi H., Rakwal R. (2006) Rejuvenating rice proteomics: Facts, challenges, and visions. *Proteomics* 6:5549-5576.

Aspinwall, M. J., Loik M. E., Resco, D. V, Tjoelker, M. G., Payton, P.R., Tissue, D.T. (2015). Utilizing intraspecific variation in phenotypic plasticity to bolster agricultural and forest productivity under climate change. *Plant Cell Environ.* 38:1752–1764.

Atwell, B. J.; Henery, M. L.; Whitehead, D. (2003). Sapwood development in *Pinus radiata* trees grown for three years at ambient and elevated carbon dioxide partial pressures. *Tree Physiology*, 23:13-21.

Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M, Boerjan W. (2003) Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38:305–350.

Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J. 2009. Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 4:158–159.

BRASIL. II (1974). Plano Nacional de Desenvolvimento (1975-79). Brasília: Imprensa Oficial.

Carocha, V.; Hefer, C.; Cassan-Wang H.; Fevereiro, P.; Alexander, A.; Paiva, J. A. P.; Grima-Pettenati, J. (2015) Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* 4:1297–1313.

Carvalho, P. C.; Fischer, J. S.; Xu, T.; Yates, J. R.; Barbosa, V. C. (2012) PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 13:13-19.

Carvalho, P. C.; Lima, D. B.; Leprevost, F.V.; Santos, M.D.; Fischer, J. S.; Aquino, P.F; Moresco J. J; Yates J. R; Barbosa, V. C. (2016). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature protocols.*

Cai, W. J., Cowan, T., Thatcher, M. (2012). Rainfall reductions over Southern Hemisphere semi-arid regions: the role of subtropical dry zone expansion. *Sci. Rep.* 2:702.

Chen, F.; Yasuda, S.; Fukushima, K. (1999) Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. *Planta.*207:597-603.

Chen, S. X.; Harmon, A. C. (2006). Advances in plant proteomics. *Proteomics.* 6:5504-5516.

Chen, I. C., J. K. Hill, R. Ohlemuller, D. B. Roy, and C. D. Thomas. 2011. Rapid Range Shifts of Species Associated with High Levels of Climate Warming. *Science* 333:1024–1026.

Cledon, P. A. F. et al. (2007). Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. *Proteomics*. 7:2258-2274.

Conesa, A.; Gotz, S.; Garcia-Gomez, J. M.; Terol, J.; Talon, M.; Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21:3674–3676.

Déjardin, A.; Laurans, F.; Arnaud, D.; Breton, C.; Pilate, G.; Leple, J.C. (2010). Wood formation in Angiosperms. *C. R. Biol.* 4:325-334.

Domec, J. C.; Smith, D. D.; McCulloh, K. A. (2017). A synthesis of the effects of atmospheric carbon dioxide enrichment on plant hydraulics: implications for whole-plant water use efficiency and resistance to drought. *Plant Cell Environ.* 40:921-937.

ESRL - Earth System Research Laboratory, National Oceanic and Atmospheric Administration (2019). Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. Disponível em: <<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>> Acesso em: 15 ate. 2019.

Evans II, J. W.; Senft, J. F.; Green, D. W. (2000). Juvenile wood effect in red alder: analysis of physical and mechanical data to delineate juvenile and mature wood zones. *Forests Products Journal*, Madison. 50:75-87.

Fao. Global planted forests thematic study: results and analysis. (2006) In: LUNGO A.; BALL J.; CARLE J. (Eds.). *Planted Forests and Trees Working Paper 38*. Rome: Italy.

Gion, J. M. et al. (2005) The proteomie of maritime pine Wood forming tissue. *Proteomics*. 5:3731-3751.

Goodstein, D. M.; Shu, S.; Howson, R.; Neupane, R.; Hayes, R. D.; Fazo, J.; Mitros, T.; Dirks, W.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomic. *Nucleic Acids Res.* 40:1178-1186.

