

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Alterações do proteoma do caule e da seiva de plantas
jovens de eucalipto sob estímulo do CO₂**

Felipe Alexsander Rodrigues da Silva

Biólogo

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Alterações do proteoma do caule e da seiva de plantas
jovens de eucalipto sob estímulo do CO₂**

Felipe Alexsander Rodrigues da Silva

Orientador: Dr. Tiago Santana Balbuena

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

2023

S586a Silva, Felipe Alexsander Rodrigues da
Alterações do proteoma do caule e da seiva de plantas
jovens de eucalipto sob estímulo do CO₂ / Felipe Alexsander
Rodrigues da Silva. -- Jaboticabal, 2023
108 p.

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

1. Proteômica. 2. Proteínas. 3. Caules de planta. 4.
Eucalyptus. 5. Metabolismo. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES DO PROTEOMA DO CAULE E DA SEIVA DE PLANTAS JOVENS DE EUCALIPTO SOB ESTÍMULO DO CO₂

AUTOR: FELIPE ALEXSANDER RODRIGUES DA SILVA

ORIENTADOR: TIAGO SANTANA BALBUENA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **TIAGO SANTANA BALBUENA**
Data: 28/08/2023 13:36:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE (Participação Virtual)
ESALQ USP / Piracicaba/SP

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ALBERTO LABATE**
Data: 29/08/2023 09:29:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FLAVIA VISCHI WINCK (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / CENA USP Piracicaba/SP

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIA VISCHI WINCK**
Data: 28/08/2023 15:35:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **JESUS APARECIDO FERRO**
Data: 29/08/2023 11:26:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL GUARIZ PINHEIRO**
Data: 29/08/2023 17:26:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 28 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Felipe Alexsander Rodrigues da Silva, nascido em 21 de junho de 1996 em Ribeirão Preto – SP. É bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (2015 – 2018). Também é licenciado em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal de São Paulo, Câmpus de Sertãozinho (2019 – 2022). No ano de 2015 entrou no laboratório de Proteômica Vegetal presente no Departamento de Tecnologia do Câmpus FCAV, sob orientação do Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena. No período de 2017 a 2018 desenvolveu iniciação científica no tema de proteômica de seiva com auxílio de bolsa PROPe/PIBIC. Em 2019 ingressou no Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob mesma orientação. Ao final de 2019, ingressou no Doutorado Direto no mesmo programa de pós-graduação como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Eu dedico,

A minha avó,

Vanir.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Santana Balbuena, por todos os ensinamentos, paciência, confiança e parceria em todos estes anos.

A minha família, irmão (Fábio), tia (Alessandra), tio (Júlio), pai (André), Rita, Diego e Júlia, Eric, tios e tios avós e aos demais que foram de fundamental importância e pilares para minha formação.

Ao meu amor, Daniela, que sempre esteve comigo durante esses anos, me apoiando e incentivando com muito amor, carinho e dedicação. Ao nosso bebê, Ned, que nos alegra e faz tanta companhia.

Aos meus irmãos da vida e de república, República Kilombo, a qual passei 5 anos da minha vida compartilhando histórias e ensinamentos. Os nomes são muitos, mas alguns se destacam: Só-Love, Cú-Telo, Maomé, Tesouro, Bonavina, Néviton, Vomitolé, Kuringa, Zumbi, Pudendo, Power...

Aos colegas de laboratório: Naiara, Gabriel, Amanda, Patrícia, Guilherme e Marina que tanto me ensinaram e fizeram parte dessa trajetória.

Aos professores da instituição que passaram pela minha formação, em especial Prof. Dr. Rinaldo, com ensinamentos e o material necessário para a pesquisa.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - 2019/17331-6.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 – Informações gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. O <i>Eucalyptus</i> e sua importância no cenário florestal.....	2
2.2. Mudanças climáticas e seus efeitos nos organismos vegetais.....	4
2.3. A técnica e abordagem de proteômica	6
2.4. A proteômica dos tecidos vasculares de plantas	8
3. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 2 – Proteome profiling of vascular sap regarding <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>Eucalyptus urophylla</i> and <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	20
Abstract.....	20
REFERENCES	28
Supporting Information	33
Materials and Methods.....	33
Plant material and vascular sap sampling	33
Proteome isolation.....	33
Mass spectrometry (MS) analysis.....	34
Protein identification and bioinformatics	34
References	35
Supplementary Figures and Tables	36
CAPÍTULO 3 – Alterações no proteoma de caules e seiva de plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i> cultivadas em alta concentração de CO ₂	51
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. OBJETIVOS.....	52
2.1. Objetivo geral	52
2.2. Objetivos Específicos.....	52
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. Cultivo do material vegetal e tratamento de CO ₂	53
3.2. Quantificação de açúcares na seiva.....	53
3.3. Extração proteica.....	54
3.3.1. Extração de proteínas caulinares.....	54

3.3.2.	<i>Extração de proteínas de seiva</i>	54
3.4.	<i>Análise por espectrometria de massas</i>	55
3.5.	<i>Identificação de proteínas</i>	56
3.6.	<i>Processamento de dados e bioinformática</i>	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1.	<i>Diferenças no proteoma caulinar das espécies de Eucalyptus frente ao estímulo de CO₂ ambiente</i>	57
4.2.	<i>Alterações metabólicas induzidas pelo estímulo em atmosfera enriquecida por CO₂</i> 67	
4.2.1.	<i>A via de biossíntese da lignina</i>	67
4.2.2.	<i>Análise da enzima 'sucrose synthase' (SuSy)</i>	69
4.2.3.	<i>O metabolismo antioxidante</i>	71
4.2.4.	<i>O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)</i>	74
4.3.	<i>Alterações no proteoma de seiva frente ao estímulo de CO₂</i>	77
4.4.	<i>Quantificação de açúcares na seiva das espécies de Eucalyptus</i>	82
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
6.	REFERÊNCIAS	86

ALTERAÇÕES DO PROTEOMA DO CAULE E DA SEIVA DE PLANTAS JOVENS DE EUCALIPTO SOB ESTÍMULO DO CO₂

RESUMO - As intensas atividades humanas podem causar irreversíveis problemas ambientais. O *Eucalyptus* é uma espécie florestal, muito utilizada nas florestas plantadas, com grande capacidade de auxiliar na mitigação das emissões e acúmulo de CO₂ graças ao seu metabolismo C3 e grande retenção de moléculas de carbono em sua biomassa. O objetivo deste estudo foi investigar as diferenças no proteoma de caules e da seiva de duas espécies de *Eucalyptus*, bem como o metabolismo primário das plantas quando cultivadas em uma atmosfera enriquecida com CO₂. Para tanto, plantas jovens de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* foram cultivadas em câmaras de crescimento por 30 e 20 dias para análise do proteoma do caule e da seiva, respectivamente. Um total de 2293 proteínas não-redundantes foram identificadas na análise do proteoma do caule. Os resultados sugerem um efeito mais pronunciado em *Eucalyptus urophylla*, uma vez que um total de 44 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas após estímulo ambiental. Além disso, o proteoma caulinar mostrou-se composto principalmente por proteínas relacionadas à estrutura celular, modificações pós-traducionais e produção de energia. Apesar do aumento significativo nas concentrações de açúcares na seiva na condição de cultivo em alto CO₂, não foram encontradas diferenças estatísticas nos metabolismos estudados possivelmente indicando uma falta de estímulo suficiente para essa alteração. Quanto ao proteoma vascular, 146 proteínas foram identificadas como extracelulares e consideradas aqui como sendo proteínas do sistema vascular. A análise da função e abundância das proteínas revelou que as proteínas da seiva de *Eucalyptus* estão principalmente envolvidas no metabolismo de substâncias orgânicas e proteólise. Esses resultados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta das espécies de eucalipto ao aumento do CO₂ e fornecer informações úteis para o manejo e cultivo dessas espécies em ambientes com altos níveis de dióxido de carbono.

Palavras-chave: Proteômica, Proteínas, Caules de planta, *Eucalyptus*, Metabolismo

CHANGES IN THE STEM AND SAP PROTEOME OF YOUNG EUCALYPTUS PLANTS UNDER HIGH CO₂ STIMULUS

ABSTRACT – The intense human activities can cause irreversible environmental problems. *Eucalyptus* is a forest species widely used in planted forests, with a great capacity to assist in the mitigation of CO₂ emissions and accumulation due to its C₃ metabolism and high retention of carbon molecules in its biomass. The objective of this study was to investigate the differences in the proteome of stems and sap of two *Eucalyptus* species, as well as the primary metabolism of plants when grown in an atmosphere enriched with CO₂. For this purpose, young *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* plants were grown in growth chambers for 30 and 20 days for stem and sap proteome analysis, respectively. Stem samples were processed, and sap was collected using a pressure chamber to obtain the protein pellet. A total of 2293 proteins were identified in the stem proteome analysis of both species. The results suggest a more pronounced effect in *Eucalyptus urophylla*, since a total of 44 differentially expressed proteins were identified after environmental stimulation. Additionally, the stem is mainly composed of proteins related to cell structure, post-translational modifications, and energy production. Despite the slight increase in sugar concentrations in the sap under 680 ppm CO₂, no statistical differences were found in the studied metabolisms. The vascular proteome revealed 146 extracellular proteins, and their relative abundance was associated with the enriched atmosphere treatments. The analysis of protein function and abundance revealed that *E. grandis* proteins are mainly involved in organic substance metabolism and proteolysis, while less abundant proteins are related to cellular defense responses. Similar results were obtained for *E. urophylla*, with the most abundant proteins performing metabolic functions, while the least abundant protein was related to oxidative stress. These results may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the response of eucalyptus species to increased CO₂ and provide useful information for the management and cultivation of these species in high levels of carbon dioxide environments.

Keywords: Proteomics, Proteins, Plant Stem, Eucalyptus, Metabolism

CAPÍTULO 1 – Informações gerais

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas podem alterar significativamente a adaptação e desenvolvimento das plantas (EASTERLING et al., 2000). A notória influência humana no meio ambiente, como no desmatamento e na emissão de gases de efeito estufa, podem resultar em uma série de problemas ambientais e mudanças climáticas (MENEZES-SILVA et al., 2019). A concentração de CO₂ atmosférico, por exemplo, vem aumentando desde o início da revolução industrial (ARCE et al., 2014). Segundo a *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), nos Estados Unidos, a concentração de CO₂ na atmosfera em 2023 foi de 420 ppm, o maior valor desde 1958. Ademais, esse valor deve chegar a aproximadamente 1000 ppm em 2100, de acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC).

Neste contexto, as florestas desempenham um papel de imenso valor tanto social quanto econômico, pois atuam como um dos principais mecanismos responsáveis pelo sequestro de carbono, o que resulta na considerável redução das emissões de CO₂ provenientes de atividades antropogênicas (JIANG et al., 2020). Nesse sentido, o gênero *Eucalyptus* é uma escolha altamente adequada para plantações florestais (SILVEIRA et al., 2020), devido ao seu metabolismo fotossintético do tipo C3. As espécies com este tipo de mecanismo têm o potencial de aumentar sua capacidade fotossintética e sua biomassa quando cultivadas em condições elevadas de CO₂ atmosférico (KIMBALL, 2016). Além disso, estudos anteriores demonstraram respostas positivas de crescimento em plantas lenhosas expostas a atmosferas enriquecidas com CO₂, desde que outros recursos adequados também sejam fornecidos (ATWELL et al., 2009; LIBERLOO et al., 2006).

Além da fotossíntese, o cultivo de plantas em atmosfera enriquecida de CO₂ pode afetar diretamente outros metabolismos, como a respiração e o metabolismo de carboidratos (DUSENGE et al., 2019; ABDELGAWAD et al., 2014). Ademais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também podem sofrer alteração na biomassa das plantas, principalmente devido ao

fechamento estomático (KOLLA et al., 2007; SHI et al., 2015). Por outro lado, o sistema vascular das plantas também pode sofrer alterações em seu proteoma quando submetido a mudanças ambientais (EVERT, 1990; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011). Isso se deve principalmente à comunicação entre a raiz e os tecidos aéreos existentes nas plantas (SCHEPPER et al., 2013).

Estudos sobre a comunicação à longa distância, envolvendo a proteômica como principal ferramenta, podem fornecer informações importantes sobre os metabólitos que atuam nas respostas sistêmicas que permitem com que as plantas respondam rapidamente às mudanças ambientais (EVERT, 1990; RAVEN, 1991; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011; WU e BALDWIN, 2010). Desse modo, compreender a comunicação de longa distância em plantas cultivadas sob atmosfera enriquecida com CO₂ pode apontar os principais agentes de sinalização presentes no proteoma de seiva e revelar respostas sistêmicas na porção fonte-dreno desses organismos.

O objetivo do presente trabalho foi (1) estabelecer um método de extração e de análise do proteoma de plantas jovens de *Eucalyptus*, bem como obter um panorama do proteoma de seiva de espécies comercialmente importantes dentro do gênero; (2) Investigar as alterações no proteoma de caule e de seiva das espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* quando cultivadas em CO₂ atmosférico elevado; (3) analisar as variações em termos quantitativos das enzimas envolvidas nos principais ciclos metabólicos de plantas (lignina, celulose, ácido tricarboxílico e espécies reativas de oxigênio).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O *Eucalyptus* e sua importância no cenário florestal

O gênero *Eucalyptus* possui vasta importância no cenário mundial e brasileiro de florestas plantadas devido a sua adaptabilidade a diversos climas e finalidades industriais. Acredita-se que a introdução do gênero no Brasil tenha ocorrido por volta de 1820 no Jardim Botânico no Rio de Janeiro (MARCHIORI, 2014) com o intuito de atender as demandas de construção de ferrovias no país na época (SAMPAIO, 1961). Após a introdução do gênero no país, teve-se início

à pesquisa sistemática do gênero em meados de 1904, por Edmundo Navarro de Andrade, introduzindo diversas espécies do gênero para a Estação de Rio Claro em São Paulo (CASTRO et al., 2016). Muito embora a ordem cronológica dos fatos seja facilmente extrapolada devido à falta de documentação da época, houve nos anos 40 o início das tentativas de melhoramento genético das espécies introduzidas no Brasil, realizado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Hoje o gênero *Eucalyptus* é considerado portador da madeira mais importante no Brasil e em diversos outros países tropicais e subtropicais (IBÁ, 2020).

