

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Modulação do estado redox em cloroplastos de *Eucalyptus*
urophylla por estímulo de CO₂**

Amanda Cristina Baldassi

Bióloga

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Modulação do estado redox em cloroplastos de *Eucalyptus*
urophylla por estímulo de CO₂**

Amanda Cristina Baldassi

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).

2018

Baldassi, Amanda Cristina
B175m Modulação do estado redox em cloroplastos de *Eucalyptus urophylla* por estímulo de CO₂ / Amanda Cristina Baldassi. – –
Jaboticabal, 2018
vi, 51 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Tiago Santana Balbuena
Banca examinadora: José Roberto Aparecido dos Santos Pinto,
Alessandro de Mello Varani
Bibliografia

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

CDU 631.52:634.0.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX EM CLOROPLASTOS DE *Eucalyptus urophylla* POR ESTÍMULO DE CO₂

AUTORA: AMANDA CRISTINA BALDASSI

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. TIAGÓ SANTANA BALBUENA
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Pós-doutorando JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO
UNESP / Instituto de Biociências - Rio Claro/SP

Pesquisador Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amanda Cristina Baldassi – nascida em 11 de setembro de 1991 em Araraquara-SP, é bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade de Araraquara – UNIARA (2010 - 2013). Entre 2011 e 2012 foi estagiária do laboratório de pureza genética na empresa Syngenta Seeds localizada em Matão, onde desenvolveu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Sementes de soja (*Glycine max* (L.) merrill) tratadas quimicamente: avaliação de diferentes tipos de substrato para germinação” sob orientação da Dra. Roseli Fátima Caseiro. No período entre 2012 e 2015 desempenhou a função de Analista de Laboratório na mesma empresa, trabalhando no setor de Controle de Documentos e no Laboratório de Análise de Sementes. Em 2016 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Santana Balbuena, pela oportunidade, confiança e apoio no decorrer de todo o trabalho e por ensinar sempre com muita paciência e disposição.

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

Ao meu noivo e melhor amigo, Rubens, por todo incentivo, apoio, compreensão e amor dedicados a mim nesse período.

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, Marília, Bruna, Felipe, Letícia, Patrícia e Emily, por todos os ensinamentos e momentos compartilhados.

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

A professora Dra. Priscila Lupino Gratão do Departamento de Biologia por ceder o espaço do seu laboratório para análises do trabalho.

Aos amigos e colegas que tiver o prazer de conhecer nesse período.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPESP pela concessão de recursos para execução do projeto (Processo 2015/23354-8).

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para execução desse trabalho

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> e o setor florestal	11
3.2. Mudanças climáticas e o efeito do enriquecimento de CO ₂ nas plantas	12
3.3. Formação de EROs e o sistema antioxidante de plantas expostas a fatores abióticos	15
3.4. A proteômica	18
3.5. A proteômica subcelular e os cloroplastos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Material vegetal e condições de cultivo	22
4.2. Análise estomática	22
4.3. Quantificação de Peróxido de Hidrogênio	23
4.4. Determinação da Peroxidação Lipídica	23
4.5. Avaliação da eficiência quântica do fotossistema II	24
4.6. Isolamento de cloroplastos	24
4.7. Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais	25
4.8. SDS-PAGE e digestão de proteínas	25
4.9. Análise de espectrometria de massas	26
4.10. Identificação de proteínas	27
4.11. Quantificação relativa das proteínas antioxidantes	27
4.12. Localização celular <i>in silico</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Cultivo de <i>E. urophylla</i> em altas concentrações de CO ₂ provocou variações fisiológicas e bioquímicas nas plantas	29
5.2. Enzimas antioxidantes de <i>E. urophylla</i> foram diferencialmente reguladas em altas concentrações de CO ₂	31
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX EM CLOROPLASTOS DE *Eucalyptus urophylla* POR ESTÍMULO DE CO₂

RESUMO - As mudanças climáticas globais podem alterar significativamente o metabolismo das células vegetais. Um cenário com alta concentração de CO₂ atmosférico pode ser benéfico para plantas do tipo C3 devido ao estímulo à fixação de carbono. No entanto, esse aumento esperado na taxa de assimilação de carbono também pode aumentar a atividade e a expressão das enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons, resultando em maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Nesse trabalho, foi estudada a resposta do sistema antioxidante em cloroplastos de *Eucalyptus urophylla* cultivados sob altas concentrações de CO₂. As plantas de *E. urophylla* expostas a alta concentração de CO₂ (980 ppm) mostraram um aumento no fechamento estomático e pequena, mas significativa, indução do estresse oxidativo em relação as plantas cultivadas em concentração atmosférica de CO₂. Entretanto, essas respostas não foram observadas quando as plantas foram cultivadas em concentração de CO₂ igual a 680 ppm, cujo tratamento induziu abertura estomática. Através de uma abordagem de proteômica de descoberta, foram identificadas e detectadas 19 proteoformas antioxidantes cloroplastidiais e 2 proteoformas diferencialmente reguladas. Dentre essas, destacam-se uma proteoforma de ascorbato peroxidase e uma de superóxido dismutase, as quais estão possivelmente envolvidas na neutralização de espécies reativas de oxigênio após cultivo em atmosfera enriquecida com CO₂, e que podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos de estresse abiótico ou como alvos em programas de engenharia genética.

Palavras-chave: antioxidantes, cloroplastos, CO₂, *Eucalyptus*, proteômica

MODULATION OF THE REDOX STATUS IN *Eucalyptus urophylla* CHLOROPLASTS BY CO₂ STIMULUS

ABSTRACT - Global climate change can significantly alter plant cell metabolism. A higher atmospheric CO₂ scenario may be beneficial for C₃ plants through the stimulation of carbon fixation. However, this predicted increase in the rate of carbon assimilation may also increase the activity and expression of enzymes involved in the electron transport chain, resulting in higher accumulation of reactive oxygen species. Here, we studied the responses of the chloroplast antioxidant system of *Eucalyptus urophylla* plants cultivated under high-CO₂ conditions. *E. urophylla* plants exposed to a high concentration (980 ppm) of CO₂ showed an increase in stomatal closure and a small, but significant, induction of oxidative stress in relation to plants grown at atmospheric CO₂ concentration. However, these responses were not observed at a CO₂ concentration equal to 680 ppm, which induced stomatal aperture. With the discovery proteomics approach used herein, we identified 19 chloroplast antioxidant proteoforms and pinpointed 2 differentially regulated antioxidants proteoforms. We highlight an isoform of ascorbate peroxidase and one of superoxide dismutase, which are possibly involved in the neutralization of reactive oxygen species upon cultivation in a high CO₂ atmosphere and could be used as biochemical markers of abiotic stress or as targets in genetic engineering programs.

Keywords: antioxidants, chloroplast, CO₂, *Eucalyptus*, proteomics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Medição do CO₂ atmosférico no observatório de Mauna Loa (A), Projeções dos caminhos representativos de concentração das emissões de gases do efeito estufa e suas concentrações atmosféricas (B).....14
- Figura 2.** Grau de abertura estomática (A), Concentração de H₂O₂ (B), Eficiência Quântica de Fotossistema II (C) e Conteúdo de MDA (D) de plantas de *E. urophylla* cultivadas por 30 dias em câmaras de crescimento com concentrações de CO₂ controladas30
- Figura 3.** Perfil de expressão das proteoformas antioxidantes identificadas após a análise *in silico* em plantas de *E. urophylla* cultivadas em concentração de CO₂ de 980 ppm (tratamento) em relação a condição de 410 ppm (controle).....36
- Figura 4.** Perfil de expressão das proteoformas antioxidantes Eucgr.F0344.1 e Eucgr.K00110.6 e das enzimas APX e SOD identificadas como diferencialmente reguladas.37
- Figura 5.** Via de neutralização de EROs.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteoformas relacionadas ao sistema antioxidante identificadas em cloroplastos de <i>E. urophylla</i> no controle (410 ppm) e no tratamento (980 ppm) e que foram preditas na análise de localização subcelular <i>in silico</i>	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	ácido abscisíco
APX	ascorbato peroxidase
BSA	albumina sérica bovina
CAT	catalase
CIB	tampão de isolamento de cloroplastos
CTE	cadeia de transporte de elétrons
DHAR	dehidroascorbato redutase
DTT	ditiotreitól
EROs	espécies reativas de oxigênio
FDR	taxa de falsos positivos
FWHM	“full width at half maximum”
GPX	glutathione peroxidase
GR	glutathione redutase
HCD	energia de colisão
IPCC	painel intergovernamental sobre mudanças climáticas
KI	iodeto de potássio
MDA	malondialdeído
MDHAR	monodehidroascorbato redutase
NO	óxido nítrico
NSAF	fator de abundância espectral normalizado
ppm	partes por milhão
PRX	peroxirredoxina
PSM	“peptide spectral match”
PVPP	polivinil polipirrolidona
SDS	dodecilsulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TRX	tiorredoxina

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o ESRL ("Earth System Research Laboratory") (2017), a concentração atmosférica de CO₂ subiu consideravelmente nas últimas décadas: passou de 315 ppm em 1958 para 408 ppm em 2017, a concentração de CO₂ mais alta já registrada no observatório de Mauna Loa. Se as emissões continuarem a aumentar, a concentração de CO₂ atmosférico do planeta pode alcançar a notável marca de 985 ppm já no ano de 2100 (IPCC, 2014). Embora não exista nenhum consenso atual sobre o impacto dessa previsão global, esse cenário de aumento do CO₂ atmosférico pode ser benéfico para a maioria das espécies vegetais, principalmente para aquelas que utilizam a via fotossintética C3 pois dependem de uma alta razão CO₂:O₂ para contrabalancear as perdas que ocorrem devido ao processo de fotorrespiração.

Os organismos fotossintéticos convertem energia luminosa em moléculas orgânicas, como o açúcar. Um aumento na taxa de assimilação de carbono devido à maior disponibilidade de CO₂ pode ocorrer apenas se um aumento na expressão e na atividade das enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons (CTE) também acontecer. Assim, a indução da fixação de C pode provocar um aumento na atividade das enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons fotossintética e um aumento na síntese das espécies reativas de oxigênio (EROs), que são os principais subprodutos da CTE. Em plantas, as EROs são predominantemente produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, e seu acúmulo em excesso pode causar danos extensivos às moléculas de DNA, lipídeos e proteínas, afetando a homeostase celular (APEL; HIRT, 2004; FOYER; NOCTOR, 2005). Para os organismos fotossintéticos, os fotossistemas I e II são a principal fonte de produção de EROs. A exposição dos cloroplastos à altas intensidades luminosas ou à algum tipo de estresse abiótico pode diminuir a capacidade fotossintética das plantas, causando excesso de energia de excitação que reduz os componentes da CTE (ADAMS et al., 2013; DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012) e induz uma maior produção de EROs (ASADA, 2006; FISCHER; HIDEK; KRIEGER-LISZKAY, 2013; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

As enzimas antioxidantes desempenham um papel fundamental no controle da homeostase celular das EROs. Elas têm a habilidade de provocar defesas antioxidantes que podem prevenir a acumulação dessas moléculas e do estresse oxidativo extremo (BHATTACHARJEE, 2010). Tais enzimas podem reduzir, degradar ou prevenir a biossíntese de radicais livres, evitando assim a ocorrência de maiores danos às células vegetais (SERKEDJIEVA, 2010). A expressão dos genes que codificam enzimas antioxidantes é um dos pontos-chave no controle do estresse oxidativo (CYRNE et al., 2003). As enzimas antioxidantes mais comuns encontradas nas células vegetais são Ascorbato Peroxidase (APX), Glutathione Peroxidase (GPX), Peroxirredoxina (PRX), Superóxido Dismutase (SOD), Tiorredoxina (TRX) e Catalase (CAT) (APEL; HIRT, 2004; CHOUDHURY et al., 2013; FOYER, 2005; HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2013). Tais enzimas podem ser identificadas e sua expressão quantificada por análises em larga escala como a proteômica, que combina técnicas avançadas de separação, espectrometria de massas e bioinformática como ferramentas para caracterizar proteínas em misturas complexas. Essa tecnologia se torna ainda mais poderosa quando direcionada a um compartimento celular específico, como na proteômica subcelular, que explora esse compartimento e os processos que ocorrem dentro dele. Nos últimos anos, essa abordagem permitiu, por exemplo, uma melhor compreensão da adaptação ambiental, biogênese, caminhos metabólicos e transdução de sinal em cloroplastos (Van Wijk, 2000).