Hasegawa, S., MacDonald, C.A. and Power, S.A. (2016). Elevated carbon dioxide increases soil nitrogen and phosphorus availability in a phosphorus-limited *Eucalyptus* woodland. *Global Change Biology* 22:1628-1643.

Hatfield, R.; Vermerris, W. (2001). Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. *Plant Physiology*. 126:1351-1357.

Huang, J.G., Bergeron, Y., Dennerler, B., Berninger, F., Tardif, J., (2007). Response of forest trees to increased atmospheric CO₂. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26:265–283.

IBÁ. - Indústria brasileira de Árvores. (2015). Anuario estatístico da IBA: ano base 2014. 100.

IPCC - Climate change: the physical science basis. (2013). Cambridge University Press. 2231.

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

Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. New York: Mcgraw-Hill Book. 523.

Jorrín-Novo, J.V., Maldonado, M., Echevarría S. Z., Valledor, L., Castillejo, M.A., Curto, M. (2009) Second generation proteomic techniques, an appropriate experimental design and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and biological knowledge J. Proteome. 72:285-314.

Kim, K.; LABBLÉ, N.; WARREN, J. M.; ELDER, T.; RIALS, T. G. (2015). Chemical and anatomical changes in *Liquidambar styraciflua* L. xylem after long term exposure to elevated CO₂. Environmental Pollution 198.

Klabin. (2009). Relatório de sustentabilidade. 68.

Liebler, D. C. (2002). Introduction to proteomics: tools for the new biology. Humana Press: New Jersey. 3.

Liu, C.J., Miao, Y.C., and Zhang, K.W. (2011). Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. Molecules. 16, 710–727.

Majoul T., Bancel E., Triboï E., Ben H. J., Branlard G. (2004). Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from nonprolamins fraction. Proteomics 4:505–513.

McKIERNAN et al (2012) Stability of Plant Defensive Traits Among Populations in Two Eucalyptus Species Under Elevated Carbon Dioxide. Journal of Chemical Ecology. 38:204-212.

Mellerowicz, E.J.; Baucher, M.; Sundberg, B.; Boerjan, W. (2001). Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. Plant Mol. Biol. 47:239-274.

Mori B, Bellani LM. (1996) Coloração diferencial para paredes celulares de células celulósicas e modificadas. Biotech Histochem. 71: 71–2.

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.; Kullán, A. R. K.; Hussey, S. G.; Pinard, D.; Merwe, K.; Singh, P.; Jaarsveld, I.; Silva-Junior, O. B.; Togawa, R. C.; Pappas, M. R.; Faria, D. A.; Sansaloni, C. P.; Petrolí, C. D.; Yang, X.; Ranjan, P.; Tschaplinski, T. J.; Ye, C-Y.; Li, T.; Sterck, L.; Vanneste, K.; Murat, F.; Soler, M. M.; Clemente, H. S.; 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.; Lheim, C.K.; 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, JG. J.; Strauss, S.

H.; Jaiswal, P.; Grima-Pettenati, J.; Salse, J. J.; Van De Peer, Y.; Rokhsar, D. S.; Schmutz, J.. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*. 510:356-362.

Norby, R.J., Warren, J.M., Iversen, C.M., Medlyn, B.E., Mcmurtrie, R.E. (2010). CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.

O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*. 59: 368-373.

Old, W. M.; Meyer-Arendt, K.; Aveline-Wolf, L.; Pierce, K. G.; Mendoza, A.; Sevinsky, J. R.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. 4:1487-1502.

Olszyk, D., Apple, M., Gartner, B., Spicer, R., Wise, C., Buckner, E., Benson-Scott, A., Tingey, D. (2005). Xeromorphy increases in shoots of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco seedlings with exposure to elevated temperature but not elevated CO₂. *Trees-Struct. Funct.* 19:552-563.

Pearse, A. G. E. (1980). *Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical technology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1: 439.