O *Eucalyptus* spp. é uma espécie alógama (ELDRIDGE et al., 1993) pertencente à família Myrtaceae (THE PLANT LIST, 2019), juntamente com os grupos Corymbia e Angophora (POTTS E BRADLEY, 2004). É nativo da Austrália e da Indonésia, florescendo principalmente no hemisfério sul, em climas tropicais e subtropicais (STANTURF et al., 2013). Atualmente, há mais de 700 espécies com diferentes características físico-químicas catalogadas de eucalipto, porém somente algumas são utilizadas em aplicações agroindustriais (e.g. *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. dunniie*, *E. pellita*) (STANTURF et al., 2013). No Brasil, cultiva-se principalmente *E. grandis* e *E. urophylla*, bem como seu híbrido, *E. urograndis* (VITAL, 2007). As florestas plantadas ao redor do mundo compreendem principalmente os gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, sendo estes presentes em cerca de 264 milhões de hectares (FAO, 2006). No Brasil, a floresta plantada é de suma importância para a economia e o mercado agroindustrial, uma vez que fornece os principais componentes para a produção de papel e celulose e, somente o eucalipto, representa cerca de 70% dessas florestas no país (IBÁ, 2021). Além do papel e celulose, outras substâncias são obtidas através do cultivo das plantações florestais, como a madeira, óleos vegetais, carvão, energia, entre outros (ABRAF, 2013).

Em 2022, a área total de árvores plantadas no Brasil atingiu os 9,93 milhões de hectares e a produtividade do eucalipto atingiu seu maior nível desde 2014, chegando a 38,9m³/ha/ano em 2021 (IBÁ, 2022). Os Estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul abrigam as maiores florestas plantadas no país. Dentre as principais espécies, *Eucalyptus*

grandis é a mais cultivada devido às suas características de importância econômica, como a propriedade da madeira e variabilidade genética (KAGEYAMA, 1980; MORAES, 1987; ASSIS, 1996). O *Eucalyptus urophylla*, por sua vez, é bastante utilizado devido a sua resistência ao cancro do eucalipto e à seca. Com isso, o híbrido das duas espécies, *Eucalyptus urograndis*, possui diversos atributos favoráveis para a produção de papel e celulose, madeira serrada e carvão vegetal (RUY E FILHO, 2001).

2.2. Mudanças climáticas e seus efeitos nos organismos vegetais

O mundo vem sofrendo com uma série de problemas ambientais nos últimos anos, principalmente devido às influências antropogênicas como o desmatamento e emissões de gases de efeito estufa na atmosfera (QADERI E REID, 2009; MENEZES-SILVA et al., 2019). A concentração de CO₂ atmosférico é um ponto de atenção no que diz respeito às mudanças climáticas e este vem crescendo exponencialmente desde 1760 com o início da revolução industrial (ARCE et al., 2014). No final de 2022, o observatório de Mauna Loa, no Havaí, registrou a marca histórica de 420,99 ppm de CO₂, sendo 1,8 ppm maior do que o ano de 2021 e o maior registro desde 1958 quando foi dado início ao monitoramento (NOAA, 2023).

De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), a concentração de CO₂ atmosférico deve chegar entre 700-1000 ppm por volta de 2100. Apesar da crescente variedade de políticas destinadas a mitigar as alterações climáticas locais, as emissões anuais de gases de efeito estufa provenientes da queima de combustíveis cresceram exponencialmente entre 2000 e 2010, por exemplo, quando comparado aos anos anteriores (IPCC, 2014). Neste cenário, é esperado que muitos organismos sofram influências e adaptações intrínsecas a tais estímulos externos, aumentando a adaptabilidade ou a vulnerabilidade relativa destes indivíduos (STAUDINGER et al., 2013).

As plantas, por sua vez, terão papel fundamental nestes próximos cenários globais, principalmente devido à fotossíntese, responsável pela assimilação de carbono em sua biomassa (LEAKEY et al., 2009; SHAO et al., 2009). Neste sentido, as florestas plantadas têm um enorme valor social e

financeiro, pois funcionam como sequestradores de carbono, mitigando significativamente as emissões excessivas de CO₂ no cenário atual (JIANG et al., 2020).

O gênero *Eucalyptus* é um ótimo modelo para a utilização em florestas plantadas (SILVEIRA et al., 2020) e seu metabolismo do tipo C3 é de extrema importância neste contexto social e financeiro. Considerando que a atividade da RuBisCO em plantas C3 é limitada pelo CO₂, sua eficácia de assimilação fotossintética pode aumentar em até 50% em condições de atmosfera de CO₂ elevado, aumentando assim a produtividade primária das plantas (NORBY et al., 2005; AINSWORTH et al., 2005; LEAKEY et al., 2009). Uma vez que a via fotossintética do tipo C3 depende de uma maior relação CO₂:O₂ (PORTIS E PARRY, 2007), esse tipo de mecanismo favorece a planta na sua capacidade de fixação de esqueletos de carbono quando influenciada pela alta concentração de CO₂ atmosférico (DUSENGE et al., 2019). Além disso, a concentração de CO₂ atmosférico elevada pode aumentar a eficácia dos fotossistemas de plantas bem como os produtos das reações à luz (ATP e NADPH), utilizados para fixação do carbono em açúcares durante a fotossíntese (VAN HEERDEN et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Por conseguinte, tais condições vão aumentar a concentração de açúcares (glicose, sacarose, rafinose e frutose) em diversas espécies (ARANJUELO et al., 2015; WATANABE et al., 2013). Nestes organismos submetidos a atmosfera enriquecida por CO₂, pode ocorrer um aumento de cerca de 40% de sua biomassa (POORTER E NAVAS, 2003). O carbono fixado pode ser metabolizado em carboidratos estruturais, resultando em possíveis aumentos nos níveis de celulose da planta (COSTA, 2004; SOUZA, 2007).

A celulose é o polímero mais abundante presente na biosfera e é um dos constituintes essenciais da madeira, juntamente com a hemicelulose e lignina (BOERJAN et al., 2003). Tais polímeros exercem papel fundamental em termos biológicos: mecanismos de defesa, rigidez mecânica, resistência a biodegradação, entre outros (BHUIYAN et al., 2009), como também em termos agroindustriais: papel, madeira e a própria celulose. A lignina, por sua vez, apresenta-se em concentrações e com composições diferentes entre as espécies e em diferentes tecidos e órgãos da mesma planta. Além disso, esses

fatores podem oscilar nos estudos em plantas de diferentes fases do desenvolvimento ou quando estimuladas externamente (PLOMION et al., 2001; LEAKEY et al., 2009; CAROCHA et al., 2015).

Outro processo biológico conhecido por sofrer alterações em plantas cultivadas em alta concentração de CO₂ é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOLLA et al., 2007; SHI et al., 2015). Tais radicais são geralmente neutralizados pelo sistema de defesa enzimático geralmente composto pela catalase, superóxido dismutase, glutatona e peroxidase (ALEXI et al., 1998; GIANNI et al., 2004; APEL E HIRT, 2004; HASANUZZAMAN et al., 2012). Com isso, danos e respostas oxidativas são decorrentes da produção de EROs e o funcionamento das defesas antioxidantes (HALLIWEL, 1992). A atividade das enzimas catalizadoras de EROs já foram monitoradas em estudos de estresse abiótico, onde a atividade da superóxido dismutase, catalase e peroxidase tiveram suas atividades aumentadas em plantas quando submetidas a estresse térmico (LIU et al., 2013; WANG et al., 2014).

2.3. A técnica e abordagem de proteômica

A função e exequibilidade de uma célula e/ou tecido são mantidas pelo seu proteoma, que é um conjunto de proteínas expressas pelo seu genoma em um determinado tempo e espaço (WILKINS et al., 1996). A síntese proteica ocorre pela transcrição do DNA para o RNA mensageiro, sendo este traduzido para proteínas nos ribossomos. Outro processo comum nas células é a degradação dessas proteínas, realizada principalmente por proteases, um grupo funcional de proteínas envolvidas na maquinaria celular (TURK, 2006; JUNG et al., 2009; BHATTACHARYYA et al., 2014).

A proteômica é uma ferramenta importante no estudo do proteoma de um indivíduo, permitindo a análise qualitativa e quantitativa de um grande número de proteínas em diferentes situações fisiológicas. Em estudos proteômicos é possível o monitoramento da expressão proteica de uma célula ou tecido ao longo do tempo, revelando diferentes momentos metabólicos nestes sistemas (WITTMANN-LIEBOLD E GRAACK, 2006; BARROS et al., 2010). Existem diversos métodos para análise proteômica, como: gel 1D (SDS-Page), gel 2D e

espectrometria de massas (QUIRINO et al., 2010). A espectrometria de massas é, atualmente, a principal técnica analítica para a identificação e quantificação de proteínas, especialmente em concentrações muito baixas e em misturas complexas. Com a espectrometria, é possível a detecção, determinação de estruturas e quantificação de proteínas a partir da fragmentação de biomoléculas (BALDWIN, 1995; HOPFGARTNER E VARELIO, 2012).

As duas principais abordagens proteômicas são denominadas de análises 'top-down' e 'bottom-up'. Enquanto a análise top-down estuda proteínas inteiras, a análise bottom-up analisa os peptídeos obtidos através da digestão proteica realizada nas amostras. A abordagem 'bottom-up' ou 'shotgun' é a metodologia mais utilizada para a identificação de proteínas a partir de amostras biológicas. Este método evoluiu ao longo dos anos, permitindo a identificação e quantificação de mais de 10.000 proteínas em uma única análise (MUNTEL et al., 2019). Para a realização do método bottom-up, as proteínas devem primeiramente ser isoladas em tampão contendo agente solubilizante. Para que seja possível a digestão proteica, as ligações dissulfeto são reduzidas e alquiladas, seguidas de fragmentação, comumente realizada por tripsinas (MEYER, 2021).

Para a identificação proteica, é realizada a aquisição de dados espectrais no espectrômetro de massas. A técnica mais recorrente em experimentos bottom-up é a aquisição dependente de dados (DDA), onde os peptídeos mais abundantes são selecionados para fragmentação e identificação (VENABLE et al., 2004; GILLET et al., 2012). Primeiramente, é realizada a coleta de razões massa/carga (m/z) da amostra biológica e a identificação proteica é feita a partir da correlação dos espectros experimentais obtidos na análise com espectros teóricos, sugerindo a presença ou não dos peptídeos em uma amostra biológica (ENG et al., 1994).

Muito embora as abordagens de correlação espectral sejam precisas, elas estão limitadas à identificação de peptídeos com base em sequências genéticas presentes no genoma de referência. O sequenciamento do genoma do *Eucalyptus grandis* abriu várias perspectivas biotecnológicas para o estudo da espécie, por exemplo (MYBURG et al., 2014). No entanto, sabe-se que genomas de organismos eucarióticos são muito mais complexos, sendo modificados e

influenciados por vários eventos moleculares e celulares (BARRETT et al., 2012). Avanços no desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de proteínas têm permitido a análise de vastas quantidades de informação genética, especialmente útil para espécies com genomas totalmente sequenciados, bem como para aquelas em que apenas parte das informações está disponível.

2.4. A proteômica dos tecidos vasculares de plantas

O sistema vascular é essencial para a comunicação e a alocação de recursos ao longo da planta, sendo presente desde as raízes até a parte os tecidos aéreos (SCHEPPER et al., 2013). Basicamente, o sistema vascular em plantas é composto pelo xilema e floema. O xilema tem como principal função o transporte de água da porção radicular até a parte aérea da planta, contendo também várias substâncias que são essenciais para o desenvolvimento do organismo vegetal (BILES e ABELES, 1991). O fluxo de substâncias deste tecido ocorre através da diferença de potencial recorrente à transpiração (TANNER e BEEVERS, 2001), podendo carregar hormônios, aminoácidos, diversos metabólitos e proteínas envolvidas em diversos mecanismos da planta (CARELLA et al., 2016). O floema é um tecido vivo da planta, cuja a função é o transporte dos produtos fotossintéticos das folhas para o restante dos tecidos do organismo. Além disso, o floema é constituído pelos elementos crivados e células parenquimáticas. Enquanto os elementos do tubo crivado não possuem núcleo e possuem poros para a passagem da seiva, as células parenquimáticas são metabolicamente ativas e ricas em ribossomos e mitocôndrias (LUCAS et al., 2013). O perfeito funcionamento do floema depende da interação desses dois tipos de células e o transporte de metabólitos ocorre via plasmodesmos (OPARKA E CRUZ, 2000; VAN BEL, 2003). Desse modo, o floema contém substâncias orgânicas produzidas pela porção aérea da planta, movendo-se através da fonte até as áreas de uso ou armazenamento (SCHEPPER et al., 2013). Ademais, o floema também pode carregar moléculas sinalizadoras de longa distância (órgão a órgão) como a sacarose e diversas proteínas (LOUGH e LUCAS, 2006).

Estudos sobre a comunicação a longa distância podem fornecer informações importantes sobre os metabólitos que atuam nas respostas sistêmicas que permitem com que as plantas respondam rapidamente às mudanças ambientais (EVERT, 1990; RAVEN, 1991; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011; WU e BALDWIN, 2010). Embora o estudo e a compreensão das respostas sistêmicas na seiva das plantas depende muito do método e da espécie utilizada, o interesse na investigação do proteoma de seiva tem aumentado para o entendimento da resposta a estresses abióticos (KASPER et al., 2022), defesa contra patógenos (SOLIMAN et al., 2021) e desenvolvimento das plantas (PATEL et al., 2018). Os processos biológicos que envolvem tais respostas dependem principalmente das proteínas presentes na matriz extracelular. Geralmente, as proteínas que são secretadas para a matriz extracelular, possuem peptídeos sinalizadores N-terminais (DRAKAKAKI e DANDEKAR, 2013). Entretanto, algumas proteínas podem seguir caminhos não convencionais durante a secreção para a matriz extracelular, podendo também serem responsáveis por alguns estímulos nas plantas (AGRAWAL et al., 2010).