Uberegui et al. (2015) estudaram o proteoma cloroplastidial de *Arabidopsis thaliana* para analisar a resposta dessas plantas a distúrbios de intensidade luminosa e como elas se adaptam ao meio ambiente. O proteoma cloroplastidial de trigo também foi estudado para investigação dos efeitos do estresse salino e hídrico dentro dessa organela (KAMAL et al., 2013). Do mesmo modo, o proteoma do cloroplasto de álamo foi estudado para analisar as mudanças no perfil das proteínas cloroplastidiais das plantas com alterações em sua capacidade de emissão de isopreno (VELIKOVA et al., 2014). Recentemente, Santos e Balbuena (2017) estudaram o proteoma cloroplastidial de *Eucalyptus urophylla* em atmosfera enriquecida com CO₂, onde foi observado um aumento significativo na expressão de enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin-Benson nas plantas cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂.

O *Eucalyptus* é uma espécie de grande importância econômica e sua madeira é usada para diversos propósitos. Os principais produtos são lenha, carvão vegetal, papel e celulose (PEREIRA et al., 2000), além de seu uso extensivo nas indústrias química, moveleira, embalagem, têxtil, farmacêutica e construção civil (IBÁ, 2015). Estudos indicam que o *Eucalyptus* está entre as espécies lenhosas mais sensíveis ao aumento da concentração do CO₂ (AINSWORTH; LONG, 2005; ATWELL; HENERY; WHITEHEAD, 2003). Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o estresse oxidativo em plantas de *E. urophylla* cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ e utilizar estratégias de proteômica para investigar a resposta do sistema antioxidante nos cloroplastos das plantas submetidas a essa condição.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi analisar se o aumento na concentração de CO₂ provoca estresse oxidativo em plantas de *E. urophylla*.

Para tanto, foram realizadas análises fisiológicas e bioquímicas para avaliação do estresse oxidativo e também foram empregadas estratégias de proteômica para investigar a resposta do sistema antioxidante nos cloroplastos das plantas submetidas a essa condição.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O gênero *Eucalyptus* e o setor florestal

O gênero *Eucalyptus*, pertence à família Myrtaceae que compreende outros 130 gêneros (THE PLANT LIST, 2013). Esse gênero é nativo da Austrália e da Indonésia mas foi vastamente plantado em diversos países, e se mostrou particularmente bem sucedido em regiões tropicais e subtropicais (STANTURF et al., 2013). Foi introduzido no Brasil em meados de 1868 no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro e começou a ser cultivado de forma comercial por Navarro de Andrade por volta de 1909, na cidade de Rio Claro-SP, com a finalidade de produção de madeira para construção de estações e vilas, combustível para locomotivas, dormentes e mourão de cercas e postes (MORA; GARCIA, 2000).

Atualmente, já foram catalogadas cerca de 700 espécies de eucalipto, sendo que os mais cultivados no Brasil são *Eucalyptus saligna*, *E. grandis*, *E. urophylla* e seu híbrido, o *E. urograndis* (VITAL, 2007). O interesse pela espécie *E. urophylla* cresceu no país depois de ser reconhecido como resistente ao cancro do eucalipto, além de mostrar um bom potencial para ser cultivada em regiões de clima quente e de elevados déficits hídricos devido a sua boa performance nestas condições e também por apresentar boa qualidade da madeira para carvão e celulose. Suas árvores são de grande porte, retas, com forte dominância apical e casca rugosa (RUY; FILHO, 2001). Essas características indicam que o *E. urophylla* pode ser uma boa opção para substituição do *E. grandis* nas localidades onde este torna-se suscetível ao cancro (MORA; GARCIA, 2000).

A madeira de eucalipto é utilizada como matéria prima para diversas finalidades. Destacam-se a produção de lenha, estacas, moirões, dormentes, carvão vegetal, celulose e papel, além da sua utilização na fabricação de casas, móveis e estruturas (PEREIRA et al., 2000). Já no setor de bens de consumo, sobressaem-se as indústrias química, moveleira, de embalagem, têxtil, farmaceutica e a construção civil (IBÁ, 2015).

Recentemente o genoma da espécie *E. grandis*, proveniente de uma geração de auto-fecundação de uma árvore chamada BRASUZ1, foi sequenciado. O resultado foi um genoma de 640Mb, 36.376 genes preditos e divididos em 11 cromossomos

(MYBURG et al., 2014). Esse feito contou com um consórcio envolvendo 35 instituições e 80 pesquisadores de diversos países e foi de extrema importância para entidades e profissionais que trabalham com melhoramento genético e biotecnologia envolvendo esse gênero.

Nos últimos anos, o setor florestal brasileiro se tornou um dos mais relevantes no cenário global. Atualmente, o Brasil é o 3º maior produtor mundial de celulose, perdendo somente para os Estados Unidos e o Canadá. Também ocupa a 9ª posição no ranking dos maiores produtores de papel. Os principais artigos que esse segmento fornece são produtos de higiene e beleza, papéis para escrever e imprimir e embalagens (ABRAF, 2013).

Em 2015, o Brasil manteve sua liderança mundial de produtividade florestal. A produtividade média reportada pelas empresas foi de 36 m³/ha.ano. As áreas plantadas com *Eucalyptus* ocupam cerca de 5,6 milhões de hectares no país e estão localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%). Estima-se que o número de postos de trabalho criados pelo setor florestal, sendo eles diretos ou indiretos, tenha sido na ordem de 3,8 milhões. O setor ainda apresentou um crescimento do PIB de 3% em relação ao ano anterior (IBÁ, 2015).

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

É inegável a influência humana nas mudanças climáticas observadas nos últimos anos. As emissões de gases do efeito estufa vêm aumentando desde a era pré-industrial, e foram motivadas em grande parte pelo crescimento econômico e populacional do planeta. De acordo com o ESRL (2017), a concentração atmosférica de CO₂ subiu consideravelmente nas últimas décadas: passou de 315 ppm em 1958 para 408 ppm em 2017 (Figura 1 A), a concentração de CO₂ mais alta já registrada no observatório de Mauna Loa, localizado no Havaí. Por isso, afim de promover uma visão ampla a respeito das pesquisas sobre mudanças climáticas no mundo, consolidar e confirmar as tendências nesse campo de conhecimento, foi criado no final da década de 1980 o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), que é composto por um corpo internacional de especialistas para avaliação da pesquisa sobre esse tema (OJIMA, 2011).

Segundo o IPCC (2014), mudanças climáticas são observadas desde a década de 1950 e estão diretamente associadas a ações humanas. Dentre elas, podemos incluir um aumento de temperatura e do nível do mar, além de um aumento no número de eventos de precipitação pesada em várias regiões e aumento na emissão dos gases do efeito estufa, que vem atingindo seu ápice nos dias de hoje (IPCC, 2014). Presume-se que essas emissões continuem a aumentar devido à dependência dos combustíveis fósseis para produção de energia e o aumento da população mundial (IPCC, 2013).

Neste sentido, um dos mais importantes elementos dos esforços do IPCC é o desenvolvimento de cenários do futuro do fator antropogênico, considerando as forças motrizes e as opções de resposta à essas mudanças (MOSER; LUERS, 2007). As projeções de emissões de gases de efeito estufa variam em uma grande escala, dependendo da política climática e do desenvolvimento socioeconômico da população mundial. Os caminhos representativos de concentração (RCPs), descrevem projeções diferentes do século XXI com relação a essas emissões e suas concentrações atmosféricas (IPCC, 2014). No pior cenário (RCP 8.5), estima-se que em 2100, a concentração de CO₂ média será de 985 ppm (794 - 1142 ppm), com 90% de confiança nessa previsão (Figura 1 B) (IPCC, 2013).

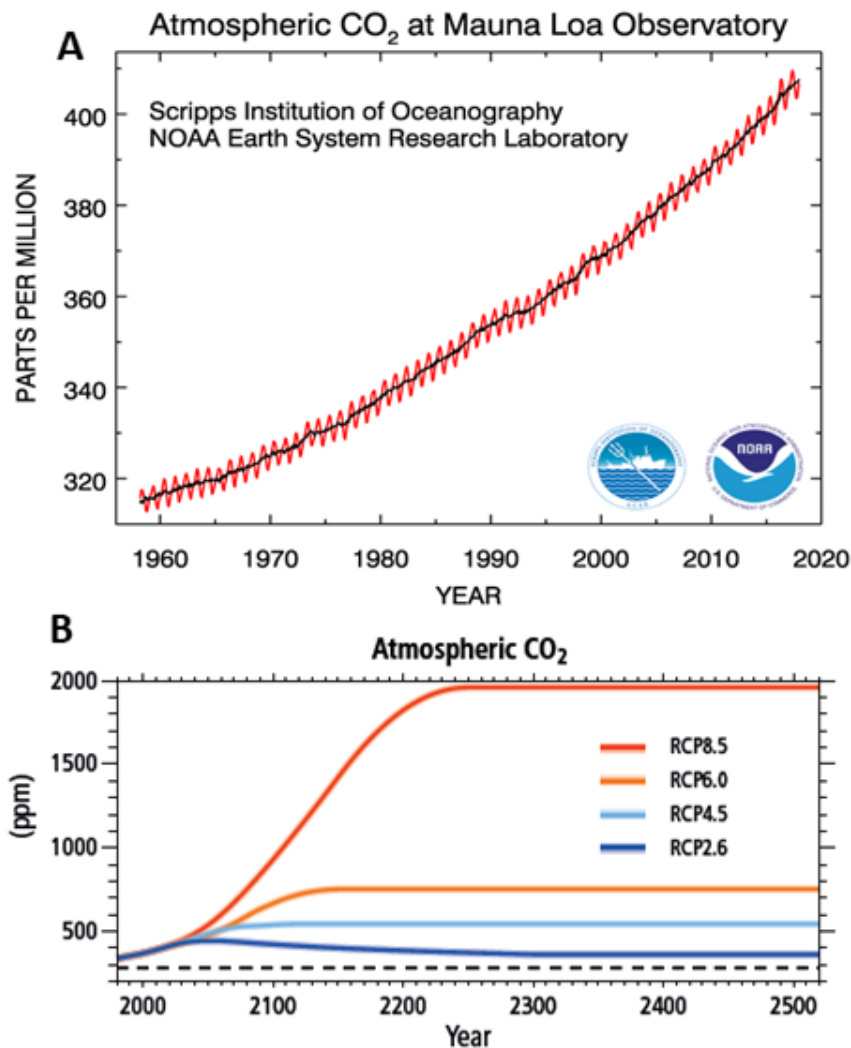


Figura 1. Medição do CO₂ atmosférico no observatório de Mauna Loa (A), Projeções dos caminhos representativos de concentração das emissões de gases do efeito estufa e suas concentrações atmosféricas (B) **Fonte:** ESRL, 2017; IPCC, 2014.