Pimentel, C. (2011). Metabolismo de carbon de plantas cultivadas e o aumento de CO₂ e de O₃ atmosférico: situação e previsões. *Área básica*. Bragantia, Campinas. 70:1-12.

Portis, A. R.; Parry, M. A. J. (2007) Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): A historical perspective. *Photosynthesis Research*. 94:121–143.

Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM (1999) Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Glob Chang Biol*. 5:807–837.

Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Martínez, Á. T., José, C. (2009). Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood. *Industrial Crops and Products*. 30:137-143.

Rencoret, J., Gutiérrez, A., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Faulds, C. B., Kim, H., Ralph, J., Martínez, A. T., Río, J. C. (2011). Lignin composition and structure in young versus adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiology*. 155:667-682.

ROWELL, R. M. (2005). *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Boca Raton: CRC Press. 487.

Salomón, R. L., Steppe, K., Crous, K. Y., Noh, N.J., Ellsworth, D.S. (2019). Elevated CO₂ effects on stem respiration in a dry *Eucalyptus* woodland, but it shifts the vertical gradient in xylem [CO₂]. *Plant, Cell & Environment*. 42:2151-2164.

Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1:2856–2860.

SILVA, J.C. Cresce a presença do eucalipto no Brasil. (2005). *Revista da Madeira, Curitiba.* 92.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2013) *Fisiologia vegetal.* 5.ed. Porto Alegre: Artemed. 954.

Trugilho, P. F.; Lima, J. T.; Mendes, L. M.; (1996). Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus saligna*. *CERNE, Lavras.* 2:1-152.

Vanholme R, Brecht Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 3:895–905.

Vanholme, R.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W.; *Curr. Opin.* (2008) *Plant Biol.* 11: 278.

Voelker, S.L., Brooks, J.R., Meinzer, F.C., et al. (2016). A dynamic leaf gas-exchange strategy is conserved in woody plants under changing ambient CO₂: evidence from carbon isotope discrimination in paleo and CO₂ enrichment studies. *Global Change Biol.* 22, 889–902.

WANG, X.Z., (2007). Effects of species richness and elevated carbon dioxide on biomass accumulation: a synthesis using meta-analysis. *Oecologia* 152:595–605.

Wilking, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Apple, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L. (2015). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 13:19-50.

APÊNDICE

Tabela 1S. Proteínas caulinares identificadas por espectrometria de massas em mudas de *Eucalyptus urophylla* expostas nas seguintes concentrações de CO₂: 410 e 980ppm, conforme descrito no Material e Métodos. Proteínas pertencentes a classificação parede celular de componentes celulares obtidas pelo Blast2Go.

Identificação	Descrição funcional	NIAF - 410ppm	NIAF - 980ppm
Eucgr.F02754.1.p	Thioredoxin superfamily protein	0.004172	0.003719
Eucgr. I01035.1.p	serine carboxypeptidase-like 18	0.016364	0.005255
Eucgr.B02486.1.p	Fasciclin-like arabinogalactan (FLAs) 1b	0.006002	0.004875
Eucgr.J00938.1.p	Fasciclin-like arabinogalactan (FLAs) 2b	0.004751	0.003491
Eucgr.A01158.1.p	Fasciclin-like arabinogalactan (FLAs) 3b	0.01672	0.004294
Eucgr.C00146.1.p	Serine carboxypeptidase	0.003507	
Eucgr.A00746.1.p	Lipid transfer protein 4	0.007384	0.004571
Eucgr.F04198.1.p	Peroxidase	0.002516	0.00403
Eucgr.G01192.1.p	Serine carboxypeptidase	0.007633	0.003904
Eucgr. I01600.1.p	Lysosomal alpha mannosidase	0.003042	0.003085
Eucgr.D00484.1.p	Oryzain alpha chain like	0.008447	0.004845
Eucgr.C00147.1.p	Serine carboxypeptidase	0.008702	0.00323
Eucgr.A02888.1.p	Beta soluble isoenzyme	0.004252	0.003569
Eucgr.I00240.1.p	ACT7actin 7	0.013191	0.003851
Eucgr.G02544.1.p	voltage dependent anion channel 1	0.016159	0.0043