3. REFERÊNCIAS

- ABRAF. Anuário Estatístico - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário Estatístico ABRAF, p. 146, 2013.
- ABDELGAWAD, H. et al. Climate extreme effects on the chemical composition of temperate grassland species under ambient and elevated CO₂: a comparison of fructan and non-fructan accumulators. PLoS One, v. 9, n. 3, p. e92044, 2014
- AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; LEBRUN, M.H.; JOB, D.; RAKWAL, R. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. Proteomics, 10, 799–827, 2010.
- 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.
- ALEXI, T.; HUGHES, P. E.; FAULL, R. L. M.; WILLIAMS, C. E. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. Neuroreport, 9, R57-R64, 1998.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARANJUELO, I.; ERICE, G.; SANZ-SÁEZ, A.; ABADIE, C.; GILARD, F.; GIL-QUINTANA, E.; ARAUS, J. L. Differential CO₂ effect on primary carbon metabolism of flag leaves in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant, Cell&Environment, v. 38, p. 2780– 2794, 2015.
- ARCE, G. L. A. F.; CARVALHO JR, J. A.; NASCIMENTO, Luiz Fernando Costa. A time series sequestration and storage model of atmospheric carbon dioxide. Ecologicalmodelling, v. 272, p. 59-67, 2014.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 189, p. 32-51, 1996.

- 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.
- BALDWIN, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. *Natural Product Reports*, v. 12, n. 1, p. 33-44, 1995.
- BARROS, B. H. R. et al. A proteomics approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhiziumacridum*. *Fungal biology*, v. 114, n. 7, p. 572-579, 2010.
- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3613–3634.
- Bhattacharyya, S., Yu, H., Mim, C., and Matouschek, A. (2014) Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action, *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 122-133.
- BHUIYAN, N. H.; SELVARAJ, G.; WEI, Y.; KING, J. Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior*, v. 4, p. 158–159, 2009.
- BILES, C. L.; ABELES, F. B. Xylem Sap Proteins. *Plant Physiol.*, v. 96, p. 597-601, 1991.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 519–546, 2003.
- CARELLA, P.; WILSON, D.C.; KEMPTHORNE, C.J.; CAMERON, R.K. Vascular sap proteomics: Providing insight into long-distance signaling during stress. *Front. Plant Sci*, 7, 651, 2016.
- CAROCHA, V.; HEFER, C.; CASSAN-WANG H.; FEVEREIRO, P.; ALEXANDER, A.; PAIVA, J. A. P.; GRIMA-PETTENATI, J. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.*, v. 4, p. 1297–1313, 2015.

- Castro CA de O, Resende RT, Bhering LL, Cruz CD (2016) Breve histórico do melhoramento genético do eucalipto no Brasil sob a ótica dos avanços biométricos. *Ciencia Rural* 46: 1585–1593.
- COSTA, P. Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas de jatobá de mata *Hymenaeacourbaril* L. *Var. stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenheime (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, Brasil., 2004.
- DRAKAKAKI, G.; DANDEKAR, A. Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.*, 203–204, 74–78, 2013.
- DUSENGE, Mirindi Eric; DUARTE, André Galvao; WAY, Danielle A. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytologist*, v. 221, n. 1, p. 32-49, 2019.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, I.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. Eucalypt domestication and breeding. New York: Oxford University Press, p. 288, 1993.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11: 976-89.
- EASTERLING, D.R.; MEEHL, G.A.; PARMESAN, C.; CHANGNON, S.A.; KARL, T.R.; MEARN, L.O. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science* 289: 2068-2074, 2000.
- EVERT, R. DICOTYLEDONS. IN: BEHNKE, H.D., SJOLUND, R.D. (Eds.), *Sieve Elements*. Springer, p. 103–137, 1990.
- FAO - Food and Agriculture Organization - Global Forest Resources Assessment, 2020. Disponível em: . Acesso em: 20 maio 2022.
- FERNANDEZ-GARCIA, N.; HERNANDEZ, M.; CASADO-VELA, J.; BRU, R.; ELORTZA, F.; HEDDEN, P e OLMOS, E. Changes to the proteome and targeted metabolites of xylem sap in *Brassica oleracea* in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, v. 34, p. 821–836, 2011.

- GIANNI, P.; JAN, K. J.; DOUGLAS, M. J.; STUART, P. M.; TARNOPOLSKY, M. A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp. Gerontol.*, 39, 1391-1400, 2004.
- GILLET, L. C. et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by dataindependent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell Proteom*, v.11, O111.016717, 2012.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2^aed, New York: Clarendon Press, 1989.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. INTECH Open Access Publisher, 2012, p. 169–205.
- HOPFGARTNER, G.; VARESIO, E. The life sciences mass spectrometry research unit. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, v. 66, n. 5, p. 335-338, 2012.
- IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores (2020) Annual Report. Brasília, 66 p.
- IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. Relatório anual IBÁ - 2021, p. 176, 2021.
- IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. Relatório anual IBÁ - 2021, p. 38, 2022.
- IPCC - ClimateChange: 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.
- JIANG, Mingkai et al. The fate of carbon in a mature forest under carbon dioxide enrichment. *Nature*, v. 580, n. 7802, p. 227-231, 2020.
- Jung, T., Catalgol, B., and Grune, T. (2009) The proteasomal system, *Molecular aspects of medicine* 30, 191-296.
- KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- Kasper, K., Abreu, I. N., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Herrfurth, C., 206
Ischebeck, T., Janz, D., ... Polle, A. (2022). Multi-omics analysis of xylem sap
uncovers dynamic modulation of poplar defenses by ammonium and nitrate.
The Plant Journal, 111, 282–303.
- KIMBALL, B. A. Crop responses to elevated CO₂ and interactions with H₂O, N,
and temperature. Current Opinion in Plant Biology, v. 31, p. 36–43, 2016.
- Kolla, V.A., Vavasseur, A. and Raghavendra, A.S.(2007) Hydrogen
peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal
closure in abaxial epidermis of Arabidopsis. Planta, 225, 1421–1429.
- LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ROGERS, A.;
LONG, S. P.; ORT, D. R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and
water relations: six important lessons from FACE. Journal of Experimental
Botany, v. 60, p. 2859– 2876, 2009.
- 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.
- LIU, W.; YU, K.; HE, T.; LI, F.; ZHANG, D.; LIU, J. The low temperature induced
physiological responses of Avena nuda L., a cold-tolerant plant species. The
Scientific World Journal, 2013.
- LOUGH, T. J.; LUCAS, W. J. Integrative plant biology: role of phloem long-
distance macromolecular trafficking. Ann. Rev. Plant Biol., v. 57, p. 203–232,
2006.
- LUCAS, W. J.; GROOVER, A.; LICHTENBERGER, R.; FURUTA, K.; YADAV, S.
R.; HELARIUTTA, Y.; HE, X. Q.; FUKUDA, H.; KANG, J.; BRADY, S. M.;
PATRICK, J. W.; SPERRY, J.; YOSHIDA, A.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.;
GRUSAK, M. A.; KACHROO, P. The plant vascular system: evolution,
development and functions, J. Integr. Plant Biol., 55 (2013) 294-388.

- Marchiori JNC (2014) Primórdios da Silvicultura no Rio Grande do Sul. 1- NOTA SOBRE A INTRODUÇÃO DO GÊNERO EUCALYPTUS L'HER. BALDUINA 30–III: 21–31.
- MENEZES-SILVA, P. E.; LORAM-LOURENÇO, L.; ALVES, R. D. F. B; SOUSA, L. F.; ALMEIDA, S. E. D. S.; FARNESE, F. S. Different ways to die in a changing world: consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. *Ecol Evol*, v. 9, p.11979–11999, 2019.
- MEYER, J. G. Qualitative and Quantitative Shotgun Proteomics Data Analysis from DataDependent Acquisition Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 2259, p. 297–308, 2021.
- MORAES, M. L. T. Variação genética da densidade básica da madeira em progênes de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden e suas relações com as características de crescimento. 1987. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MUNTEL, J.; GANDHI, T.; VERBEKE, L.; BERNHARDT, O. M.; TREIBER, T.; BRUDERER, R.; REITER, L. Surpassing 10 000 identified and quantified proteins in a single run by optimizing current LC-MS instrumentation and data analysis strategy. *Mol Omics*, v.15, p. 348–360, 2019.
- Myburg AA, Grattapaglia D, Tuskan GA, Hellsten U, Hayes RD, Grimwood J, Jenkins J, Lindquist E, Tice H, Bauer D, et al (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510: 356–362.
- NOAA -National Oceanic and Atmospheric Administration - Earth System Research Laboratory, Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, 2022. Disponível em: <<https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>> Acesso em: 10 mai. 2023.
- NORBY, R. J.; DELUCIA, E. H.; GIELEN, B.; CALFAPIETRA, C.; GIARDINA, C. P.; KING, J. S.; LEDFORD, J.; MCCARTHY, H. R.; MOORE, D. J.; CEULEMANS, R.; DE ANGELIS, P.; FINZI, A. C.; KARNOSKY, D. F.; KUBISKE, M. E.; LUKAC, M.; PREGITZER, K. S.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G. E.; SCHLESINGER, W. H.; OREN, R. Forest response to elevated CO₂ is

- conserved across a broad range of productivity. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 120, p.18025–18056, 2005.
- OPARKA, K. J.; CRUZ, S. S. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51 (2000) 323-347.
- Patel, N., Mohd-Radzman, N. A., Corcilius, L., Crossett, B., Connolly, A., Cordwell, S. J., Ivanovici, A., ... Djordjevic, M. A. (2018). Diverse Peptide Hormones Affecting Root Growth Identified in the *Medicago truncatula* Secreted Peptidome. *Molecular & Cellular Proteomics* 17.1, 160–174.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. *Plant Physiology*, v. 127, p. 1513–1523, 2001.
- POORTER, H.; NAVAS, M. L. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist*, v. 157, p. 157-198, 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.
- POTTS, BRADLEY. Genetic improvement of eucalypts. *Encyclopedia of Forest Science*. p.1480-1490, 2004.
- QADERI, M. M.; REID, D. M. Crop responses to elevated carbon dioxide and temperature. In *Climate change and crops* (pp. 1–18). Springer, 2009.
- Quirino, B. F. et al. Proteomics approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry*, v. 71, n. 4, p. 351-362, 2010.
- RAVEN, J.A. Long-term functioning of enucleate sieve elements: possible mechanisms of damage avoidance and damage repair. *Plant Cell Environ*, v. 14, p. 139–146, 1991.
- 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.

- SAMPAIO AN (1961) História. In: ANDRADE, E.N. O Eucalipto. Cia Paulista de Esgradas de Ferro, Sao Paulo, 665 p.
- SCHEPPER, V.; DE SWAEF, T.; BAUWERAERTS, I.; STEPPE, K. Phloem transport: A review of mechanisms and controls. *J. Exp. Bot.*, 64, 4839–4850, 2013.
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Manivannan P, Panneerselvam R, Shao MA (2009) Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. *Critical Reviews in Biotechnology* 29: 131–151.
- Shi, K., Li, X., Zhang, H., Zhang, G., Liu, Y., Zhou, Y., Xia, X., Chen, Z. and Yu, J. (2015) Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂-induced stomatal movement in tomato. *New Phytol.* 208, 342–353.
- SILVEIRA, C. S.; DE OLIVEIRA, L.; TALAMINI, E. Which species perform best in carbon sequestration and storage in planted forests? A review of the potential of Pinus and Eucalyptus. *International Forestry Review*, v. 22, n. 4, p. 544-557, 2020.
- Soliman, A., Rampitsch, C., Tambong, J.T., Daayf, F. (2021). Secretome Analysis of *Clavibacter nebraskensis* Strains Treated with Natural Xylem Sap In Vitro Predicts Involvement of Glycosyl Hydrolases and Proteases in Bacterial Aggressiveness. *Proteomes*, 9, 1.
- SOUZA, A. A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum*ssp. Dissertação (Mestrado). UNICAMP, 2007.
- 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.
- Staudinger MD, Carter SL, Cross MS, Dubois NS, Duffy JE, Enquist C, Griffis R, Hellmann JJ, Lawler JJ, O’Leary J, et al (2013) Biodiversity in a changing

- climate: A synthesis of current and projected trends in the US. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 465–473.
- TANNER, W.; BEEVERS, H. Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 9443–9447, 2001.
- THE PLANT LIST, Version 1.1, 2013. Disponível em: Acesso em: 25 set. 2017.
- Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nature reviews. Drug discovery* 5, 785-799.
- VAN BEL, A. J. R. The phloem, a miracle of ingenuity, *Plant Cell Environ.*, 26 (2003) 125-149.
- VAN HEERDEN, P.; SWANEPOEL, J.; KRÜGER, G. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany*, v. 61, p. 124–136, 2007.
- VENABLE, J. D.; DONG, M. Q.; WOHLSCHEGEL, J.; DILLIN, A.; YATES, J. R. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nat. Methods*, v. 1, p. 39–45, 2004.
- VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. *Revista Do Bndes*, v. 14, n. 28, p. 235–276, 2007.
- WANG, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; WOLLENWEBER, B.; JIANG, D. Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 74, p. 185-192, 2014.
- WATANABE, C. K.; SATO, S.; YANAGISAWA, S.; UESONO, Y.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: Possible relationships with respiratory rates. *Plant and Cell Physiology*, v.185, 2013.
- WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology*, 14, p. 61-65, 1996.

Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*. Sep; 6(17):4688-703, 2006.

WU, J.; BALDWIN I.T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *AnnuRevGenet*, v. 44, p. 1-24, 2010.

ZHANG, D. Y., CHEN, G. Y., GONG, Z. Y., CHEN, J., YONG, Z. H., ZHU, J. G., XU, D. Q. Ribulose-1, 5-bisphosphate regeneration limitation in rice leaf photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Science*, v.175, p. 348–355, 2008.

CAPÍTULO 2 – Proteome profiling of vascular sap regarding *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus camaldulensis*

—

Este capítulo encontra-se publicado na revista Proteomics, publicado em 28/04/2023 e sob o DOI 10.1002/pmic.202200463.