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).

Nesse contexto, as plantas pertencentes ao grupo com fotossíntese do tipo C3 podem ser favorecidas. Este ciclo leva tal nome pois o primeiro produto estável a ser formado é um composto de três carbonos, o fosfoglicerato (3-PGA). Sabe-se que uma grande parte da limitação à assimilação de carbono em plantas C3 é devido às propriedades catalíticas de oxigenase e carboxilase da enzima Rubisco (PORTIS;

PARRY, 2007). Por essa razão, esses organismos vegetais podem apresentar um aumento expressivo na assimilação de carbono dependendo da disponibilidade de CO₂ na atmosfera.

Já foram descritas respostas positivas de crescimento em atmosfera enriquecida com CO₂ em espécies de plantas lenhosas quando outros recursos foram fornecidos apropriadamente (ATWELL; HENERY; BALL, 2009; CROUS; WALTERS; ELLSWORTH, 2008; LIBERLOO et al., 2006). Estudos sobre eucalipto indicam que essa espécie apresenta estímulo no seu crescimento, especialmente nos primeiros anos de desenvolvimento, estando entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao incremento de CO₂ (AINSWORTH; LONG, 2005; ATWELL; HENERY; WHITEHEAD, 2003).

Se o aumento na concentração de CO₂ pode acarretar um aumento na expressão das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin-Benson; em contrapartida, o aumento na assimilação de carbono atmosférico demanda uma maior atividade e expressão de enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons. Durante o processo de conversão de energia luminosa em energia química, estão entre os principais subprodutos as espécies reativas de oxigênio (EROs). Embora fundamentais no metabolismo vegetal, seu acúmulo excessivo pode levar a danos celulares severos e muitas vezes irreparáveis. Nesse sentido, enzimas antioxidantes exercem um papel fundamental no controle da concentração dessas espécies reativas.

3.3. Formação de EROs e o sistema antioxidante de plantas expostas a fatores abióticos

As espécies reativas de oxigênio (EROs), como Oxigênio singlete (¹O₂), Radical Superóxido (O₂⁻), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e Radical Hidroxila (HO[·]), são produzidas continuamente como subprodutos de várias vias metabólicas e podem ser geradas em diferentes compartimentos celulares (GILL; TUTEJA, 2010). Em plantas, as EROs são predominantemente produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos e são capazes de causar extensivos danos nas moléculas de DNA, lipídeos e proteínas, afetando assim, a homeostase celular (APEL; HIRT, 2004;

FOYER; NOCTOR, 2005). De todo O_2 consumido pelos organismos vegetais, somente 1 - 2% são usados para a produção de EROs (BHATTACHARJEE, 2005).

O processo de fotossíntese ocorre nos cloroplastos, que contêm um sistema de membranas altamente organizado onde abriga todos os componentes necessários para captura de luz. O oxigênio gerado nos cloroplastos durante a fotossíntese pode aceitar elétrons que passam pelos fotossistemas, resultando na formação de O_2 (GILL; TUTEJA, 2010), logo os fotossistemas I e II presentes na membrana do tilacóide são a maior fonte de produção de EROs. A exposição dos cloroplastos a altas intensidades luminosas ou a perturbações abióticas que possam diminuir a capacidade fotossintética das plantas provoca um excesso de energia de excitação que reduz os componentes da CTE (ADAMS et al., 2013; DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012) e causa alta produção de EROs (ASADA, 2006; FISCHER; HIDEK; KRIEGER-LISZKAY, 2013; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

O Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado a partir da redução parcial do O_2 ou como resultado da transferência de energia para o O_2 . Ele é moderadamente reativo, porém pode sofrer modificações que o transformam em moléculas mais tóxicas e reativas como $HO^{\cdot}$ e 1O_2 , além de causar peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2006). A formação do Oxigênio Singleto (1O_2) se dá por uma reação de uma clorofila que está em seu estado tripleto no complexo antena com o O_2 (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Já a produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), que é moderadamente reativo, ocorre quando o $O_2^{\cdot-}$ sofre tanto uma redução univalente quanto uma protonação. Esse processo ocorre de forma não enzimática pela sua dismutação sob condições de pH baixas ou por uma reação catalizada pela enzima Superóxido dismutase (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Dentre os membros da família, o Radical Hidroxila ($HO^{\cdot}$) é o mais tóxico e reativo de todos. Ele é gerado em condições de pH neutro pela reação de Fenton entre H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ e catalizada por metais de transição como Fe^{2+} e Fe^{3+} . Não existe um sistema enzimático capaz de neutralizar esse radical, por isso seu acúmulo em excesso pode causar morte celular (PINTO et al., 2003). Por esta razão, a única maneira de evitar danos oxidativos causados pelo Radical Hidroxila ($HO^{\cdot}$) é controlar as reações que levam a sua formação. Assim, as células tiveram que evoluir estratégias sofisticadas para manter as concentrações de Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Peróxido

de Hidrogênio (H_2O_2) e metais de transição, como Fe e Cu sob controle (APEL; HIRT, 2004).

O equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs pode ser alterado por diversos fatores bióticos e abióticos, como a seca, salinidade, radiação, metais pesados, temperatura, poluição do ar, deficiência de nutrientes, herbicidas e também ataques de patógenos. Para se proteger contra essas moléculas tóxicas, as células vegetais empregam um sistema de defesa antioxidante (GILL; TUTEJA, 2010).

Dessa forma, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na remoção das EROs em excesso e a sua ativação está diretamente relacionada a algum tipo de estresse e ao estágio de desenvolvimento do organismo vegetal (FOYER; NOCTOR, 2005). Elas são comuns em plantas e estão muito bem descritas na literatura incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), peroxirredoxina (PRX), catalase (CAT) e tioredoxina (TRX) (APEL; HIRT, 2004; CHOUDHURY et al., 2013; FOYER, 2005; HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2013).

A SOD (E.C.1.15.1.1) é a enzima intracelular antioxidante mais efetiva, está presente em todos os organismos aeróbicos e faz parte da primeira linha de defesa contra as EROs. Ela é responsável por catalisar a dismutação do superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e portanto diminui o risco de formação do radical hidroxila ($\text{HO}^{\cdot}$). Pode ser classificada em três proteoformas diferentes de acordo com o íon metálico que ela se liga: Mn-SOD (mitocôndria), Fe-SOD (cloroplastos) e Cu / Zn-SOD (citossol, peroxissomos e cloroplastos) (MITTLER, 2002). Todas as proteoformas de SOD são codificadas no núcleo e depois direcionadas para seus respectivos compartimentos celulares. A superexpressão da SOD é requerida no combate ao estresse oxidativo causado por fatores bióticos ou abiótico e têm um papel crítico na sobrevivência das plantas em condições de estresses ambientais (GILL; TUTEJA, 2010).

As peroxidases compõem uma família de enzimas antioxidantes que catalisam reações oxirredutases e têm como principal molécula aceitadora de elétrons o H_2O_2 . Dentre elas, pode-se destacar a APX (E.C.1.1.1.11.1), CAT (E.C.1.11.1.6) e GPX (E.C.1.6.4.2). A APX desempenha um papel muito importante na eliminação de EROs, ela reduz o H_2O_2 a H_2O e Dehidroascorbato (DHA), utilizando ácido ascórbico

(AA) como agente redutor. Ela é a principal enzima antioxidante envolvida no ciclo ascorbato-glutationa e tem mais afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT (GILL; TUTEJA, 2010). A GPX também age na redução do H_2O_2 em H_2O , mas para isso ela utiliza o NADPH como agente para catalizar a redução da Glutationa Oxidada (GSSG) a Glutationa Reduzida (GSH), substratos que são utilizados para regenerar AA. Já a enzima CAT é responsável por catalisar a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , entretanto é a única enzima antioxidante em não exige uma redução equivalente (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Ela é indispensável para desintoxicação de EROs durante alguma condição de estresse.

3.4. A proteômica

O termo proteômica foi cunhado por Marc Wilkins no início da década de 1990 em referência ao termo genômica, que descreve toda a coleção de genes em um organismo (LIEBLER, 2002). Sendo assim, a proteômica pode ser definida como o estudo sistemático de uma população de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em determinada condição do sistema biológico (CHEN; HARMON, 2006; PARK, 2004), sendo que esse sistema está expressando um conjunto protéico que reflete as suas interações com o meio em um determinado momento. Ela pode ser considerada uma das tecnologias chave para o estudo e investigação de sistemas biológicos dinâmicos e complexos, pois permite medições qualitativas e quantitativas em larga escala de proteínas e fornece uma análise precisa das mudanças metabólicas que ocorrem em resposta a fatores ambientais (CHEN; HARMON, 2006). Apesar das análises transcricionais fornecerem informações importantes, nem sempre a abundância de mRNA reflete o produto final da expressão gênica, uma vez que a quantidade de proteínas expressas depende de alguns fatores como transcrição, tradução e modificações pós-traducionais que podem resultar na modificação da função das classes proteicas (CHEN; HARMON, 2006). Por esse motivo, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas como a proteômica, que tem por objetivo o estudo do produto final da expressão gênica para avaliação da sua condição fisiológica, farmacológica e/ou patológica.

Os avanços significativos alcançados nessa área nas últimas décadas devem-se ao aumento na disponibilidade de informação genômica depositada em bancos de dados, à melhorias tecnológicas em espectrometria de massas, especialmente o desenvolvimento de técnicas de ionização suave para análise de peptídeos (AEBERSOLD; MANN, 2003), bem como o desenvolvimento de técnicas e equipamentos que possibilitam a separação, quantificação e caracterização de proteínas, além de ferramentas capazes de relacionar estas informações com aquelas obtidas por outros métodos (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004). De modo geral, a proteômica permite desenvolver trabalhos que visam investigar o perfil quantitativo de proteínas, modificações pós-traducionais, vias de sinalização, localização e compartimentação subcelular, complexos proteicos e interações proteína-proteína (MATROS et al., 2011; PFLIEGER; BIGEARD; HIRT, 2011). O progresso nos trabalhos realizados em proteômica ampliaram nossa compreensão molecular das respostas das plantas sob estresse abiótico. A partir das informações que são obtidas, é possível identificar genes candidatos que podem ser usados nos processos de engenharia genética para conferir maior resistência as plantas contra esse tipo de estresse (CUSHMAN; BOHNERT, 2000; RODZIEWICZ et al., 2014) e posteriormente ser incorporados aos programas de melhoramento de plantas.

A abordagem do tipo “shotgun” envolve primeiramente a extração do proteoma de interesse. Em seguida, as proteínas podem passar por uma ou duas etapas de separação. O SDS-PAGE é um dos métodos mais simples e efetivos para separação de proteínas, pois reduz a complexidade de uma mistura proteica com base na migração diferencial do peso molecular de cada proteína através da matriz de gel (AGRAWAL et al., 2011). Após a etapa de fracionamento, as proteínas são digeridas enzimaticamente, sendo a tripsina a enzima mais utilizada nesse processo (OLSEN; ONG; MANN, 2004). Esses peptídeos trípticos são separados por cromatografia líquida e analisados em um espectrômetro de massas, onde os íons precursores sofrem fragmentação e geram espectros do tipo MS/MS. Essa informação então é usada para identificação de proteínas através de diversos algoritmos de busca que fazem as correlações utilizando bancos de dados (AGRAWAL et al., 2011).

Dentre os vários métodos de quantificação de proteínas existentes, aqueles intitulados livres de marcação têm se popularizado por serem alternativas mais

baratas e ainda assim muito eficientes. Destaca-se a quantificação por contagem espectral, que considera o número de espectros de fragmentação (MS/MS) adquiridos e correlacionados para cada proteína como medida de abundância indireta (LIU; SADYGOV; YATES, 2004; OLD et al., 2005). Isso é possível porque o aumento na abundância de uma determinada proteína frequentemente resulta no aumento do número de seus peptídeos proteolíticos (ZHU; SMITH; HUANG, 2010).