Eucgr.G03412.1.p	Citrate synthase family protein	0.003518	0.004906
Eucgr.B03603.1.p	Mitochondrial substrate carrier family protein	0.00632	0.005017
Eucgr.C00615.1.p	Profilin 8	0.009858	0.003177
Eucgr.K00264.1.p	tubulin beta 8	0.082841	0.006688
Eucgr.F04189.1.p	Small subunit ribosomal protein S18e	0.034896	0.023463
Eucgr.F02916.1.p	ATP Synthase Subunit Beta		0.004738
Eucgr.F01476.1.p	Phosphoglycerate kinase 1	0.016406	0.0160063
Eucgr.D02588.1.p	Large subunit ribosomal protein L13e	0.006	0.00373
Eucgr.I02018.1.p	voltage dependent anion channel 1	0.015431	0.011237
Eucgr.B00589.1.p	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit gamma	0.005161	0.00489
Eucgr.K03281.1.p	Small subunit ribosomal protein S20e	0.011369	0.004418
Eucgr.K01666.1.p	beta-6-tubulin	0.021042	
Eucgr.F03689.1.p	Fasciclin-like arabinogalactan protein 1	0.005753	0.003953
Eucgr.D01847.1.p	Tubulin	0.014521	0.006501
Eucgr.A02108.1.p	Tubulin alpha-5	0.011123	0.0041
Eucgr.K01232.1.p	Glutathione s-transferase	0.008159	0.008178
Eucgr.I01913.1.p	Thioredoxin H2	0.007518	0.003544
Eucgr.B00034.1.p	14-3-3 Protein	0.00978	0.014793
Eucgr.H00972.1.p	Chaperone protein htpG family protein	0.003287	0.01704

Eucgr.H01629.1.p	Thioredoxin F2	0.004754	0.004982
Eucgr.F01691.1.p	Thioredoxin superfamily protein	0.0172	0.003375
Eucgr.J02133.1.p	voltage dependent anion channel 1	0.019245	0.005871
Eucgr.A01732.1.p	receptor like protein-kinase related family protein	0.007338	0.004213
Eucgr.E03676.1.p	Small subunit ribosomal protein S27e	0.006863	0.017124
Eucgr.J02738.1.p	ATP synthase subunit beta	0.012198	0.014082
Eucgr.F00470.1.p	Tubulin alpha - 2	0.012428	0.006203
Eucgr.J01234.1.p	Rubisco activase	0.014652	0.005947
Eucgr.H04787.2.p	Annexin D1-related	0.0003623	
Eucgr.E01024.1.p	Heat shock protein 70KDA	0.008351	0.003649
Eucgr.D01093.1.p	Large subunit ribosomal protein L4e	0.002731	0.003271
Eucgr.K01666.1.p	Beta-6-tubulin	0.006392	0.002897
Eucgr.K01232.1.p	Glutathione s-transferase PHI 9	0.000749	0.008955
Eucgr.J01477.1.p	General regulatory factor 7	0.005392	0.005339
Eucgr.I02771.1.p	Heat shock 70KDA protein 6	0.00382	0.005772
Eucgr.C03199.1.p	Sucrose synthase 4	0.000735	0.005256
Eucgr.I00241.1.p	Actin 7	0.002746	0.0038403
Eucgr.K03205.1.p	Large subunit ribosomal protein L4e	0.0004723	0.040589
Eucgr.I01037.1.p	Serine carboxypeptidase-like clade I	0.002616	0.011574

Eucgr.C03525.1.p	Ribulose-bisphosphate carboxylase large chain (rbcL)	0.0006382	0.003139
Eucgr.C00962.1.p	Profilin -2	0.007154	0.00456
Eucgr.I01495.1.p	Basic chitinase	0.006196	0.003631