—

Abstract

The plant vascular system is a key element for long-distance communication. Understanding its composition may provide valuable information on how plants grow and develop themselves. In this study, a quantitative proteome dataset of the vascular sap proteome of three commercially important *Eucalyptus* species was shown. Protein extraction was carried out using a pressure bomb, whereas only *in silico* predicted extracellular proteins were considered as part of the sap proteome. A total of 132 different proteins were identified in all the three *Eucalyptus* species and the most abundant proteome subset within all three species was comprised of proteins involved in carbohydrate metabolic process, proteolysis, components of membrane and defense response. The sap proteome of the species *E. grandis* and *E. urophylla* revealed the highest similarities. Functional classification indicated that the sap proteome of *E. grandis* and *E. urophylla* are mostly comprised of proteins involved in defense response and proteolysis; whereas no prominent functional class was observed for the *E. camaldulensis* species. Quantitative comparison highlighted characteristic sap proteins in each of the *Eucalyptus* species. The results that could be found in this

study can be used as a reference for the proteome sap analysis of *Eucalyptus* plants grown under different conditions.

The vascular system is essential for communication and resource allocation throughout the plants^[1]. Sugar, hormones, nutrients and a myriad of signaling metabolites can be long-distance transported in higher plants. Recent studies revealed the existence of a large subset of proteins present in the plant vascular system^[2,3]. Although laborious and strictly dependent on the plant cultivation conditions, interest on the investigation of the sap proteome has been increasing in the last years and mostly are targeted towards understanding the plant responses to abiotic stresses^[4], defense against pathogens^[5] and plant development^[6].

Eucalyptus spp. is one of the main tree species belonging to the Myrtaceae family along with Corymbia and Angophora groups. There are more than 700 species with different physical-chemical properties, but only a small fraction of this number (e.g. *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. dunni* and *E. pellita*) are involved in different industrial applications^[7]. *Eucalyptus* trees have a great commercial importance in Brazil, comprising 78% of the country's total area of planted forest^[8]. Understanding how regulatory and functional mechanisms occur in these organisms may provide details on plant adaptation, increase crop yield and favor the production of paper, pulp, biomaterials and energy^[9].

Although of fundamental importance for the understanding of plant growth and long-distance responses to external stimulus, to our knowledge, no proteome investigation was carried out in the plant sap tissues of *Eucalyptus* species. Here we describe the vascular sap proteome of three commercially important *Eucalyptus* species: *E. grandis*; *E. urophylla* and *E. camaldulensis*.

Currently, different strategies have been suggested in order to obtain the plant sap extracts for downstream analysis. We used a Scholander pressure chamber as a mean to isolate the vascular sap from young *Eucalyptus* plants. Identification of the sap proteins was carried out through a bottom-up, discovery-driven based approach and quantification was estimated through spectral counting. Subcellular localization prediction tools were used in order to estimate efficiency and evaluate our isolation strategy. For that, we initially cultivated the *Eucalyptus* plants under an increasing drought stress condition and verified that the stem water potential was significantly reduced when plants were submitted to severe water depletion (Supporting Information, Figure 1S). Vascular sap extractions were carried out throughout a range of 1.5 until 4 MPa for the model species of *E. grandis* and further validated in the other *Eucalyptus* species studied here. When using *in silico* predictors, it was not observed a significant difference (Pearson's qui-squared test, $p\text{-value}>0.05$) in the proteome sap composition in terms of intracellular contaminants throughout the pressures here evaluated (Supporting Information, Figure 2S) and across the *Eucalyptus* species, especially at a maximum extraction pressure of 4 MPa. It is important to highlight that apoplastic proteins are part of the plant fluid proteome^[10] and here considered as sap proteins as key elements for understanding long-distance signaling.

Sap extractions from all young *Eucalyptus* plants resulted in a total of 132 proteins confidently identified in the vascular sap of *E. grandis*, *E. urophylla* and *E. camaldulensis*. Global protein expression analysis revealed the consistency of our extraction procedure, as replicates formed distinct clusters, and the existence of a common proteome subset comprising 40 protein species constitutively expressed in all replicates from all *Eucalyptus* species (Figure 1).

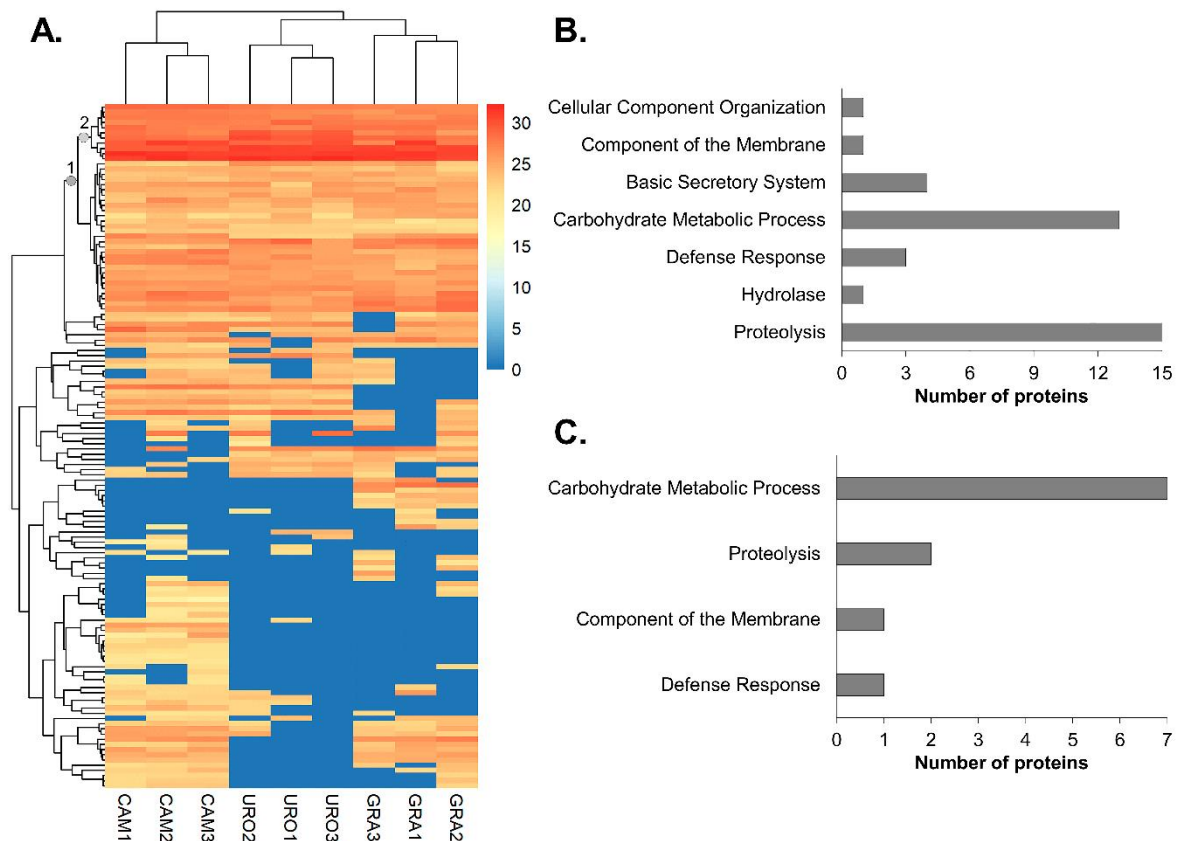


Figure 1. Protein abundance and functional categorization of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis*, and *E. urophylla* sap proteins. **(A)** Hierarchical clustering of the proteins identified in every replicate of the three *Eucalyptus* species. The color scale represents the abundance of each protein and was calculated according to the Log₂LFQ criteria. Numbered nodes (1 and 2) represent the constitutively expressed protein group identified in all replicates across all the three *Eucalyptus* species and the most abundant proteins shared across species, respectively. CAM: *E. camaldulensis*; URO: *E. urophylla*; GRA: *E. grandis*. **(B)** Functional categorization, in terms of biological process, of all the 40 proteins clustered within node 1. **(C)** Functional categorization, in terms of biological process, of all the 11 proteins clustered within node 2.

Functional analysis revealed that this subset of proteins consists of proteins involved in proteolysis, hydrolase, defense response, carbohydrate metabolic process, basic secretory system, component of the membrane, cellular component organization and electron transfer (Figure 1, Table 1S); while the highest protein abundance, within this subset, was observed for the proteins:

Eucgr.A00020, Eucgr.A02178, Eucgr.B03157, Eucgr.B03677, Eucgr.C00805, Eucgr.F04071, Eucgr.G00649, Eucgr.I01600, Eucgr.J03190, Eucgr.K01691, Eucgr.K03041.

High abundant proteins involved in the proteolysis process were already described in the plant sap proteome of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*^[11,12]. The high abundance of such protein types indicates either the existence of degradation processes occurring in the evaluated tissues or the constitutive expression of these proteins as an innate response to a potential pathogen attack^[13]. Other proteins involved in the systemic defense and pathogen response were also already described in the sap proteome of different plant species^[14]. Hydrolases and structural proteins, such as actin (Eucgr.F00489) and the X8 domain-containing protein (Eucgr.B03157), have also been described in the sap proteome of the *Populus trichocarpa* species^[15]. In addition, several proteins here identified as involved in the carbohydrate mechanisms have also been identified in the sap proteome of *Brassica oleracea* and *B. napus*^[16,17]. The high abundance of these proteins may be related to fundamental growth and developmental processes in the cell walls that takes place in xylem tissues^[10].

Vascular sap proteome profile also highlighted the dissimilarities between *E. camaldulensis* extract in relation to *E. grandis* and *E. urophylla* plant materials. While in the *E. grandis* and *E. urophylla* sap proteomes the most representative protein classes were those constituted of defense proteins and of proteins involved in proteolysis and cellular catabolism, whereas no clear prominent functional category was observed in the *E. camaldulensis* sap proteome (Supporting Information, Figure 2S).

The ANOVA and *post hoc* tests of the sap proteome composition between the three *Eucalyptus* species revealed the existence of characteristic proteins (star marked identifications in Table 2S), *i.e.* proteins that were differentially abundant in one species in relation to the others. From the 52 differentially abundant proteins, seven (13,46%) were found to be characteristic of *Eucalyptus camaldulensis*, three (5,70%) of *Eucalyptus grandis* and four (7,69%) of *Eucalyptus urophylla* (Table 1). As mentioned before, the sap proteome of *E. grandis* presented three characteristic proteins: Eucgr.A01732.1, Eucgr.I01176.1 and Eucgr.L01345.1 (Supporting Information, Table 2S). The former corresponds to a homologous Ginkbilobin2 (Gnk2) protein, which is a protein found in the extracellular region of cysteine-rich receptor-like kinases involved in defense response mechanisms^[18]. The Eucgr.I01176.1 is a peroxidase protein mainly involved in the response to oxidative stress. The vascular system in plants may have this machinery of antioxidant components for avoiding damage to essential components^[19]. Therefore, the presence of such peroxidases may indicate response to pathogens and cytotoxic control due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the process of cell signaling in plants^[20]. The latter characteristic protein for *E. grandis* is a laccase 15, an enzyme involved in lignin biosynthesis^[22] and also related to proanthocyanidin (PA) synthesis in plants^[21]. Furthermore, our approach pinpointed four characteristic sap proteins within the *E. urophylla* sap proteome (Supporting Information, Table 2S). The accession Eucgr.A00020.1 is characterized by an endochitinase, mostly involved in response to fungal and various forms of stress^[23], whose constitutive expression may confer a higher protection against fungal attack.

Probably delivering a similar cellular function, a thiol protease aleurain (Eucgr.C00805.1) was characteristically identified within the *E. urophylla* sap proteome (Supporting information, Table 2S). As a pathogen-secreted protease, its presence, in addition to the chitinase identification, suggests the existence of a plant innate immunity in *E. urophylla* plants that is absent or less pronounced in *E. grandis*. An epidermal growth factor-like (EGF) domain protein (Eucgr.K00576.1) was also found to be characteristic of *E. urophylla* sap proteome. This type of proteins is commonly found in the extracellular matrix and are involved in protein-protein interactions^[24] with emphasis in the organism's growth factor and also pathogen responses^[25]. Finally, an extensin-like protein was also up-regulated in *E. urophylla* in pairwise comparisons against both *E. grandis* and *E. camaldulensis*. Although it is well known that extensins play a major role in plant cell wall loosening, the potential role of these proteins as part of the cell wall surveillance system in response to plant attack cannot be excluded, especially due to its position and capacity to transfer information to intracellular components^[26].

An extensive number of sap proteins involved in carbohydrate metabolism were identified as up-regulated in *E. camaldulensis* in relation to both *E. grandis* and *E. urophylla* sap proteins. From the seven characteristic sap proteins, five (accessions Eucgr.B03677.1; Eucgr.F00439.1; Eucgr.F02347.4; Eucgr.K01962.1; Eucgr.L03478.1) were carbohydrate related enzymes. Their identification may indicate a more active carbohydrate metabolism in the apoplast compartment of this *Eucalyptus* species and/or corroborate the existence of an innate immune system in the vascular tissues of this species. On the other hand, the Eucgr.F00206.1 was functionally annotated as involved in the breakdown of

proteins into smaller macromolecules. Despite only one protein involved in proteolysis was up-regulated in relation to the other species, other six proteins differentially abundant in *E. camaldulensis* sap proteome has this same function. This suggests the presence of surveillance immune system in the vascular system of *E. camaldulensis* young plants. Besides that, the presence of a GDSL-type esterase/lipase protein (Eucgr. K03566.1), which plays a role in systemic resistance^[27] and pathogen defense^[28], contributes with this hypothesis. The pronounced number of proteolysis-related identifications in *Eucalyptus* sap proteome deserves a deeper investigation if to be used for tree breeding purposes. The dataset presented here shows that it was possible to study the sap proteome of *Eucalyptus* seedlings and the proteins present in the sap can contribute to studies of long-distance signaling when the plant is under an environmental stimulus.

Table 1. Characteristic proteins identified in the plant sap proteome of *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*.