3.5. A proteômica subcelular e os cloroplastos

A análise do proteoma ao nível subcelular caracteriza uma estratégia analítica que combina ferramentas e métodos bioquímicos para uma identificação de proteínas mais abrangente. Entretanto, a identificação e quantificação desses subproteomas pode ser considerado um desafio devido à sua menor abundância quando comparado ao proteoma celular total, pois o sucesso da análise por espectrometria de massas depende diretamente da abundância dos produtos gênicos (DREGER, 2003). A preparação da amostra também é um dos fatores críticos na análise de compartimentos celulares. O fracionamento celular permite a simplificação do proteoma e maior qualidade da amostra, sendo assim uma etapa essencial na análise. Procedimentos de isolamento e purificação de organelas foram desenvolvidos ao longo do tempo em diferentes espécies vegetais. Contaminantes ou restos celulares indesejados também pode ser um agravante e podem levar a erros de quantificação e identificação de proteínas para a organela estudada (AGRAWAL et al., 2011). Como exemplo de estudos sobre proteomas subcelulares temos a análise das proteínas da parede celular (ZHU et al., 2007), das mitocôndrias (HEAZLEWOOD et al., 2003), do complexo de Golgi (BELL et al., 2001), dos peroxissomos (FUKAO; HAYASHI; NISHIMURA, 2002) e dos cloroplastos (VELIKOVA et al., 2014). Os plastídeos têm sido o compartimento subcelular favorito para estudo do proteoma em plantas (MILLAR, 2004).

O cloroplasto é o maior compartimento metabolicamente ativo e a organela mais abundante nos tecidos vegetais. Além de realizar o processo de fotossíntese, ele ainda é responsável por mediar uma série de funções celulares essenciais como a síntese de lipídios, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, hormônios e metabólitos secundários tais como alcalóides e isoprenóides, que são necessários para

assimilação de nitrogênio e enxofre (KAMAL et al., 2013; VAN WIJK, 2004). Os cloroplastos são compostos por alguns compartimentos, incluindo envelope de membrana interna e externa, o estroma, a membrana do tilacóide e o lúmen do tilacóide (VAN WIJK, 2004). Estima-se que estejam presentes entre 2500 e 3000 proteínas nos cloroplastos (VAN WIJK, 2001). Uma vez que o genoma do cloroplasto pode codificar aproximadamente 120 proteínas, a maioria dessas são codificadas no núcleo e posteriormente transportadas para a organela (KEEGSTRA; CLINE, 1999).

É de extrema importância caracterizar o proteoma cloroplastidial a fim de entender a função, biogênese e diversas vias metabólicas que ocorrem nesse compartimento (VAN WIJK, 2004). Uberegui et al. (2015) estudaram o proteoma cloroplastidial de *A. thaliana* para analisar a resposta dessas plantas a distúrbios de intensidade luminosa e como elas se adaptam ao meio ambiente. O proteoma cloroplastidial de trigo também foi estudado para investigação dos efeitos do estresse salino e hídrico dentro dessa organela (KAMAL et al., 2013). Do mesmo modo, o proteoma do cloroplasto de álamo foi estudado para analisar as mudanças no perfil das proteínas cloroplastidiais das plantas com alterações em sua capacidade de emissão de isopreno (VELIKOVA et al., 2014). Recentemente, Santos e Balbuena (2017) estudaram o proteoma cloroplastidial de *E. urophylla* em atmosfera enriquecida com CO₂, onde foi observado um aumento significativo na expressão de enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin-Benson nas plantas cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de cultivo

Mudas clonais de *Eucalyptus urophylla* (I-144) de aproximadamente 90 dias 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) onde foram regadas a cada 2 dias. Após esse período, as mesmas foram acondicionadas em câmaras de crescimento (Fitotron - Weiss Gallenkamp) à 27 °C de temperatura, 60% de umidade relativa, 12 horas de fotoperíodo e concentrações de dióxido de carbono controladas: 980 ppm, 680 ppm e 410 ppm (controle). Após 30 dias de cultivo, as folhas jovens foram imediatamente coletadas e submetidas às análises estomáticas, quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), determinação de peroxidação lipídica e isolamento de cloroplastos.

4.2. Análise estomática

Tecidos foliares de *E. urophylla* foram coletados para avaliar o número e o grau de abertura dos estômatos. Para isso, fragmentos de aproximadamente 1 cm² foram cortadas no centro de uma folha jovem totalmente expandida de três plantas de 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 cinco dias. Para a fixação de ultra-estruturas, o material passou por um processo de desidratação gradual com 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 (largura > 1 μ m) e o grau de abertura foram medidos utilizando o software Image J 1.48.

4.3. Quantificação de Peróxido de Hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). Foram macerados 200 mg de amostras frescas em 2 mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) contendo aproximadamente 20% de Polivinil Polipirrolidona (PVPP). Após perfeita homogeneização, as alíquotas foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 10.600 xg por 15 minutos, a 4°C. Foi retirado 200 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 200 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 mL de solução 1 M de KI. Os tubos com a reação foram colocados no gelo e permaneceram no escuro por uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi calculada usando uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de H_2O_2 . Foram utilizadas 4 repetições biológicas de cada tratamento para o teste. Foi realizada a análise estatística segundo o teste ANOVA e o teste de separação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre os tratamentos com CO_2 .

4.4. Determinação da Peroxidação Lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada segundo o protocolo de Heath e Packer (1968), onde foi realizada a quantificação do conteúdo de MDA (Malondialdeído). Para isso, foram macerados 200 mg de material vegetal fresco em 2 mL de 0,1% TCA, contendo aproximadamente 20% de PVPP. Após perfeita homogeneização, as alíquotas foram transferidas para microtubos para centrifugação a 10.600 xg por 15 min, à 4°C. Foi retirado 250 mL do sobrenadante ao qual foi adicionado TCA 20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e a mistura foi mantida por 30 minutos a 95°C. Ao ser retirado do banho-seco, as amostras sofreram um rápido resfriamento em gelo. Com o intuito de clarear a amostra e também separar algum resíduo formado durante o aquecimento, foi realizada uma centrifugação a 10.600 xg por 5 minutos à 4°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda a 535 e 600 nm. As concentrações de MDA foram calculadas através da fórmula:

$$C = \frac{ABS(535 - 600)}{EB}$$

Onde E= coeficiente de extinção = 155 mM⁻¹/cm; B= comprimento óptico.

Foram utilizadas 3 repetições biológicas de cada tratamento para o teste. Foi realizada a análise estatística segundo o teste ANOVA e o teste de separação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre os tratamentos com CO₂.

4.5. Avaliação da eficiência quântica do fotossistema II

As avaliações de fluorescência foram realizadas utilizando o fluorímetro modelo OS-30p, Opti-Sciences, sendo examinada uma região da superfície adaxial de uma folha totalmente expandida das plantas. Foram realizadas 3 leituras diferentes da mesma região em quatro plantas de cada tratamento. Os valores de fluorescência obtidos diretamente do aparelho (FM e F0) foram utilizados para avaliação da eficiência quântica potencial do fotossistema II (FV/FM). Foi realizada a análise estatística segundo o teste ANOVA e o teste de separação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre os tratamentos com CO₂.

4.6. Isolamento de cloroplastos

Foram utilizadas três repetições biológicas oriundas de duas plantas. Para tanto, três gramas de folhas foram coletadas e mantidas em gelo. Logo após, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços e sua nervura central foi removida. Os fragmentos foram depositados em tubo contendo 18 mL de chloroplast isolation buffer (CIB) com BSA 0,1% gelado e, em seguida, foi homogenizado pelo equipamento Turrax Omni GLH, em velocidade média por 4 ciclos de 5 segundos. O material processado foi filtrado em membrana de Nylon (Mesh 100) fornecida pelo kit e centrifugado a 200 xg por 3 minutos a 4 °C para remoção de células intactas e pedaços de parede celular. O sobrenadante coletado foi centrifugado a 1000 xg por 7 minutos a 4 °C para precipitação dos cloroplastos. O pellet contendo os cloroplastos foi

ressuspendido em 1 mL de CIB com BSA 0,1% e depositado em um gradiente de Percoll 80% - 40% na proporção 1:2 (v/v) para sua purificação. Em seguida, o sistema foi submetido a centrifugação em 3200 xg por 15 minutos a 4 °C, onde os cloroplastos intactos formaram uma banda na interface entre as faixas de Percoll. A interface de cloroplastos foi coletada e transferida para um novo tubo. Em seguida foi realizado um processo de lavagem, que consistiu na adição de 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, o pellet ressuspendido em 500 µL de CIB e armazenado em -30°C.

4.7. Extração e quantificação de proteínas cloroplastidiais

A extração das proteínas cloroplastidiais foi realizada segundo o protocolo adaptado de Shiraya et al. (2014). A princípio, 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 dos cloroplastos. Logo após, foram realizados 15 ciclos de sonicação por 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 e foi adicionado um volume de acetona gelada igual a 10 vezes o volume do sobrenadante. A precipitação das proteínas ocorreu por 12 horas a -30 °C acompanhado de centrifugação a 3200 xg por 15 minutos a 4 °C. Foi feito o descarte da acetona e ressolubilização do pellet 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”, baseado no método de Bradford (1976), de acordo com as instruções do fabricante utilizando a proteína BSA (“Bovine serum albumin”) como padrão.

4.8. SDS-PAGE e digestão de proteínas

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O sistema eletroforético foi composto por um gel de empilhamento a 5% (30 % acrilamida: 0,8 %

bis-acrilamida) e 0,5% SDS, e um gel de separação, constituído de 12,5% (30 % acrilamida: 0,8 % bis-acrilamida) e 1% SDS. As alíquotas contendo 25 µg de proteínas foram diluídas (1:1, v/v) com tampão de carregamento Laemmli 2X (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2,1% SDS; 26,3% (w/v) glicerol, 0,01% azul de bromofenol), aquecidas por 5 minutos a 99°C e aplicadas no topo do gel. O gel foi submetido a uma corrente constante de 20 mA durante 2h. Após a eletroforese o gel foi imerso em solução de coloração (0,08% Coomassie Colodial, 20% etanol, 1,6% ácido fosfórico, 8% sulfato de amônio) durante 16h e em seguida descorado para visualização das bandas proteicas.

A digestão das proteínas em gel foi realizada segundo o protocolo estabelecido por Shevchenko et al. (2007). Para tanto, os géis foram cortados em 5 segmentos, fragmentados e transferidos para microtubos. Logo após foi realizado processo de lavagem em solução de 100 mM bicarbonato de amônio: acetonitrila (1:1, v/v) seguido do processo de redução em solução de 10 mM DTT em 100 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos a 56°C. Posteriormente, os resíduos de cisteína das proteínas 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. A digestão ocorreu durante 16h a 37°C com a adição de 5 ng de tripsina por microtubo. Os peptídeos trípticos foram eluídos da matriz do gel utilizando 5% ácido fórmico : acetonitrila (1:2, v/v) por dois ciclos de 30 minutos, seguidos de um ciclo de acetonitrila pura. Em seguida, os peptídeos extraídos foram secos em centrifugação a vácuo e armazenados à -30°C.