Access ¹	Species ²	Log ₂ LFQ ³	Description ⁴	Biological Process ⁵
Eucgr.B03677.1	<i>E. camaldulensis</i>	28.653	AbfBdomain-containingprotein	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.F00206.1	<i>E. camaldulensis</i>	25.369	subtilisin-like protease SBT3	proteolysis
Eucgr.F00439.1	<i>E. camaldulensis</i>	24.154	probable rhamno galacturonatelyase B isoform X1	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.F02347.4	<i>E. camaldulensis</i>	24.05	alpha-amylase, putative	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.K01962.1	<i>E. camaldulensis</i>	27.511	rhodanesedomain-containingprotein	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.K03566.1	<i>E. camaldulensis</i>	27.277	GDSL esterase/lipase At1g09390-like	Hydrolase activity, acting on ester bonds
Eucgr.L03478.1	<i>E. camaldulensis</i>	23.558	acidicendochitinase-like	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.A01732.1	<i>E. grandis</i>	27.760	cysteine-rich repeat secretory protein 38	no GO terms
Eucgr.I01176.1	<i>E. grandis</i>	22.691	peroxidase	response to oxidative stress
Eucgr.L01345.1	<i>E. grandis</i>	27.710	laccase-15-like isoform X1	Lignina catabolic process
Eucgr.A00020.1	<i>E. urophylla</i>	29.447	endochitinase EP3	Carbohydrate metabolic process
Eucgr.C00805.1	<i>E. urophylla</i>	29.917	thiol protease aleurain	proteolysis
Eucgr.E00357.1	<i>E. urophylla</i>	24.533	expansin-like B1	Extracellular region
Eucgr.K00576.1	<i>E. urophylla</i>	23.375	EGF-like domain-containingprotein	no GO terms

¹Protein access at the Phytozome database, ²*Eucalyptus* species, ³Mean of Log₂ of LFQ assigned to the protein, ⁴Description assigned by Blast2GO,

⁵Biological process assigned by Blast2GO.

ASSOCIATED DATA

Mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD037915.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work had financial support from São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)) (grant number 2018/15035-8). FARS also received a scholarship from the same foundation (scholarship number 2019/17331-6). TSB received a scholarship from CNPq (304479/2020-9).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Schepper, V., De Swaef, T., Bauweraerts, I., Steppe, K. (2013). Phloem Transport: A Review Of Mechanisms And Controls. *J. Exp. Bot.*, 64, 4839–4850. Doi: 10.1093/jxb/ert302.
- [2] Carella, P., Wilson, D.C., Kempthorne, C.J., Cameron, R.K. (2016). Vascular Sap Proteomics: Providing Insight into Long-Distance Signaling during Stress. *Front Plant Sci.* 7, 651. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00651>
- [3] Liu, Y., Lin, T., Valencia, M.V., Zhang, C., Lv, Z. (2021). Unraveling the Roles of Vascular Proteins Using Proteomics. *Molecules*, 26, 667. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26030667>.

- [4] Kasper, K., Abreu, I. N., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Herrfurth, C., Ischebeck, T., Janz, D., ... Polle, A. (2022). Multi-omics analysis of xylem sap uncovers dynamic modulation of poplar defenses by ammonium and nitrate. *The Plant Journal*, 111, 282–303. Doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.15802>.
- [5] Soliman, A., Rampitsch, C., Tambong, J. T., Daayf, F. (2021). Secretome Analysis of *Clavibacter nebraskensis* Strains Treated with Natural Xylem Sap In Vitro Predicts Involvement of Glycosyl Hydrolases and Proteases in Bacterial Aggressiveness. *Proteomes*, 9, 1. Doi: 10.3390/proteomes9010001.
- [6] Patel, N., Mohd-Radzman, N. A., Corcilius, L., Crossett, B., Connolly, A., Cordwell, S. J., Ivanovici, A., ... Djordjevic, M. A. (2018). Diverse Peptide Hormones Affecting Root Growth Identified in the *Medicago truncatula* Secreted Peptidome. *Molecular & Cellular Proteomics* 17.1, 160–174. Doi: 10.1074/mcp.RA117.000168.
- [7] Stanturf, J. A., Vance, E. D., Fox, T. R., Kirst, M. (2013). *Eucalyptus* beyond Its Native Range: Environmental Issues in Exotic Bioenergy Plantations. *International Journal of Forestry Research*, v. 2013, p. 1–5. Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/463030>.
- [8] IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. (2021). Relatório anual IBÁ - 2021, p.176.
- [9] Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.*, 36, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1402-y>.

- [10] Rodríguez-Celma, J., Ceballos-Laita, L., Grusak, M. A., Abadía, J., López-Millán, A. (2016). Plant fluid proteomics: Delving into the xylem sap, phloem sap and apoplastic fluid proteomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1864, p. 991-1002. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.03.014>.
- [11] Diaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaria, M. E., González-Melendi, P., Martinez, M., Diaz, I. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 3, 329-338. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015.
- [12] Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chinthia, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., Van der Hoorn, R.A. (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *Plant Cell*, 20, 1169-1183. Doi: 10.1105/tpc.107.056325.
- [13] Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A., Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *EMBO J.*, 23, 980-988. Doi: 10.1038/sj.emboj.7600086.
- [14] Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C., Kehr, J. (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species, *Planta*, v. 219, p. 610-618. Doi: doi: 10.1007/s00425-004-1259-9.
- [15] Dafoe, N.J., Zamani, A., Ekramoddoullah, A.K., Lippert, D., Bohlmann, J., Constabel, C.P. (2009). Analysis of the poplar phloem proteome and its response to leaf wounding. *J. Proteome Res.*, 8, 2341-2350. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr800968r>.

- [16] Ligat, L., Lauber, E., Albenne, C., San Clemente, H., Valot, B., Zivy, M., Pont-Lezica, R., Arlat, M., Jamet, E. (2011). Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins. *Proteomics*, 11, 1798-1813. Doi: 10.1002/pmic.201000781.
- [17] Leonard, M., Kühn, A., Harting, R., Maurus, I., Nagel, A., Starke, J., Kusch, H., ... Braus, G. H. (2020). *Verticillium longisporum* elicits media-dependent secretome responses with capacity to distinguish between plant-related environments. *Front. Microbiol.* 11:1876. Doi: 10.3389/fmicb.2020.01876.
- [18] Miyakawa, T., Hatano, K., Miyauchi, Y., Suwa, Y., Sawano, Y., Tanokura, M. (2014) A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiology*, 166, 766-778. Doi: 10.1104/pp.114.242636.
- [19] Walz, C., Juenger, M., Schad, M., Kehr, J. (2002). Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *The Plant Journal*, 31, 189-197. Doi:10.1046/j.1365313x.2002.01348.x.
- [20] Franco, J. Y.; et al. (2020). Citrus vascular proteomics highlights the role of peroxidases and serine proteases during Huanglongbing disease progression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(12), 1936-1952. Doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002075>.
- [21] Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 17: 2966–2980. Doi: 10.1105/tpc.105.035154.

- [22] Liang, M., Davis, E., Gardner, D., Cai, X., Wu, Y. (2006). Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of Arabidopsis. *Planta*, 224(5), 1185-96. Doi: 10.1007/s00425-006-0300-6.
- [23] Zhang, S., Klessig, D. F.(2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.*, 6, 520–527.
- [24] Drain, A. P., & Weaver, V. M. (2020). Matrix molecules and their ligands. In *Principles of Tissue Engineering*, pp. 119-132, Academic Press. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00008-3>.
- [25] Hidai, C. (2018). EGF-like domains with a CxDx (4)-YxC motif. *Open Access J Trans Med Res*, 2(2), 67-71. Doi: 10.15406/oajtmr.2018.02.00039.
- [26] Narváez-Barragán, D.A., Tovar-Herrera, O.E., Guevara-García, A., Serrano, M., Martinez-Anaya, C. (2022). Mechanisms of plant cell wall surveillance in response to pathogens, cell wall-derived ligands and the effect of expansins to infection resistance or susceptibility. *Front Plant Sci.*, 13:969343. Doi: 10.3389/fpls.
- [27] Kwon, S.J., Jin, H.C., Lee, S., Nam, M.H., Chung, J.H., Kwon, S.I., Ryu, C.M., Park, O.K. (2009). GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant J.*, 58(2), 235-45. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03772.x.
- [28] Su, H.G., Zhang, X.H., Wang, T.T., Wei, W.L., Wang, Y.X., Chen, J., Zhou, Y.B., ... Min, D.H. (2020). Genome-wide identification, evolution, and expression of GDSL-type esterase/lipase gene family in soybean. *Front Plant Sci.*, 25, 11:726. Doi: 10.3389/fpls.2020.00726.

Supporting Information

Materials and Methods

Plant material and vascular sap sampling

Seeds of *E. camaldulensis*, *E. grandis* and *E. urophylla* were sowed on commercial substrate and cultivated in green chambers for 120 days under controlled conditions. Prior to the sap proteome isolation, plants were exposed to drought conditions by decreasing the irrigation frequency in order to estimate the maximum pressure to be used for the extraction of the sap samples. For that, the stem water potential was estimated in three different conditions as following: A. Continuous irrigation; B. Irrigation every other day; C. One day of irrigation followed by three days without irrigation. For each treatment, five replicates (one plant per replicate) were used and the assay had duration of 15 days. The results were submitted for Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test at 95% confidence level ($p < 0.05$) (Figure 1S). Once the minimum water potential was determined, the vascular sap of the young eucalyptus plants was extracted using a Scholander pressure chamber^[1] at a maximum of 4.0 MPa for 15 min. Freshly extracted sap (approximately 1 mL per plant) was transferred directly to clean eppendorf tubes placed on ice. For the sap proteome profiling and characterization, three biological replicates were used, from which each replicate consisted of three plants.

Proteome isolation

Extracted sap samples were transferred to 50 mL Falcon tubes and a total volume of 10 mL of Tris-HCl buffer (125 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 1% DTT and 20% glycerol) was added to each tube. After 10 minutes of shaking at 4 °C, a 5x volume of cold acetone was added to each tube. Protein precipitation was carried out for 16h at 4 °C and protein pellet was obtained by ultracentrifugation (3200 *g*, at 4°C, for 10 min). Finally, proteins were resuspended with the Tris-HCl buffer, followed by protein quantification using the Qubit fluorometer equipment (Thermo Fisher Scientific). An aliquot of 50 µg for each sample was used for tryptic *in solution* digestion.

Mass spectrometry (MS) analysis

Prior to MS analysis, proteins were precipitated in methanol, resuspended in 25 mM ammonium bicarbonate and heated at 70°C for 10 min. Proteins were then reduced with dithiothreitol at 56°C for 20 min and alkylated with iodoacetamide at room temperature for 20 min. Digestion was performed with trypsin (Trypsin Gold, Promega) at a ratio of 1:10, for 16h at 37°C. After tryptic digestion, samples were concentrated and desalted using ZipTip (Merck-Millipore) followed by quantification by fluorometry. Tryptic peptides were resuspended in 0.1% formic acid solution and 500 ng was used for separation on an EASYnLC-1000 chromatographic system (Thermo Fisher Scientific) for 95 min using a C18 nanocolumn under constant flow and increasing concentration of acetonitrile (7 to 30 % for 70 min and constant at 70% for 25 min). The MS analyzes were performed using a Q-Exactive instrument operated in positive ion mode. Spectra acquisition was carried out in data-dependent mode with cycles consisting of one full scan at 70,000 FWHM (Full Width at Half Maximum) followed by twenty data-dependent scans at 35,000 FWHM at a maximum injection time of 100ms. The fragmentation of the peptides was obtained from the fragmentation in the HCD (high energy collision dissociation) using collision energy equal to 35 eV. Individually charged ions were excluded from fragmentation events and peptide ions selected for fragmentation were dynamically excluded for 5s.

Protein identification and bioinformatics

Protein identification was carried out using the MaxQuant software [v. 1.6.3.3]^[2] through spectral correlations between experimental data and predicted data obtained from the Eucalyptus v.2.0 protein database available on the Phytozome platform (www.phytozome.net). Parameters used in the searches were adjusted to 20 ppm for precursor ions, oxidation of methionine as variable modification and carbamidomethylation of cysteines as static modification, maximum of two missed cleavages and a False Discovery Rate (FDR) targeted to 1%. The Label-Free Quantification (LFQ) method was used for the relative quantification of the identified proteins. The number of protein sequences for each cell compartment and the abundance values (LFQ) was used for data processing. The relative quantification data

were transformed into $\log_2$ and the lowest LFQ value observed during the entire experiment was used for missing values. The abundance of peptides was calculated through the maximum intensity of the precursor ion used in the identification, normalized by the sum of the other identifications within the same repetition. To determine the sap proteins and estimate the contamination rate between species, the identified protein sequences were submitted to cell localization prediction tools. For that, the protein sequences were *in silico* analyzed using the TargetP 2.0 program^[3] aiming at the identification of Signal Peptides (SP) characteristic of plastids and extracellular matrix. Subsequently, the DeepLoc 1.0 program was used to assign other cell locations^[4]. In order to verify possible differences in the contamination rate between the species, Pearson's chi-square test was used at 95% confidence level ($p < 0.05$). The functional annotation of the identified proteins was performed using the Blast2GO program^[5] using a minimum of 5 sequences assigned to a function with the maximum threshold and the Viridiplantae group as a taxonomic filter. The determination of differentially abundant proteins was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc tests.

References

- [1] Scholander, P. F., Hammel, H. T., Hemmingsen, E. A., Bradstreet, E. D. (1964) Hydrostatic Pressure and Osmotic Potential in Leaves of Mangroves and Some Other Plants. PNAS, v. 52, p. 119-125. Doi: 10.1073/pnas.52.1.119.
- [2] Tyanova, S., Temu, T., Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat Protoc., v.12, p. 2301-2319. Doi: 10.1038/nprot.2016.136.
- [3] Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Heijne, G. V., Elofsson, A., Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. Life Science Alliance, vol 2 (5), p. 1-14. Doi: 10.26508/lsa.201900429.
- [4] Armenteros, J. J. A., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. Bioinformatics, v. 33, p. 3387–3395. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.
- [5] Götz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J.; Robles, ... Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleicacidsresearch, 36(10), 3420-35. Doi: 10.1093/nar/gkn176.

Supplementary Figures and Tables

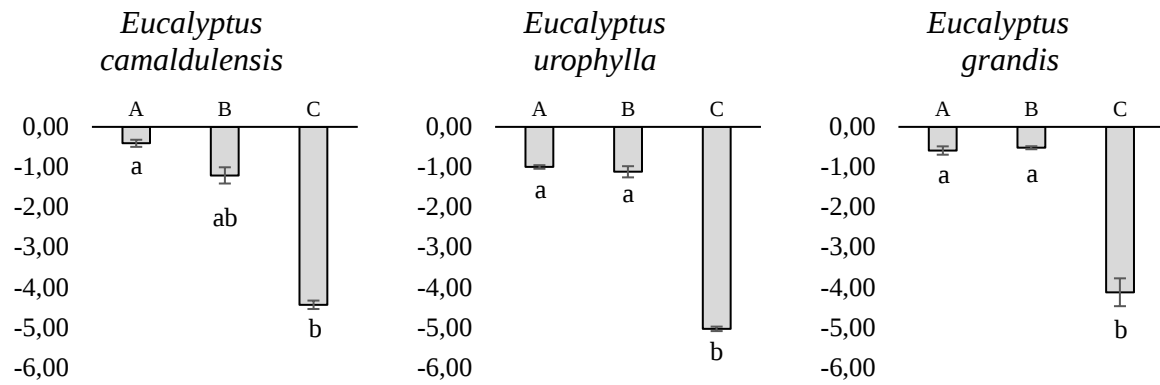


Figure 1S. Stem water potential (ψ_w) of young *Eucalyptus* seedlings submitted to three treatments of water deficit for 15 days. (A) Irrigation every day; (B) Irrigation every other day and (C) One day of irrigation followed by two days without irrigation. Irrigation was made up to the field capacity of the pot and plants were kept in a greenhouse under controlled temperature and humidity conditions. Different lowercase letters show a significant difference between treatments according to the Tukey's test at 5% probability ($p < 0.05$).

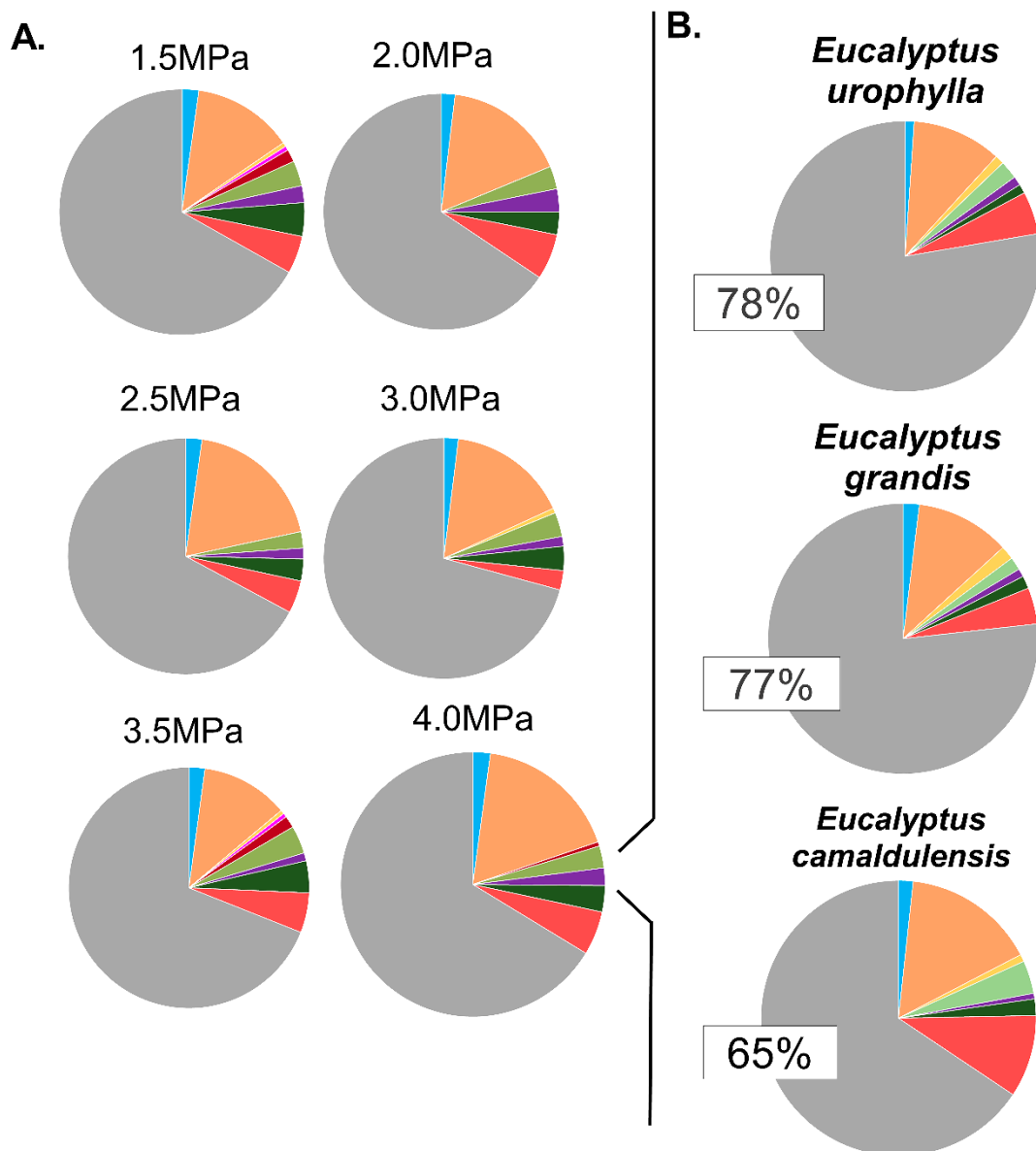


Figure 2S. Percentage distribution, in terms of subcellular localization, of the proteins isolated from the sap of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis*, and *E. urophylla*. (A) Intracellular (colorful slices) and extracellular proteins (gray slice) distribution for each evaluated pressure used for sap extraction and isolation in *E. grandis*. (B) Intracellular and extracellular distribution in *E. camaldulensis*, *E. grandis*, and *E. urophylla* at 4 MPa pressure used for sap extractions. The Pearson's chi-square test was performed between species to determine differences in the contamination ratio (extracellular/intracellular), p -value = 0.06289 ($p < 0.05$).

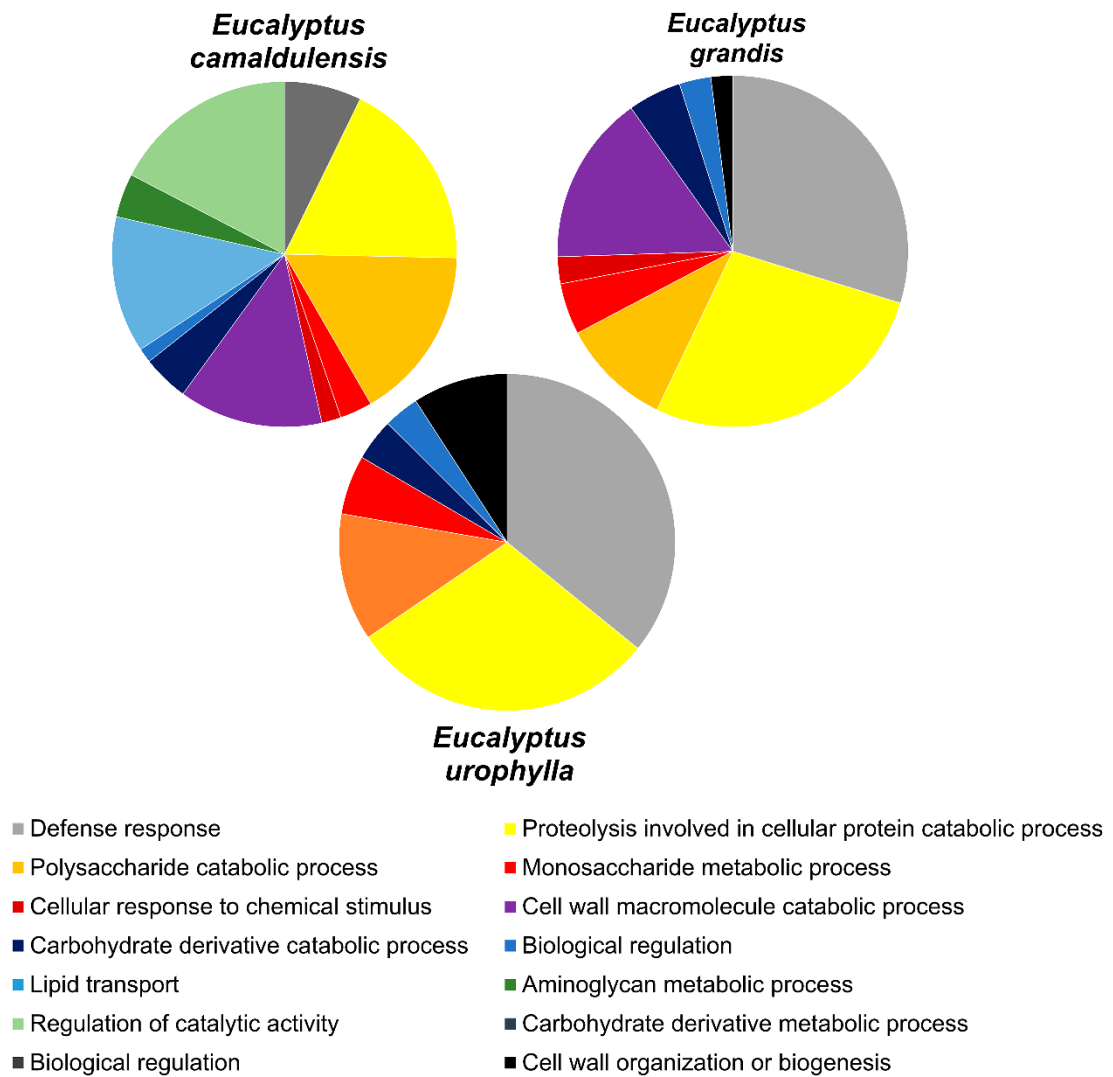


Figure 3S. Functional categorization of the proteins identified in the sap proteome of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* and *E. urophylla* according to the biological process Gene Ontology (GO) terms.

Table1S. Constitutively expressed proteins identified in all replicates across all the three *Eucalyptus* species as shown in Figure 1.

Accession¹	Counts²	Mol. weight³	Score⁴	Biological Process⁵
Eucgr.A00020	474	29.383	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.A01013	173	54.693	221.28	secretory system
Eucgr.A01732	659	26.552	323.31	secretory system
Eucgr.A02178	1319	74.292	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.B00045	234	19.487	110.72	electron transfer
Eucgr.B03157	121	20.18	58.157	Integral comp of the membrane
Eucgr.B03677	681	95.876	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.B03914	195	50.103	323.31	proteolysis
Eucgr.C00803	107	39.412	36.972	proteolysis
Eucgr.C00805	421	37.18	316.59	proteolysis
Eucgr.C04251	59	15.873	286.05	electron transfer
Eucgr.D00517	168	35.475	64.287	proteolysis
Eucgr.D01821	352	52.751	200.58	carbohydrate metabolic process
Eucgr.E00091	131	30.877	126.54	carbohydrate metabolic process
Eucgr.E00105	147	51.758	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.E00557	171	21.413	323.31	defense response
Eucgr.E00560	205	25.394	323.31	defense response
Eucgr.F00121	892	80.307	323.31	proteolysis
Eucgr.F00208	108	82.073	78.392	proteolysis
Eucgr.F00439	59	78.683	89.177	carbohydrate metabolic process
Eucgr.F00489	374	50.342	323.31	cellular component organization
Eucgr.F01673	141	81.238	323.31	proteolysis
Eucgr.F02310	45	51.945	68.438	proteolysis

Eucgr.F04071	404	57.002	312	proteolysis
Eucgr.G00649	1402	84.3	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.G01335	150	25.188	274.44	proteolysis
Eucgr.G01336	99	25.37	110.71	secretory system
Eucgr.G01559	90	49.863	96.812	proteolysis
Eucgr.H02279	675	79.742	323.31	proteolysis
Eucgr.H02477	197	71.654	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.I01600	791	114.46	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.J00403	132	55.487	266.26	proteolysis
Eucgr.J00936	172	92.031	202.06	carbohydrate metabolic process
Eucgr.J03190	642	50.462	323.31	proteolysis
Eucgr.K01691	336	75.241	323.31	carbohydrate metabolic process
Eucgr.K02100	79	29.529	124.97	secretory system
Eucgr.K02430	45	26.694	39.408	carbohydrate metabolic process
Eucgr.K03041	71	11.695	179.1	defense response
Eucgr.K03566	123	40.807	183.57	hydrolase
Eucgr.L00918	67	37.515	27.658	proteolysis

¹Protein access at the Phytozome database, ²Number of spectral counts, ³Molecular weight of the protein, ⁴Score attributed to the protein according to MaxQuant searches, ⁵Biological process assigned by Blast2GO software.

Table 2S. Differentially abundant proteins in *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*.