4.9. Análise de espectrometria de massas

Os peptídeos obtidos foram ressuspensos em solução de 0,1% de ácido fórmico e separados em um cromatógrafo do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fischer Scientific) durante 90 minutos e utilizando-se uma nano-coluna de fase reversa (15 cm, 3 µm, 100 Å) e gradiente de polaridade decrescente (solvente A : 0,1% de ácido fórmico em H₂O e solvente B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) sob fluxo de 300 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

DDA (“data-dependent”) em top 10, onde os dez íons peptídicos mais abundantes de cada MS1 foram selecionados para fragmentação e aquisição de espectros do tipo MS2. Os espectros MS1 e MS2 foram adquiridos em resolução igual a 70.000 e 35.000 FWHM (“full width at half maximum”), respectivamente. A fragmentação dos peptídeos foi obtida pelo tipo “high collision energy” (HCD) com exclusão dinâmica de 30 s para os íons selecionados.

4.10. Identificação de proteínas

A identificação das proteínas foi realizada pela abordagem de correlação espectral e as buscas foram feitas baseando-se nas sequências de proteínas do genoma da espécie *Eucalyptus grandis* v. 2.0, depositadas website Phytozome v.12.1 (GOODSTEIN et al., 2012; MYBURG et al., 2014). As correlações foram realizadas pelas ferramentas de busca Sequest HT e MS Amanda contidos na plataforma Proteome Discoverer, 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 variação estática. Os resultados obtidos (“peptide spectral match” - PSM) foram filtrados segundo o coeficiente de correlação cruzada (XCorr) igual a 1,5; 2,0; 2,5 para os íons de carga +1, +2 e +3 e Amanda Score de 120 e ajustados para uma taxa de falsos positivos (FDR) de 1%. Proteínas que compartilham peptídeos comuns foram agrupadas de acordo com o princípio da máxima parcimônia. A lista completa com todas as identificações de proteínas do trabalho está disponível em: <https://www.dropbox.com/s/ffyfhwaim6q3pfh/Identifica%C3%A7%C3%B5es%20-%20Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Amanda%20Baldassi.xlsx?dl=0>

4.11. Quantificação relativa das proteínas antioxidantes

As proteoformas envolvidas no processo de neutralização de EROs foram manualmente selecionadas de acordo com a sua anotação funcional publicamente disponível no website Phytozome 12.1 para o organismo *E. grandis*. A abundância das proteínas foi registrada utilizando a abordagem do NSAF (“normalized spectrum abundance factor”) (PAOLETTI et al., 2006). O tratamento dos valores ausentes foi

realizado utilizando o menor valor de NSAF encontrado entre as proteínas de interesse. A abundância proteica das enzimas foi calculada pela soma dos valores de NSAF de todas as suas proteoformas. Somente foi considerada como diferencialmente regulada as proteoformas ou classes enzimáticas que apresentaram uma diferença significativa na sua abundância segundo o teste estatístico Kruskal-Wallis com nível de confiança de 95% realizado pelo software INFERNO RDN v1.1.5.

4.12. Localização celular *in silico*

Após a identificação por homologia de todas as proteínas descritas nos processos antioxidantes, foi realizada uma análise *in silico* utilizando preditores de localização subcelular e bancos de dados proteômicos para confirmação da localização celular das mesmas. Para tanto, uma proteína foi considerada plastidial quando denominada por pelo menos um dos quatro programas de predição de localização subcelular *in silico* (TargetP, ChloroP, WoLF e Predotar) e também quando apresentou pelo menos uma proteína homóloga em qualquer um dos três bancos de dados utilizados: The Plant Proteome Database (PPDB), Arabidopsis thaliana chloroplast protein database (AT-Chloro) e SUBcellular localisation database for Arabidopsis proteins (SUBA3).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de *E. urophylla* em altas concentrações de CO₂ provocou variações fisiológicas e bioquímicas nas plantas

Os estômatos são as peças chave na interface entre as plantas e a atmosfera, regulando a perda de água através da transpiração e a absorção de CO₂ pela fotossíntese. A abertura do poro estomático é controlada pela pressão de turgor nas células guarda e essa pressão é mediada pela concentração de íons e solutos orgânicos nessas células. Intensidade luminosa, concentração de CO₂ e ácido abscísico (ABA) podem regular o desenvolvimento e a abertura estomática (KIM et al., 2010; KINOSHITA et al., 2001). Adicionalmente, mensageiros secundários como íons Cálcio (Ca²⁺), óxido nítrico (NO) e EROs também podem mediar o fechamento estomático (HETHERINGTON, 2001; SCHROEDER et al., 2001). Já foi reportado que o número de estômatos diminui em paralelo com o aumento da concentração de CO₂ atmosférico (CASSON; HETHERINGTON, 2010; CASSON; GRAY, 2008).

Em plantas de *E. urophylla* cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ foram encontradas diferenças no número de estômatos abertos e no grau de abertura entre os tratamentos (Figura 2 A). As plantas cultivadas na concentração de 980 ppm apresentaram menor grau de abertura estomática e menor número de estômatos abertos. Esse fenômeno também já foi reportado em *A. thaliana* (CHATER et al., 2015; HÖRAK; KOLLIST; MERILO, 2017) e tomate (SHI et al., 2015), quando cultivados em altas concentrações de CO₂. Shi et al. (2015) também reportou um acúmulo de H₂O₂ e NO, moléculas envolvidas no fechamento estomático, nas células guarda dessas plantas. O menor grau de abertura estomática das plantas cultivadas à 980 ppm pode estar relacionado a uma rápida saturação de CO₂ dentro da célula devido as altas concentrações desse gás no ambiente ou por um acúmulo de H₂O₂ e outros mensageiros secundários nas células guarda, o que pode ser sustentado pelo aumento nos níveis de H₂O₂ observado nesse tratamento (Figura 2 B).

As plantas cultivadas à 680 ppm apresentaram maior número de estômatos abertos no final do experimento e um rápido aumento no grau de abertura seguido de um estágio estável. Essa condição pode ter estimulado a capacidade fotossintética

dessas plantas, o que corrobora com o aumento da eficiência quântica de fotossistema II (Figura 2 C).

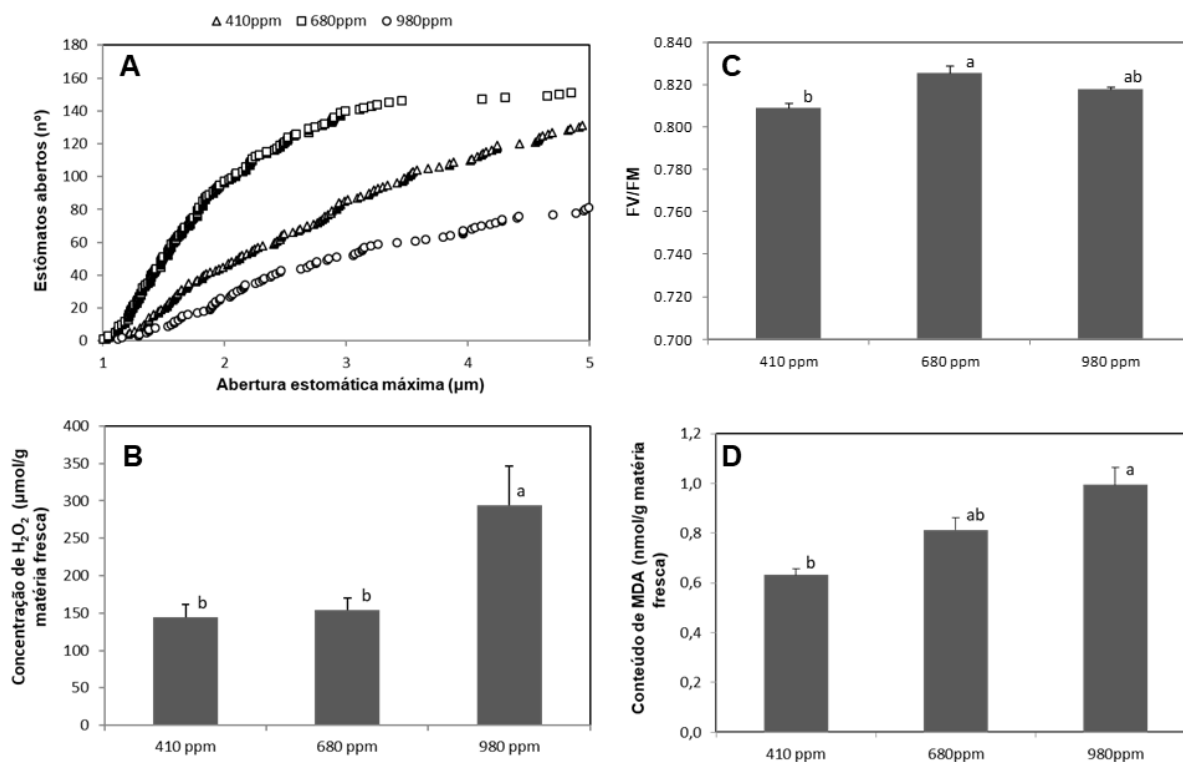


Figura 2. Grau de abertura estomática (A), Concentração de H₂O₂ (B), Eficiência Quântica de Fotossistema II (C) e Conteúdo de MDA (D) de plantas de *E. urophylla* cultivadas por 30 dias em câmaras de crescimento com concentrações de CO₂ controladas (410, 680 e 980 ppm). Diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Sob condições de estresse abiótico, as plantas produzem grandes quantidades de EROs, o que pode ocasionar um desequilíbrio na homeostase celular. Apesar do seu efeito destrutivo, as EROs são moléculas importantes para a sinalização redox, especialmente o H₂O₂ (FOYER; NOCTOR, 2003). A peroxidação lipídica da membrana também é um indicador comum da demasiada produção de EROs, sendo o Malondialdeído (MDA) um dos produtos secundários mais conhecidos da peroxidação lipídica (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; NOCTOR; FOYER, 1998).

Do mesmo modo, as plantas de *E. urophylla* cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ apresentaram diferenças significativas em suas concentrações de H₂O₂ e MDA (Figura 2 B e D). A concentração de H₂O₂ e o conteúdo de MDA atingiram os níveis mais altos quando as plantas foram cultivadas à 980 ppm. Já os níveis observados para a concentração de 680 ppm foram similares aos níveis do controle, resultados que indicam que as plantas mostraram maior estresse oxidativo quando submetidas a condição de 980 ppm.

Já foi observado que os níveis de H₂O₂ e peroxidação lipídica apresentaram um aumento sob condições de estresse salino em ervilha (HERNANDEZ et al., 2001) e em três espécies de *Juncus* spp. (HASSAN et al., 2017). Resultados similares foram observados em *A. thaliana* (CHO; SEO, 2005) e arroz (VERMA; DUBEY, 2003) quando cultivados sob condições de estresse por metais pesados, Cd e Pb, respectivamente. Altos níveis de MDA e H₂O₂ também já foram observados em milho (ANJUM et al., 2017), *Cerasus humilis* (REN et al., 2016) e *Amygdalus mira* (CAO et al., 2017) quando submetidos à condição de seca. Em relação ao estresse por CO₂, um aumento no conteúdo de MDA já foi observado em *Beta vulgaris* (KUMARI; AGRAWAL; TIWARI, 2013) and *M. lupulina* (FARFAN-VIGNOLO; ASARD, 2012) quando expostas a essa condição, o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

5.2. Enzimas antioxidantes de *E. urophylla* foram diferencialmente reguladas em altas concentrações de CO₂

Usando a estratégia GeLC-MS/MS acoplada a buscas rigorosas contra o genoma da espécie *E. grandis*, 30 proteínas foram identificadas por homologia de sequência como sendo relacionadas ao sistema antioxidante em plantas. Em espécies vegetais, o sistema antioxidante de defesa atua em resposta ao acúmulo de EROs para diminuir prováveis danos citotóxicos como modificação de proteínas, danificação ao DNA e inclusive, peroxidação lipídica (MITTLER, 2002; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). O sistema enzimático de neutralização de EROs consiste em diversas enzimas, tais como Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), Monodehidroascorbato redutase (MDHAR), Dehidroascorbato redutase (DHAR), Tiorredoxina (TRX), Glutationa peroxidase (GPX)

e Glutathione redutase (GR). Após a análise de localização subcelular *in silico* e de acordo com os critérios adotados aqui, 19 proteínas foram consideradas diretamente envolvidas no processo antioxidante em cloroplastos (Tabela 1).