Access ¹	Log2LFQ ²	Description ³	Biological Process ⁴	EC	EG	EU
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>						
Eucgr.A00785.1	22.142	probable inactive receptor kinase At5g58300	protein phosphorylation	a	ab	b
Eucgr.B03677.1*	28.653	AbfBdomain-containingprotein	carbohydrate metabolic process	a	b	b
Eucgr.B03913.1	25.467	Serine carboxypeptidase-like 51	proteolysis	a	ab	b
Eucgr.C01794.2	22.962	EG45-like domain containing protein	no GO terms	a	b	a
Eucgr.C04395.2	24.892	heparanase-like protein 3	hydrolase activity, on glycosyl bonds	a	a	b
Eucgr.E01392.1	24.183	thaumatin-like protein 1	no GO terms	a	b	a
Eucgr.E04312.2	23.590	polygalacturonase QRT3	polygalacturonase activity	a	b	ab
Eucgr.F00206.1*	25.369	subtilisin-like protease SBT3	proteolysis	a	b	b
Eucgr.F00439.1*	24.154	Probable rhamnogalacturonatelyase B iso X1	carbohydrate metabolic process	a	b	b
Eucgr.F02347.4*	24.050	alpha-amylase, putative	carbohydrate metabolic process	a	b	b
Eucgr.F04071.1	27.655	protein kinase domain-containing protein	no GO terms	a	b	ab
Eucgr.G00445.1	27.097	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7	carbohydrate metabolic process	a	b	a
Eucgr.G01336.1	26.941	pathogenesis-relatedprotein 17	no GO terms	a	b	ab
Eucgr.H00326.1	24.682	endochitinase EP3-like	carbohydrate metabolic process	a	a	b
Eucgr.H00669.5	23.889	alpha-galactosidase-like	carbohydrate metabolic process	a	b	a
Eucgr.H00716.7	25.903	Serine carboxypeptidase-like 20	proteolysis	a	a	b
Eucgr.H02279.1	27.370	subtilisin-like protease SBT1.7	proteolysis	a	a	b
Eucgr.H02477.1	26.549	probable alpha-galactosidase B	carbohydrate metabolic process	a	a	b
Eucgr.H04079.1	27.908	Serine carboxypeptidase-like 33	proteolysis	a	b	a
Eucgr.J00381.1	23.769	Serine carboxypeptidase-like	proteolysis	a	a	b
Eucgr.J00936.1	26.699	beta-galactosidase	carbohydrate metabolic process	a	b	ab
Eucgr.K01300.1	22.616	Transmembrane protein, putative	no GO terms	a	b	ab
Eucgr.K01917.2	22.030	Putative phosphatidylglycerol	intracellular sterol transport	a	ab	b
Eucgr.K01962.1	27.511	rhodanesedomain-containingprotein	carbohydrate metabolic process	a	b	b
Eucgr.K03566.1*	27.277	GDSL esterase/lipase At1g09390-like	hydrolase activity, acting on ester bonds	a	b	b

Eucgr.L03478.1*	23.558	Acidic endochitinase-like	carbohydrate metabolic process	a	b	b
<i>Eucalyptus grandis</i>						
Eucgr.A01871.1	21.997	FAS1 domain-containing protein	plant-type secondary cell wall biogenesis	b	a	ab
Eucgr.A02551.4	21.009	fasciclin-like arabinogalactan protein 17	no GO terms	b	a	a
Eucgr.A01732.1*	27.760	cysteine-rich repeat secretory protein 38	no GO terms	b	a	b
Eucgr.B00045.1	25.333	blue copper protein	electron transfer activity	ab	a	b
Eucgr.C00803.1	24.638	thiol protease aleurain-like	proteolysis	ab	a	b
Eucgr.C04028.1	24.389	aspartyl protease family protein At5g10770-like	proteolysis	ab	a	b
Eucgr.C04395.2	24.142	heparanase-like protein 3	hydrolase activity, on glycosyl bonds	a	a	b
Eucgr.D00496.1	23.834	senescence-specific cysteine protease SAG12	proteolysis	b	a	a
Eucgr.E00091.1	26.942	acidic endochitinase-like	carbohydrate metabolic process	b	a	a
Eucgr.E01385.1	21.111	thaumatin-like protein 1b	defense response	b	a	ab
Eucgr.F00022.1	23.095	carboxypeptidase	proteolysis	b	a	ab
Eucgr.H00326.1	24.990	endochitinase EP3-like	carbohydrate metabolic process	a	a	b
Eucgr.H00716.7	26.632	serine carboxypeptidase-like 20	proteolysis	a	a	b
Eucgr.H00739.1	23.228	auxin-induced in root cultures protein 12-like	GO terms	b	a	ab
Eucgr.H02279.1	27.129	subtilisin-like protease SBT1.7	proteolysis	a	a	b
Eucgr.H02477.1	25.679	probable alpha-galactosidase B	carbohydrate metabolic process	a	a	b
Eucgr.I01176.1*	22.691	peroxidase	response to oxidative stress	b	a	b
Eucgr.J00381.1	24.576	serine carboxypeptidase-like	proteolysis	a	a	b
Eucgr.J02106.1	23.865	chitinase 2-like	carbohydrate metabolic process	b	a	a
Eucgr.J03190.1	30.564	vacuolar processing enzyme	proteolysis	b	a	a
Eucgr.L00941.1	20.767	no GO terms	no GO terms	b	a	a
Eucgr.L01345.1*	27.710	laccase-15-like isoform X1	lignin catabolic process	b	a	b
<i>Eucalyptus urophylla</i>						
Eucgr.A00020.1*	29.447	endochitinase EP3	carbohydrate metabolic process	b	b	a
Eucgr.A02551.4	20.897	fasciclin-like arabinogalactan protein 17	no GO terms	b	a	a
Eucgr.C00805.1*	29.917	thiol protease aleurain	proteolysis	b	b	a

Eucgr.C01794.2	23.104	EG45-like domain containing protein	no GO terms	a	b	a
Eucgr.D00496.1	23.051	senescence-specific cysteine protease SAG12	proteolysis	b	a	a
Eucgr.D01821.1	26.571	polygalacturonase	carbohydrate metabolic process	ab	b	a
Eucgr.E00091.1	25.967	acidicendochitinase-like	carbohydrate metabolic process	b	a	a
Eucgr.E00357.1*	24.533	expansin-like B1	extracellular region	b	b	a
Eucgr.E01392.1	23.317	thaumatin-like protein 1	no GO terms	a	b	a
Eucgr.G00445.1	27.239	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7	carbohydrate metabolic process	a	b	a
Eucgr.H00669.5	23.379	alpha-galactosidase-like	carbohydrate metabolic process	a	b	a
Eucgr.H04079.1	26.561	serinecarboxypeptidase-like 33	proteolysis	a	b	a
Eucgr.H05072.1	24.850	aspartic proteinase nepenthesin-1	proteolysis	b	ab	a
Eucgr.J02106.1	23.305	chitinase 2-like	carbohydrate metabolic process	b	a	a
Eucgr.J03190.1	30.726	vacuolar-processingenzyme	proteolysis	b	a	a
Eucgr.K00576.1*	23.375	EGF-like domain-containing protein	no GO terms	b	b	a
Eucgr.K02430.1	24.731	probablepectinesterase 15	cell wall modification	b	ab	a
Eucgr.L00918.1	25.996	hypotheticalprotein EUGRSUZ_L00918	proteolysis	b	ab	a
Eucgr.L00941.1	21.135	no GO terms	no GO terms	b	a	a

¹Protein access at the Phytozome database, ²Log2 of LFQ assigned to the protein, ³Description assigned by Blast2GO, ⁴Biological process assigned by Blast2GO, EC: Tukey's test assigned for *Eucalyptus camaldulensis*, EG: Tukey's test assigned for *Eucalyptus grandis*, EU: Tukey's test assigned for *Eucalyptus urophylla*. *Characteristic proteins, i.e. proteins identified as differentially abundant in one species in relation to all other species.

Table 3S. Subcellular localization of the proteins identified in the sap tissues of *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*.

Accession ¹	Subcellular localization ²	DeepLoc ³	TargetP ⁴	Species ⁵	Description ⁶
Eucgr.A00020.1	Extracellular	0.481	0.999	EC; EG; EU	homolog of carrot EP3-3 chitinase
Eucgr.A00159.1	Cytoplasm	0.681	0.009	EC; EG	MLP-like protein 423
Eucgr.A00746.1	Extracellular	0.999	0.999	EC; EU	lipid transfer protein 1
Eucgr.A00780.1	Extracellular	0.271	0.996	EC; EG; EU	Glycosyl hydrolase superfamily protein
Eucgr.A00785.1	Extracellular	0.0	0.999	EC	leucine-rich repeat protein kinase family protein
Eucgr.A01013.2	Extracellular	0.616	0.982	EC; EG; EU	-
Eucgr.A01073.1	Cytoplasm	0.528	0.000	EC	-
Eucgr.A01074.1	Cellmembrane	0.412	0.000	EC; EG; EU	FASCICLIN-like arabinogalactan 7
Eucgr.A01166.1	ER	0.709	0.373	EC; EG	peroxidase super Family protein
Eucgr.A01538.2	Cytoplasm	0.449	0.000	EC	aldolase super Family protein
Eucgr.A01727.1	Extracellular	0.487	0.999	EC; EG; EU	receptor-like protein kinase-related family protein
Eucgr.A01732.1	Extracellular	0.912	0.999	EC; EG; EU	receptor-like protein kinase-related family protein
Eucgr.A01871.1	Extracellular	0.000	0.999	EC; EG	FASCICLIN-like arabinogalactan 9
Eucgr.A02084.1	Extracellular	0.131	0.999	EC; EU	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
Eucgr.A02178.1	Extracellular	0.449	0.999	EC; EG; EU	alpha-L-arabinofuranosidase 1
Eucgr.A02551.4	Extracellular	0.457	0.993	EC	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 17 precursor
Eucgr.A02862.1	Extracellular	0.521	0.196	EC; EG; EU	alpha-L-fucosidase 1
Eucgr.B00045.1	Extracellular	0.144	0.999	EC; EG; EU	cupredoxin super Family protein
Eucgr.B00144.4	Cytoplasm	0.828	0.003	EC	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
Eucgr.B01350.1	Extracellular	0.331	0.998	EC	germin-like protein subfamily 2 member 2 precursor
Eucgr.B01760.1	Plastid	0.393	0.261	EC; EU	copper/zinc superoxide dismutase 1
Eucgr.B02370.1	Extracellular	0.002	0.924	EC; EG; EU	fasciclin-like arabinogalactan family protein
Eucgr.B02633.1	Extracellular	0.994	0.999	EC; EG; EU	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.B02878.1	Mitochondrion	0.994	0.000	EC	ATP synthase alpha/beta family protein
Eucgr.B03013.1	Plastid	0.996	0.000	EC; EG	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein
Eucgr.B03157.1	Extracellular	0.036	0.999	EC; EG; EU	Plasmodesmata callose-bindingprotein 3

Eucgr.B03675.1	Cytoplasm	0.388	0.004	EC	putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
Eucgr.B03677.1	Extracellular	0.904	0.999	EC; EG; EU	putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
Eucgr.B03788.1	Extracellular	0.341	0.999	EG	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.B03913.1	Extracellular	0.702	0.998	EC; EG; EU	serine carboxypeptidase-like 51
Eucgr.B03914.1	Extracellular	0.021	0.892	EC; EG; EU	serine carboxypeptidase-like 51
Eucgr.B03930.6	Plastid	0.999	0.000	EC; EG	copper/zincsuperoxide dismutase 2
Eucgr.C00760.1	Extracellular	0.883	0.996	EG; EU	plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
Eucgr.C00803.1	Extracellular	0.132	0.999	EC; EG; EU	aleurain-like protease
Eucgr.C00805.1	Extracellular	0.320	0.999	EC; EG; EU	aleurain-like protease
Eucgr.C00898.1	Extracellular	0.356	0.988	EC	beta galactosidase 1
Eucgr.C01445.1	Extracellular	0.966	0.999	EC	blue-copper-bindingprotein
Eucgr.C01794.2	Extracellular	0.876	0.999	EC; EU	plant natriureticpeptide A
Eucgr.C02910.1	Extracellular	0.613	0.996	EG	phosphorylase super Family protein
Eucgr.C03525.1	Cytoplasm	0.467	0.000	EC; EG	ribulose-bisphosphatecarboxylases
Eucgr.C04028.1	Extracellular	0.537	0.990	EC; EG	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.C04251.1	Extracellular	0.004	0.999	EC; EG; EU	blue-copper-bindingprotein
Eucgr.C04395.2	Extracellular	0.063	0.999	EC; EG	glucuronidase 3
Eucgr.D00084.1	Peroxisome	0.406	0.000	EC; EG	FAD-binding Berberine family protein
Eucgr.D00088.1	Extracellular	0.540	0.999	EC; EG	FAD-binding Berberine family protein
Eucgr.D00319.1	Plastid	0.985	0.000	EC	chlorophyll A/B binding protein 1
Eucgr.D00484.1	Extracellular	0.999	0.992	EG	xylembarkcysteine peptidase 3
Eucgr.D00495.1	Cytoplasm	0.515	0.001	EG	senescence-associated gene 12
Eucgr.D00496.1	Extracellular	0.374	0.996	EG; EU	senescence-associated gene 12
Eucgr.D00500.2	Extracellular	0.294	0.996	EC; EG; EU	senescence-associated gene 12
Eucgr.D00506.1	Extracellular	0.258	0.988	EC; EG	senescence-associated gene 12
Eucgr.D00515.1	Extracellular	0.575	0.998	EC; EU	cysteine proteinases super Family protein
Eucgr.D00517.1	Extracellular	0.634	0.003	EC; EG; EU	senescence-associated gene 12
Eucgr.D00703.2	Extracellular	0.941	0.853	EC; EG; EU	beta-galactosidase 8
Eucgr.D01220.2	Cytoplasm	0.418	0.000	EC; EG	nucleoside diphosphate kinase family protein
Eucgr.D01351.1	Extracellular	0.382	0.999	EC; EG; EU	aspartic proteinase A1