Para a avaliação da expressão das enzimas antioxidantes por estímulo de CO₂, somente o controle (410 ppm) e o tratamento com a maior concentração de CO₂ (980 ppm) foram utilizados.

Tabela 1. Proteoformas relacionadas ao sistema antioxidante identificadas em cloroplastos de *E. urophylla* no controle (410 ppm) e no tratamento (980 ppm) e que foram preditas na análise de localização subcelular *in silico*.

Acesso ^a	Descrição ^b	Peptídeos Únicos ^c	PSMs ^d	Expressão (NSAF) ^e		Cobertura ^f (%)	Preditores ^g	Banco de Dados ^h
				410 ppm	980 ppm			
Cloroplastidiais								
Eucgr.A01555.1	Thioredoxin superfamily protein	2	21	0,00075	0,00124	32,62	1	3
Eucgr.A01813.1	Thioredoxin superfamily protein	1	4	0,00020	0,00019	12,95	4	3
Eucgr.A02464.1	WCRKC thioredoxin 1	1	1	0,00010	0,00013	4,59	1	1
Eucgr.B01424.1	Thioredoxin F2	1	3	0,00010	0,00011	3,61	2	2
Eucgr.C00774.1	Thioredoxin superfamily protein	16	231	0,00418	0,00692	39,19	2	3
Eucgr.C03812.2	Thioredoxin-dependent peroxidase 1	3	14	0,00071	0,00079	40,58	1	2
Eucgr.F00373.1	Ascorbate peroxidase 4	14	221	0,00421	0,00461	54,21	4	3
Eucgr.F02729.1	Thioredoxin superfamily protein	1	11	0,00024	0,00040	7,03	4	2
Eucgr.F02754.1	Thioredoxin superfamily protein	5	46	0,00136	0,00201	44,68	4	2
Eucgr.F04344.1	Thylakoidal ascorbate peroxidase	13	118	0,00106	0,00271	42,60	4	3
Eucgr.G03224.2	Thioredoxin z	1	2	0,00018	0,00010	6,11	4	3
Eucgr.H01629.1	Thioredoxin F2	1	4	0,00025	0,00013	9,73	4	2
Eucgr.H01941.1	Thioredoxin superfamily protein	3	12	0,00033	0,00039	20,61	3	3
Eucgr.H02333.1	Thioredoxin superfamily protein	1	11	0,00027	0,00035	8,53	4	3
Eucgr.J01595.1	Dehydroascorbate reductase 1	2	3	0,00010	0,00020	14,18	4	3
Eucgr.K00110.6	Fe superoxide dismutase 2	4	14	0,00020	0,00096	16,23	4	3
Eucgr.K02032.1	Thioredoxin family protein	3	19	0,00042	0,00040	24,01	3	3
Eucgr.K02606.1	Thioredoxin superfamily protein	9	228	0,00499	0,00685	42,24	4	3

Eucgr.L03049.1	Thioredoxin M-type 4	4	25	0,00109	0,00183	43,10	1	3
Não Cloroplastidiais								
Eucgr.A01180.1	Ascorbate peroxidase 2	1	2	0,00010	0,00016	7,23	0	0
Eucgr.B02456.4	Ascorbate peroxidase 1	3	8	0,00022	0,00038	31,94	0	0
Eucgr.F01776.1	Catalase 2	14	205	0,00279	0,00322	49,80	0	0
Eucgr.F03557.1	Catalase 2	5	102	0,00156	0,00152	36,33	1	0
Eucgr.F04195.1	Peroxidase superfamily protein	2	13	0,00016	0,00044	8,57	1	0
Eucgr.F04198.1	Peroxidase superfamily protein	1	5	0,00015	0,00015	4,86	1	0
Eucgr.G03132.1	Manganese superoxide dismutase 1	2	6	0,00013	0,00033	20,94	0	0
Eucgr.I01408.1	Ascorbate peroxidase 3	1	2	0,00010	0,00014	11,50	0	0
Eucgr.J00965.1	Ascorbate peroxidase 1	4	12	0,00017	0,00058	28,00	0	0
Eucgr.K03531.4	Thioredoxin family protein	1	13	0,00024	0,00040	6,38	0	0
Eucgr.L01603.1	Peroxidase superfamily protein	1	6	0,00027	0,00012	5,00	1	0

^a Identificador da proteoforma de acordo com a anotação v 2.0

^b Anotação funcional

^c Número de peptídeos exclusivos mapeados para a proteoforma

^d Número de “peptide-spectral match”

^e Expressão da proteoforma em cada tratamento representada pela média do NSAF das 3 repetições

^f Porcentagem de cobertura de identificação da proteoforma

^g Número de preditores de localização subcelular onde a proteoforma foi identificada – Preditores utilizados: TargetP, ChloroP, WoLF e Predotar

^h Número de banco de dados proteômicos onde a proteoforma foi identificada – Banco de dados utilizados: PPDB, AT-Chloro e SUBA3

Dentre as 19 proteoformas sugeridas como sendo cloroplastidiais, 15 foram proteoformas de TRX. As tioredoxinas são proteínas pequenas capazes de reduzir outras espécies de proteínas devido a existência de dois resíduos de cisteína em seu sítio canônico (MEYER; REICHHELD; VIGNOLS, 2005; PFALZ et al., 2012). Dentre as proteínas antioxidantes estudadas, a tioredoxina é a que apresenta maior número no genoma sendo 142 cópias, em comparação a 25 cópias de APX e 32 cópias de SOD, por exemplo. Por isso o alto número de identificações de tioredoxinas reflete a abundância dos genes que codificam essa enzima no genoma da espécie de referência utilizada aqui. Embora as TRX sejam as proteoformas antioxidantes identificadas em maior número, 2 cópias de APX (Eucgr.F00373.1, Eucgr.F04344.1), 1 cópia de SOD (Eucgr.K00110.6) e uma cópia de DHAR (Eucgr.J01595.1) também foram identificadas (Figura 3).

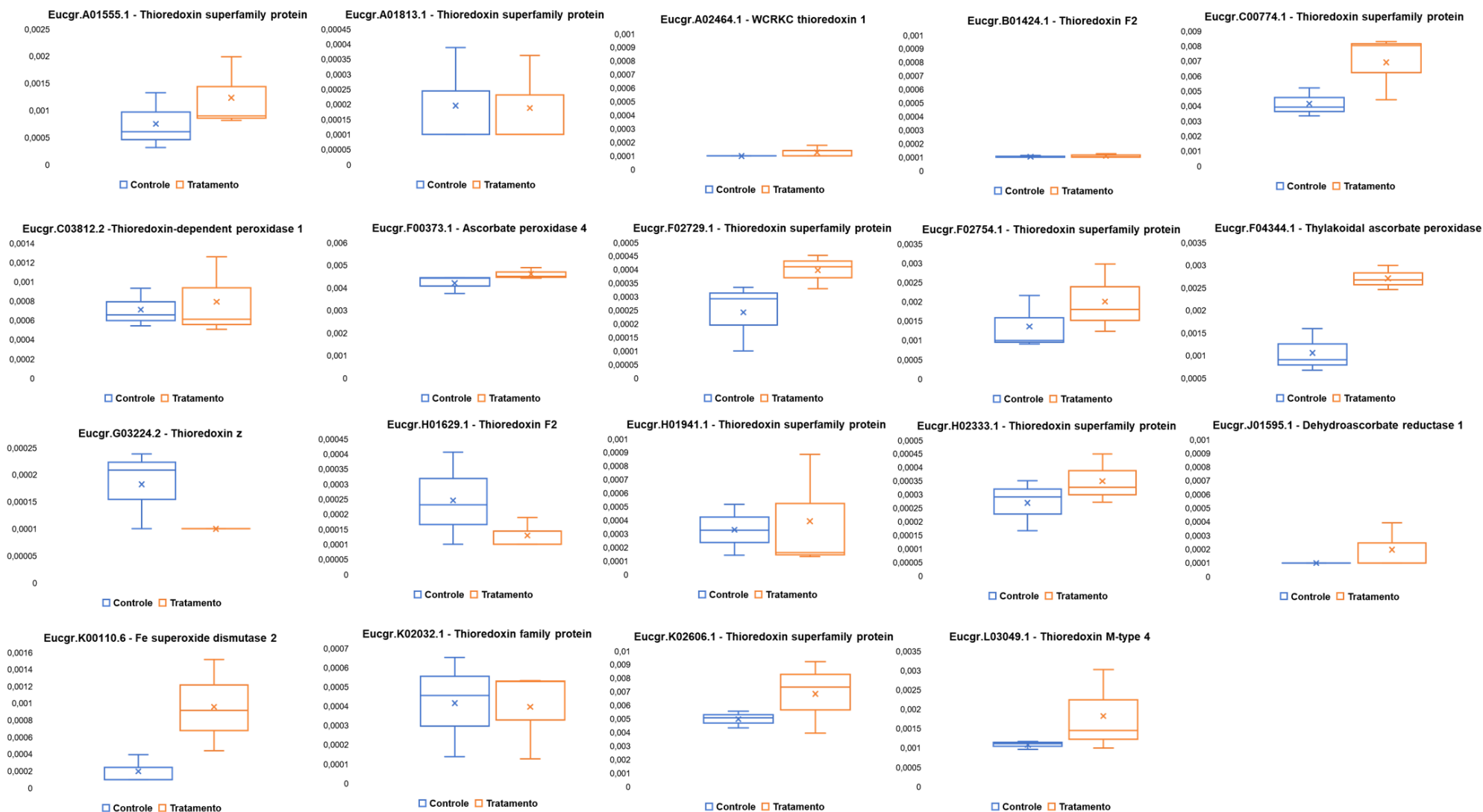


Figura 3. Perfil de expressão das proteoformas antioxidantes identificadas após a análise *in silico* em plantas de *E. urophylla* cultivadas em concentração de CO₂ de 980 ppm (tratamento) em relação a condição de 410 ppm (controle).

Dentre essas, as proteoformas Eucgr. F04344.1 (APX) e Eucgr. K00110.6 (SOD) foram consideradas diferencialmente reguladas (Figura 4) de acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis à 95% de confiança.

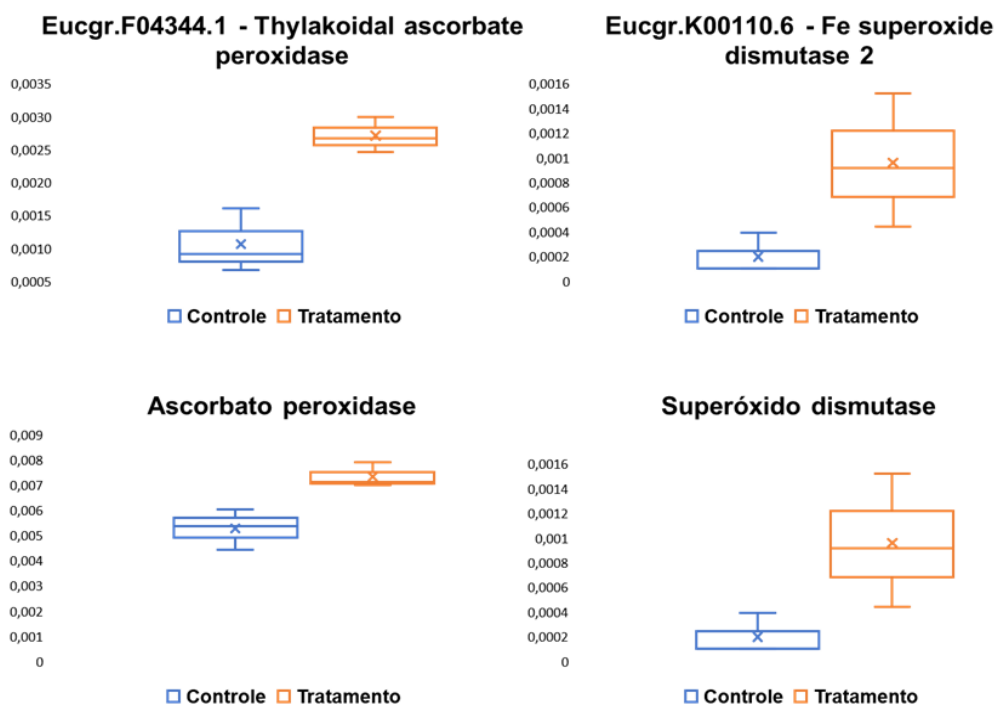


Figura 4. Perfil de expressão das proteoformas antioxidantes Eucgr.F0344.1 e Eucgr.K00110.6 e das enzimas APX e SOD identificadas como diferencialmente reguladas, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) em *E. urophylla* cultivado em concentração de CO₂ de 980 ppm (tratamento) em relação a condição de 410 ppm (controle).

A SOD é uma enzima antioxidante encontrada em todos os organismos aeróbicos e faz parte do sistema de defesa contra as EROs. Ela é responsável por catalisar a dismutação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Pode ser classificada em 3 proteoformas diferentes baseada no metal em que se liga: Mn-SOD (mitocôndria), Fe-SOD (cloroplastos) e Cu/Zn-SOD (citossol, peroxissomos e cloroplastos) (MITTLER, 2002). Aumento na expressão da SOD já foi observado em condições de estresse por Cd em *A. thaliana* (SKÓRZYŃSKA-POLIT; DRAŻKIEWICZ; KRUPA, 2004) e trigo (KHAN et al., 2007), e também em tomate (GAPIŃSKA; SKŁODOWSKA; GABARA, 2008) e trigo (BORZOUET et al., 2012) quando submetidos a condições de estresse salino. Chang-Quan e Rui-Chang (2008)

analisaram o efeito do estresse hídrico em cloroplastos de *Trifolium repens* L., e um aumento na expressão da SOD foi observado, principalmente na proteoforma Fe-SOD. Um aumento na expressão da proteoforma Fe-SOD também foi observado em soja sob tratamento com UV-B (YOON et al., 2016).

As peroxidases compõem uma família de enzimas antioxidantes que catalisam reações oxirredutases e têm o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como sua principal molécula aceptora. A APX, por exemplo, reduz o H_2O_2 à H_2O e tem maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT desempenhando um papel importante no processo de neutralização de EROs. Um aumento na expressão da APX foi observado em plantas de *Vigna mungo* (SINGH et al., 2008) e *Oryza sativa* (HSU; KAO, 2004) quando submetidas a condição de estresse por Cd e também em *Anabaena doliolum* (SRIVASTAVA; BHARGAVA; RAI, 2005) e tabaco (SUN et al., 2010) sob estresse salino. Aumento na expressão da APX também foi observado em soja durante estresse hídrico (KAUSAR et al., 2012).

Os resultados obtidos que apontam diferenças fisiológicas entre o controle (410 ppm) e o tratamento (980 ppm), além da sensibilidade da abordagem proteômica utilizada no trabalho, pressupõem que as alterações na expressão das proteoformas detectadas estão relacionadas a alterações metabólicas e não como resultado de um aumento no número de cloroplastos. Entretanto, estudos mais detalhados sobre essa questão devem ser realizados para confirmação da hipótese uma vez que Robertson e Leech (1995) observaram que o aumento de CO_2 não afetou o número de cloroplastos em folhas de trigo. Contudo, em plantas de *A. thaliana* foi registrado um aumento no número de cloroplastos quando as mesmas foram submetidas a alta concentração de CO_2 (TENG et al., 2006). É possível que essas diferenças estejam relacionadas ao tempo de exposição ao CO_2 e a diferentes respostas detectadas para diferentes espécies de plantas.

Ainda vale ressaltar que as enzimas APX e SOD apresentaram abundância significativamente maior quando as plantas foram expostas ao tratamento de 980 ppm (Figura 4) em relação ao controle. Diante dos resultados obtidos, é possível ilustrar o que pode ter ocorrido com o mecanismo antioxidante dessas plantas (Figura 5). A condição de estresse imposta pela alta concentração de CO_2 pode ter induzido uma alta produção do radical superóxido dentro das células, que levou ao aumento da

expressão da enzima SOD em uma tentativa de neutralizar o acúmulo dessa espécie reativa de oxigênio e consequentemente gerou uma grande quantidade de H_2O_2 . Um dos principais caminhos de neutralização de EROs em plantas é o ciclo Ascorbato-Glutationa, onde a APX é a enzima responsável por neutralizar o H_2O_2 em H_2O . A grande quantidade de H_2O_2 produzido pela SOD também pode ter levado à superexpressão da enzima APX nessa condição, em uma tentativa de anular os efeitos tóxicos que essas moléculas podem causar na planta quando encontradas em excesso. Esses resultados corroboram com a resposta antioxidante observada em pepino (HU et al., 2008), arroz (MISHRA; BHOO MIKA; DUBEY, 2013) e feijão (ZLATEV et al., 2006), são achados importantes e podem servir como bons indicadores para estresse em plantas de *E. urophylla* cultivadas em atmosfera com altas concentrações de CO_2 . Além disso, os produtos gênicos que foram diferencialmente expressos nessa condição (Eucgr. F04344.1 e Eucgr. K00110.6), podem ser explorados como alvos nos programas de melhoramento genético e nos processos de engenharia genética afim de atribuir maior resistência ao estresse abiótico induzido por CO_2 em plantas.

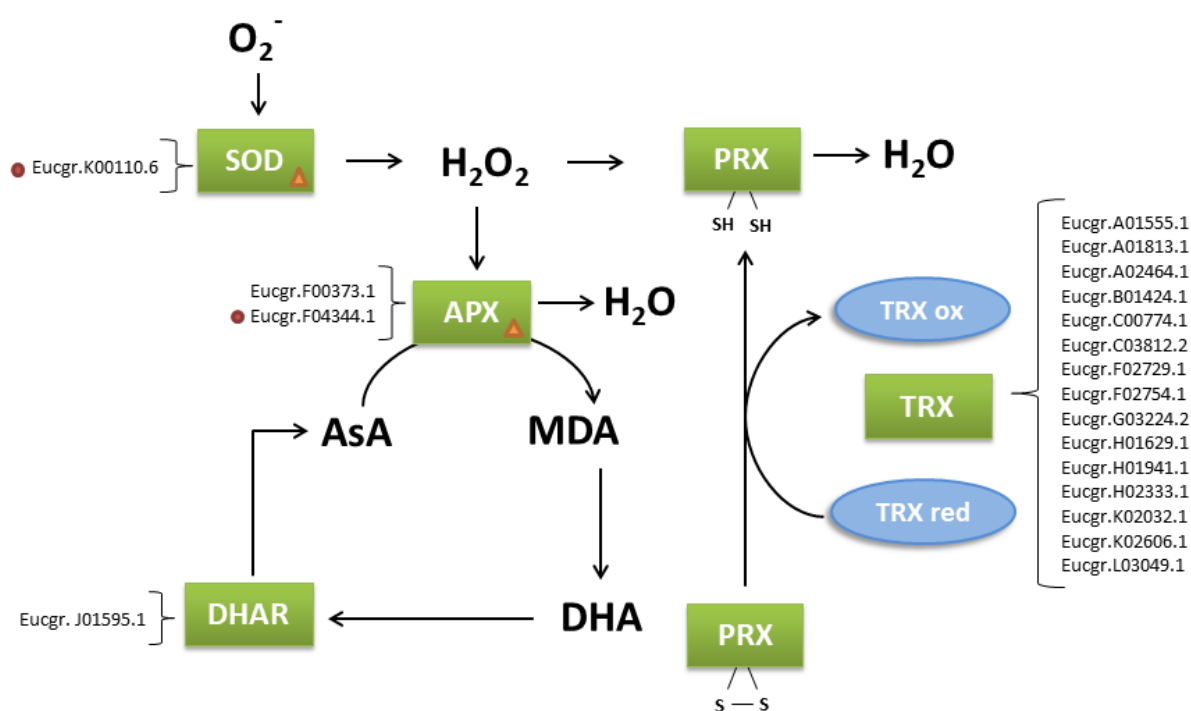


Figura 5. Via de neutralização de EROs. Círculos vermelhos indicam proteoformas diferencialmente reguladas em 980 ppm. Triângulos laranjas indicam

enzimas diferencialmente reguladas em 980 ppm. Abreviações: SOD – Superóxido dismutase, APX – Ascorbato peroxidase, MDA – Monodehidroascorbato, DHA – Dehidroascorbato, DHAR – Dehidroascorbato redutase, AsA – Ácido ascórbico, PRX – Peroxirredoxina, TRX – Tiorredoxina.

6. CONCLUSÕES

- As plantas de *E. urophylla* cultivadas na concentração de 980 ppm apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo comparado aos demais tratamentos.
- A diferença na abertura estomática observada nas plantas cultivadas nos tratamentos de 680 ppm e 980 ppm sugere que, dentro dessa faixa de concentração, a molécula de CO₂ deixa de atuar como indutor fotossintético e começa a atuar como agente estressante.
- Os produtos gênicos APX - Eucgr. F04344.1 e SOD - Eucgr. K00110.6 foram os mais responsivos ao estímulo de CO₂.

Essas proteoformas diferencialmente reguladas podem ser usadas como marcadores bioquímicos para o estresse abiótico ou como alvos em processos de engenharia genética para conferir maior resistência ao estresse CO₂. Entretanto, o baixo número de proteínas diferencialmente reguladas nos cloroplastos de *E. urophylla* indica que outros compartimentos celulares podem ter um papel igual ou mais importante na resposta antioxidante contra o estímulo de CO₂.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAF. Anuário Estatístico - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF**, p. 146, 2013.
- ADAMS, W. W.; MULLER, O.; COHU, C. M.; DEMMIG-ADAMS, B. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 31–44, 2013.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198, 13 mar. 2003.
- 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. **New Phytologist**, v. 165, n. 2, p. 351–372, 2005.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- ANJUM, S. A.; ASHRAF, U.; TANVEER, M.; KHAN, I.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; ZOHAIB, A.; ABBAS, F.; SALEEM, M. F.; ALI, I.; WANG, L. C. Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. February, p. 1–12, 2017.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391–396, 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 and Environment**, v. 32, n. 5, 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, n. 1, p. 13–21, 2003.

BELL, A. W.; WARD, M. A.; BLACKSTOCK, W. P.; FREEMAN, H. N. M.; CHOUDHARY, J. S.; LEWIS, A. P.; CHOTAI, D.; FAZEL, A.; GUSHUE, J. N.; PAIEMENT, J.; PALCY, S.; CHEVET, E.; LAFRENIERE-ROULA, M.; SOLARI, R.; THOMAS, D. Y.; ROWLEY, A.; BERGERON, J. J. M. Proteomics Characterization of Abundant Golgi Membrane Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 5152–5165, 2001.

BHATTACHARJEE, S. Sites of Generation and Physicochemical Basis of Formation of Reactive Oxygen Species in Plant Cell. In: **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**. Science Publishers, p. 1–30, 2010.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, v. 89, n. 7, p. 1113–1121, 2005.

BORZOUEI, A.; KAFI, M.; AKBARI-GHOGDI, E.; MOUSAVI-SHALMANI, M. Long term salinity stress in relation to lipid peroxidation, super oxide dismutase activity and proline content of salt-sensitive and salt-tolerant wheat cultivars. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 476–482, 2012.

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, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CAO, Y.; LUO, Q.; TIAN, Y.; MENG, F. Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 53, 2017.

CASSON, S. A.; HETHERINGTON, A. M. Environmental regulation of stomatal development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 90–95, 2010.

CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p. 9–23, 2008.

CHANG-QUAN, W.; RUI-CHANG, L. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 841–847, 2008.

CHATER, C.; PENG, K.; MOVAHEDI, M.; DUNN, J. A.; WALKER, H. J.; LIANG, Y. K.; MCLACHLAN, D. H.; CASSON, S.; ISNER, J. C.; WILSON, I.; NEILL, S. J.; HEDRICH, R.; GRAY, J. E.; 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, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504–5516, 2006.

CHO, U.-H.; SEO, N.-H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 113–120, 2005.

CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 4, p. e23681, 2013.

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, n. 4, p. 607–614, 2008.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3 p. 117–124, 2000.

CYRNE, L.; MARTINS, L; FERNANDES, L; MARINHO, S. H. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 385–393, 2003.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. December, p. 1–13, 2014.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, n. 1, p. 29–41, 2012.

DREGER, M. Subcellular proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, n. 1, p. 27–56, 2003.

ESRL - Earth System Research Laboratory, National Oceanic and Atmospheric Administration, **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**, 2017. Disponível em: <<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/full.html>> Acesso em: 16 out. 2017.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991.

FARFAN-VIGNOLO, E. R.; ASARD, H. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 59, p. 55–62, 2012.

FISCHER, B. B.; HIDEĞ, É.; KRIEGER-LISZKAY, A. Production, Detection, and Signaling of Singlet Oxygen in Photosynthetic Organisms. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 16, p. 2145–2162, 2013.

FOYER, C. H. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell Online**, v. 17, n. 7, p. 1866–1875, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056–1071, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355–364, 2003.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 93–100, 2011.

FUKAO, Y.; HAYASHI, M.; NISHIMURA, M. Proteomic Analysis of Leaf Peroxisomal Proteins in Greening Cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 7, p. 689–696, 2002.

GAPIŃSKA, M.; SKŁODOWSKA, M.; GABARA, B. Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 1, p. 11–18, 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

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. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 1178–1186, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. **Plants, Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**, p. 169–205, 2013.

HASSAN, M. AL.; CHAURA, J.; DONAT-TORRES, M. P.; BOSCAIU, M.; VICENTE, O. Antioxidant responses under salinity and drought in three closely related wild monocots with different ecological optima. **AoB PLANTS**, v. 9, n. 2, 2017.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HEAZLEWOOD, J. L.; HOWELL, K. A.; WHELAN, J.; MILLAR, A. H. Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. **Plant Physiol**, v. 132, n. 0032–0889 (Print), p. 230–242, 2003.

HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant Systems and O_2^-/H_2O_2 Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 817–831, 2001.

HETHERINGTON, A. M. Guard cell signaling. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 711–714, 2001.

HŮRAK, H.; KOLLIST, H.; MERILO, E. Fern Stomatal Responses to ABA and CO₂ Depend on Species and Growth Conditions. **Plant Physiology**, v. 174, n. 2, p. 672–679, 2017.

HSU, Y. T.; KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 227–238, 2004.

HU, W. H.; SONG, X. S.; SHI, K.; XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. **Photosynthetica**, v. 46, n. 4, p. 581–588, 2008.

IBÁ. - Indústria brasileira de Árvores. **Anuario estatístico da IBA: ano base 2014**, p. 100, 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.

KAUSAR, R.; HOSSAIN, Z.; MAKINO, T.; KOMATSU, S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. **Mol Biol Rep.**, v. 39, p. 10573-10579, 2012.

KEEGSTRA, K.; CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **The Plant cell**, v. 11, n. 4, p. 557–570, 1999.

KHAN, N. A.; SAMIULLAH; SINGH, S.; NAZAR, R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 6, p. 435–444, 2007.

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

KINOSHITA, T.; DIO, M.; SUETSUGU, N.; KAGAWA, T.; WADA, M.; et al. Phot1 and Phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. **Nature**. v. 414, p. 656, 2001.

KUMARI, S.; AGRAWAL, M.; TIWARI, S. Impact of elevated CO₂ and elevated O₃ on *Beta vulgaris* L.: Pigments, metabolites, antioxidants, growth and yield. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 279–288, 2013.

LIBERLOO, M.; CALFAPIETRA, C.; LUKAC, M.; GODBOLD, D.; LUO, Z. B.; POLLE, A.; HOOSBECK, M. R.; KULL, O.; MAREK, M.; RAINES, C.; RUBINO, M.; TAYLOR, G.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G.; CEULEMANS, R. 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, n. 6, p. 1094–1106, 2006.

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tools for the new biology**. Humana Press: New Jersey, p. 3, 2002.

LIU, H.; 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. 4193–4201, 2004.

MATROS, A.; KASPAR, S.; WITZEL, K.; MOCK, H. P. Recent progress in liquid chromatography-based separation and label-free quantitative plant proteomics. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 963–974, 2011.

MEYER, Y.; REICHHELD, J. P.; VIGNOLS, F. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. **Photosynthesis Research**, v. 86, n. 3, p. 419–433, 2005.

MILLAR, A. H. Location, location, location: Surveying the intracellular real estate through proteomics in plants. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 6, p. 563–571, 2004.

MISHRA, P.; BHOO MIKA, K.; DUBEY, R. S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, v. 250, n. 1, p. 3–19, 2013.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 459–481, 2007.

MORA, A.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p.12, 2000.

MOSER, S. C.; LUERS, A. L. Managing climate risks in California: The need to engage resource managers for successful adaptation to change. **Climatic Change**, v. 87, n. 1 SUPPL, 2007.

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.; MERWE, K.; SINGH, P.; JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, 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. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate And Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 249–279, 1998.

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-ARENDT, K.; AVELINE-WOLF, L.; PIERCE, K. G.; MENDOZA, 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, n. 10, p. 1487–1502, 2005.

OLSEN, J. V.; ONG, S.-E.; MANN, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608–614, 2004.

PAOLETTI, A. C.; PARMELY, T. J.; TOMOMORI-SATO, C.; SATO, S.; ZHU, D.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 50, p. 18928–18933, 2006.

PARK, O. K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 133–138, 2004.

PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y. Características Da Madeira De Algumas Espécies De Eucalipto Plantadas No Brasil. **Embrapa Florestas**, v. Documentos, 38, p. 113p, 2000.

PFALZ, J.; LIEBERS, M.; HIRTH, M.; GRÜBLER, B.; HOLTZEGEL, U.; SCHRÖTER, Y.; DIETZEL, L.; PFANNSCHMIDT, T. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. November, p. 257, 2012.

PFLIEGER, D.; BIGEARD, J.; HIRT, H. Isolation and characterization of plant protein complexes by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1824–1833, 2011.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Review - Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **J. Phycol.**, v. 39, p. 1008–1018, 2003.

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

REN, J.; SUN, L. N.; ZHANG, Q. Y.; SONG, X. S. Drought tolerance is correlated with the activity of antioxidant enzymes in *Cerasus humilis* seedlings. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 9, 2016.

ROBERTSON, E. J.; LEECH, R. M. Significant changes in cell and chloroplast development in young wheat leaves (*Triticum aestivum* cv Hereward) grown in elevated CO₂. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 63–71, 1995.

RODZIEWICZ, P.; SWARCEWICZ, B.; CHMIELEWSKA, K.; WOJAKOWSKA, A.; STOBIECKI, M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 1, p. 1–19, 2014.

RUY, O. F.; FILHO, M. T. Variação da qualidade da madeira entre grupos fenotípicos de clones de *Eucalyptus urophylla* S . T . Blake da Ilha de Flores , Indonesia. **Scientia**, p. 21–27, 2001.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 6, p. 1–17, 2004.

SANTOS, B. M. DOS; BALBUENA, T. S. Carbon assimilation in *Eucalyptus urophylla* grown under high atmospheric CO₂ concentrations: A proteomics perspective. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 252–257, 2017.

SCHROEDER, J. I.; ALLEN, G. J.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK, J. M.; WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 627–658, 2001.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant Effects of Plant Polyphenols. In: **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**. Science Publishers, p. 275–293, 2010.

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, Y.; ZHOU, Y.; XIA, X.; CHEN, Z.; YU, J. Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂-induced stomatal movement in tomato. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 342–353, 2015.

SHIRAYA, T., KANEKO, K., MITSUI, T. Quantitative Proteomic Analysis of Intact Plastids. Jorrin-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.

SINGH, S.; KHAN, N. A.; NAZAR, R.; ANJUM, N. A. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. **American Journal of Plant Physiology**, v. 3, n. 1, p. 25–32, 2008.

SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; DRAŹKIEWICZ, M.; KRUPA, Z. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 1, p. 71-78, 2004.

SRIVASTAVA, A. K.; BHARGAVA, P.; RAI, L. C. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 1291–1298, 2005.

STANTURF, J. A.; VANCE, E. D.; FOX, T. R.; KIRST, M. Eucalyptus beyond Its Native Range: Environmental Issues in Exotic Bioenergy Plantations. **International Journal of Forestry Research**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

SUN, W. H.; DUAN, M.; SHU, D. F.; YANG, S.; MENG, Q. W. Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 8, p. 917–926, 2010.

TENG, N.; WANG, J.; CHEN, T.; WU, X.; WANG, Y.; LIN, J. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. **The New Phytologist**, v. 172, p. 92–103, 2006.

THE PLANT LIST, **Version 1.1**, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>> Acesso em: 25 set. 2017.

UBEREGUI, E.; HALL, M.; LORENZO, O.; SCHRODER, W. P.; BALSERA, M. An *Arabidopsis* soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the Executer pathway in response to increased light conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 2067–2077, 2015.

VAN WIJK, K. J. Plastid proteomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 963–977, 2004.

VAN WIJK, K. J. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 501–508, 2001.

VAN WIJK, K. J. Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 420-425, 2000.

VELIKOVA, V.; GHIRARDO, A.; VANZO, E.; MERL, J.; HAUCK, S. M.; SCHNITZLER, J. Genetic manipulation of isoprene emissions in poplar plants remodels the chloroplast proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 2005–2018, 2014.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 645–655, 2003.

VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista Do Bndes**, v. 14, n. 28, p. 235–276, 2007.

YOON, M. Y.; KIM, M. Y.; SHIM, S.; KIM, K. D.; HA, J.; SHIN, J. H.; KANG, S.; LEE, S.-H. Transcriptomic Profiling of Soybean in Response to High-Intensity UV-B Irradiation Reveals Stress Defense Signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. December, p. 1917, 2016.

ZHU, W.; SMITH, J. W.; HUANG, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

ZHU, J.; CHEN, S.; ALVAREZ, S.; ASIRVATHAM, V. S.; SCHACHTMAN, D. P.; WU, Y.; SHARP, R. E. Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. II. Region-Specific Changes in Water Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins under Water Deficit. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 1533–1548, 2007.

ZLATEV, Z. S.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; YORDANOV, I. T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 3, p. 389–394, 2006.