Eucgr.D01413.6	Cytoplasm	0.435	0.008	EC; EU	-
Eucgr.D01622.1	Extracellular	0.381	0.999	EC; EG; EU	FAD-binding Berberine family protein
Eucgr.D01821.1	Extracellular	0.549	0.928	EC; EG; EU	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.D01904.1	Extracellular	0.977	1.000	EC	osmotin 34
Eucgr.D02072.1	Cytoplasm	0.416	0.001	EC; EG; EU	subtilase family protein
Eucgr.D02467.1	Plastid	0.999	0.000	EC; EG	transketolase
Eucgr.E00091.1	Extracellular	0.814	0.999	EC; EG; EU	chitinase A
Eucgr.E00105.1	Extracellular	0.82	0.999	EC; EG; EU	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.E00336.4	Cytoplasm	0.619	0.000	EC; EG	nmrA-like negative transcriptional regulator family protein
Eucgr.E00357.1	Extracellular	0.882	0.999	EC; EG; EU	expansin-like B1
Eucgr.E00360.1	Extracellular	0.774	0.999	EC; EG; EU	expansin-like B1
Eucgr.E00466.3	CellMembrane	0.395	0.002	EG	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.E00557.1	Extracellular	0.952	0.999	EC; EG; EU	osmotin 34
Eucgr.E00560.1	Extracellular	0.788	0.994	EC; EG; EU	osmotin 34
Eucgr.E00812.1	Extracellular	0.403	0.999	EC	disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
Eucgr.E00814.1	Extracellular	0.333	0.999	EC	disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
Eucgr.E00853.1	Extracellular	0.876	0.999	EC; EG	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.E01074.1	Cytoplasm	0.456	0.003	EC; EG; EU	subtilase family protein
Eucgr.E01385.1	Extracellular	0.974	0.957	EG; EU	pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
Eucgr.E01389.1	Extracellular	0.976	0.999	EC; EG	pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
Eucgr.E01392.1	Extracellular	0.988	0.999	EC; EU	pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
Eucgr.E02381.1	Plastid	0.996	0.000	EC	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1
Eucgr.E02853.1	Cytoplasm	0.685	0.000	EC	RNA ligase/cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein
Eucgr.E03919.1	Extracellular	0.922	0.999	EC; EG; EU	cystatin/monellin super family protein
Eucgr.E03920.1	Mitochondrion	0.467	0.011	EC; EU	cystatin/monellin super family protein
Eucgr.E04312.2	Extracellular	0.359	0.875	EC; EG; EU	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.F00022.1	Extracellular	0.956	0.999	EG	serinecarboxypeptidase-like 40
Eucgr.F00108.3	Cytoplasm	0.691	0.000	EC; EG; EU	glycosyl hydrolase family 10 protein / carbohydrate-binding domain-containing protein
Eucgr.F00121.1	Extracellular	0.996	0.999	EC; EG; EU	subtilase family protein
Eucgr.F00206.1	Extracellular	0.955	0.999	EC	subtilisin-like serine endopeptidase family protein

Eucgr.F00208.1	Extracellular	0.822	0.951	EC; EG; EU	subtilisin-like serine endopeptidase family protein
Eucgr.F00438.1	Cytoplasm	0.539	0.000	EC; EG; EU	rhamnogalacturonatelyase family protein
Eucgr.F00439.1	Extracellular	0.619	0.970	EC; EG; EU	rhamnogalacturonatelyase family protein
Eucgr.F00441.1	Cytoplasm	0.646	0.000	EC; EG; EU	rhamnogalacturonatelyase family protein
Eucgr.F00489.1	Extracellular	0.353	0.996	EC; EG; EU	-
Eucgr.F00489.3	Cytoplasm	0.320	0.011	EC; EG; EU	-
Eucgr.F01476.1	Plastid	0.997	0.000	EC; EG; EU	phosphoglyceratekinase family protein
Eucgr.F01673.1	Extracellular	0.988	0.998	EC; EG; EU	subtilisin-like serine endopeptidase family protein
Eucgr.F02205.1	Mitochondrion	0.707	0.000	EC; EG; EU	glycosyl hydrolase family 10 protein / carbohydrate-binding domain-containing protein
Eucgr.F02310.1	Extracellular	0.902	0.989	EC; EG; EU	granulin repeat cysteine protease family protein
Eucgr.F02347.4	Extracellular	0.836	0.999	EC; EU	alpha-amylase-like
Eucgr.F03269.1	Extracellular	0.496	0.998	EC; EG; EU	peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagineamidase A protein
Eucgr.F03495.1	Extracellular	0.912	0.999	EG	O-Glycosylhydrolasesfamily 17 protein
Eucgr.F03515.2	Cytoplasm	0.579	0.000	EC; EG	SHV3-like 1
Eucgr.F03538.2	Extracellular	0.944	0.997	EC	SKU5 similar 5
Eucgr.F03589.2	Extracellular	0.348	0.995	EC	xylemcysteine peptidase 1
Eucgr.F03673.2	Cytoplasm	0.599	0.000	EC	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4
Eucgr.F03689.1	Extracellular	0.005	0.990	EC; EG	FASCICLIN-like arabinogalactan 1
Eucgr.F04071.1	Extracellular	0.778	0.999	EC; EG; EU	-
Eucgr.G00445.1	Extracellular	0.979	0.999	EC; EG; EU	O-Glycosylhydrolasesfamily 17 protein
Eucgr.G00649.1	Extracellular	0.653	0.934	EC; EG; EU	beta-D-xylosidase 4
Eucgr.G00650.1	Extracellular	0.715	0.987	EC; EG; EU	beta-D-xylosidase 4
Eucgr.G00652.1	Cytoplasm	0.474	0.000	EC; EG	beta-D-xylosidase 4
Eucgr.G01215.1	Peroxisome	0.508	0.001	EC; EG; EU	glycosylhydrolase super family protein
Eucgr.G01217.1	Peroxisome	0.486	0.000	EC; EG; EU	glycosylhydrolase family 10 protein
Eucgr.G01335.1	Extracellular	0.391	0.999	EC; EG; EU	plant basic secretory protein (BSP) family protein
Eucgr.G01336.1	Extracellular	0.323	0.999	EC; EG; EU	plant basic secretory protein (BSP) family protein
Eucgr.G01378.1	Nucleus	0.618	0.025	EC; EG; EU	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.G01420.1	Extracellular	0.853	0.995	EG	subtilase family protein
Eucgr.G01559.1	Extracellular	0.836	0.970	EC; EG; EU	eukaryotic aspartyl protease family protein

Eucgr.G01561.1	Plastid	0.531	0.001	EC; EG	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.G01726.5	Plastid	0.956	0.000	EC; EG	fructose-bisphosphate aldolase 2
Eucgr.G01931.1	Cytoplasm	0.464	0.000	EC; EG; EU	glycosylhydrolase family 38 protein
Eucgr.G01978.1	Plastid	0.998	0.000	EC; EG; EU	aldolase-type TIM barrel family protein
Eucgr.G02055.1	Extracellular	0.998	0.999	EC	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.G02197.1	Extracellular	0.495	0.972	EC; EG	cupredoxin super family protein
Eucgr.G02608.1	Mitochondrion	0.740	0.046	EC	prolyl oligo peptidase family protein
Eucgr.G02615.1	Extracellular	0.598	0.886	EG	alpha-galactosidase 2
Eucgr.G02896.1	Extracellular	0.822	0.599	EC; EG; EU	beta-hexosaminidase 1
Eucgr.H00326.1	Extracellular	0.740	0.999	EC; EG	homolog of carrot EP3-3 chitinase
Eucgr.H00669.5	Extracellular	0.49	0.950	EC; EG; EU	alpha-galactosidase 2
Eucgr.H00716.7	Extracellular	0.464	0.999	EC; EG	serinecarboxypeptidase-like 20
Eucgr.H00739.1	Extracellular	0.892	0.999	EG	auxin-responsivefamilyprotein
Eucgr.H00800.1	ER	0.531	0.002	EC; EG; EU	cytochrome B5 isoform B
Eucgr.H01399.2	Extracellular	0.651	0.999	EC	serinecarboxypeptidase-like 20
Eucgr.H02279.1	Extracellular	0.990	0.998	EC; EG; EU	subtilase family protein
Eucgr.H02345.1	Extracellular	0.340	0.987	EC; EG; EU	serine carboxy peptidase S28 family protein
Eucgr.H02477.1	Extracellular	0.829	0.999	EC; EG; EU	melibiasefamilyprotein
Eucgr.H02706.1	Extracellular	0.517	0.999	EC; EG	plant basic secretory protein (BSP) family protein
Eucgr.H02823.1	Plastid	0.38	0.004	EC; EU	nine-cis-epoxycarotenoiddioxygenase 6
Eucgr.H03274.1	Extracellular	0.94	0.999	EC; EG; EU	proteinkinasesuperfamilyprotein
Eucgr.H04079.1	Extracellular	0.440	0.998	EC; EU	serinecarboxy peptidase-like 33
Eucgr.H04426.3	Plastid	0.674	0.243	EC; EG; EU	copper/zincsuperoxide dismutase 1
Eucgr.H04457.1	Extracellular	0.779	0.994	EC; EG	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
Eucgr.H04944.1	Extracellular	0.723	0.825	EC; EG; EU	plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
Eucgr.H05072.1	Extracellular	0.506	0.978	EC; EG; EU	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.H05090.1	Mitochondrion	0.691	0.002	EC; EG	glycosylhydrolasefamily 35 protein
Eucgr.I00020.1	Extracellular	0.292	0.872	EC; EG; EU	peroxidase superfamilyprotein
Eucgr.I00424.1	Extracellular	0.669	0.999	EC; EU	lipase/lipooxygenase, PLAT/LH2 family protein
Eucgr.I01025.2	Plastid	0.397	0.033	EC; EU	photosystem II subunit O-2

Eucgr.I01097.1	Cytoplasm	0.485	0.017	EC; EG; EU	plant basic secretory protein (BSP) family protein
Eucgr.I01099.1	Extracellular	0.643	0.996	EC; EG; EU	plant basic secretory protein (BSP) family protein
Eucgr.I01176.1	Extracellular	0.365	0.999	EG	peroxidase super family protein
Eucgr.I01433.1	Cellmembrane	0.650	0.000	EC	cupredoxin super family protein
Eucgr.I01521.3	Extracellular	0.0	0.943	EC; EG	patched family protein
Eucgr.I01564.1	Plastid	0.918	0.000	EC; EG	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
Eucgr.I01600.1	Extracellular	0.583	0.992	EC; EG; EU	glycosylhydrolase family 38 protein
Eucgr.I01655.1	Extracellular	0.000	0.999	EC	cupredoxin super family protein
Eucgr.I02679.2	Extracellular	0.999	0.999	EC; EG; EU	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.J00023.3	Cytoplasm	0.889	0.000	EC; EG; EU	heatshockcognateprotein 70-1
Eucgr.J00367.1	Extracellular	0.038	0.915	EC; EG; EU	alpha-L-fucosidase 1
Eucgr.J00381.1	Extracellular	0.492	0.997	EC; EG	serinecarboxy peptidase-like 48
Eucgr.J00403.2	Extracellular	0.575	0.973	EC; EG; EU	serinecarboxy peptidase S28 familyprotein
Eucgr.J00936.1	Extracellular	0.981	0.999	EC; EG; EU	beta-galactosidase 8
Eucgr.J01234.2	Plastid	0.872	0.000	EC; EG; EU	rubisco activase
Eucgr.J01477.1	Cytoplasm	0.592	0.000	EC; EG	general regulatoryfactor 7
Eucgr.J01502.2	Plastid	0.919	0.001	EC	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein
Eucgr.J01800.2	Extracellular	0.894	0.993	EC; EU	protein of unknown function, DUF538
Eucgr.J01957.1	Mitochondrion	0.382	0.000	EC	HSP20-like chaperones superfamily protein
Eucgr.J02106.1	Extracellular	0.166	0.996	EC; EG; EU	-
Eucgr.J02352.1	Extracellular	0.805	0.999	EC; EU	peroxidase super family protein
Eucgr.J03190.1	Extracellular	0.751	0.997	EC; EG; EU	alpha-vacuolar processingenzyme
Eucgr.K00562.2	Cellmembrane	0.268	0.000	EC	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.K00576.1	Extracellular	0.794	0.978	EU	-
Eucgr.K00671.1	Cytoplasm	0.383	0.000	EC	-
Eucgr.K01300.1	Extracellular	0.0	0.998	EC; EG	protein of unknown function (DUF1191)
Eucgr.K01508.1	Cytoplasm	0.688	0.002	EC; EG; EU	cobalamin-independent synthase family protein
Eucgr.K01691.1	Extracellular	0.457	0.981	EC; EG; EU	alpha-L-arabinofuranosidase 1
Eucgr.K01841.1	Cytoplasm	0.758	0.000	EC; EG	actin 1
Eucgr.K01917.2	Extracellular	0.875	0.999	EC; EG	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein

Eucgr.K01960.1	Cytoplasm	0.492	0.000	EC	glycosylhydrolases family31 protein
Eucgr.K01962.1	Extracellular	0.176	0.996	EC; EG; EU	glycosylhydrolases family31 protein
Eucgr.K01967.1	Extracellular	0.987	0.998	EC; EG	subtilasefamilyprotein
Eucgr.K02100.1	Extracellular	0.903	0.999	EC; EG; EU	receptor-like protein kinase-related family protein
Eucgr.K02206.1	Extracellular	0.618	0.980	EC; EG; EU	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.K02326.1	Extracellular	0.475	0.999	EC; EU	kunitz family trypsin and protease inhibitor protein
Eucgr.K02430.1	Extracellular	0.100	0.996	EC; EG; EU	pectin lyase-like superfamily protein
Eucgr.K02606.2	Plastid	0.997	0.000	EC; EU	thioredoxinsuperfamilyprotein
Eucgr.K02769.1	Extracellular	0.321	0.998	EG	cysteine proteinases superfamilyprotein
Eucgr.K03041.1	Extracellular	1.0	0.999	EC; EG; EU	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Eucgr.K03065.1	Plastid	0.997	0.000	EC	rubisco activase
Eucgr.K03566.1	Extracellular	0.367	0.949	EC; EG; EU	GDSL-like Lipase/Acyl hydrolase superfamily protein
Eucgr.L00918.1	Extracellular	0.408	0.999	EC; EG; EU	senescence-associated gene 12
Eucgr.L00939.1	Extracellular	0.815	0.014	EC; EG; EU	basicchitinase
Eucgr.L00941.1	Extracellular	0.774	0.999	EC	basicchitinase
Eucgr.L01120.1	Cytoplasm	0.286	0.021	EC; EG	glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
Eucgr.L01345.1	Extracellular	0.442	0.011	EG	laccase 14
Eucgr.L01628.1	Cytoplasm	0.372	0.005	EC; EG	eukaryotic aspartyl protease family protein
Eucgr.L02740.1	Extracellular	0.455	0.994	EC; EG; EU	peroxidase super family protein
Eucgr.L03176.1	Plastid	0.756	0.000	EC; EG	endo ribonuclease L-PSP family protein
Eucgr.L03478.1	Extracellular	0.445	0.999	EC	chitinase A

¹Protein access at the Phytozome database, ²In silico subcellular localization assigned by TargetP and DeepLoc, ³Output value for cellular localization attributed by DeepLoc, ⁴Output value for Signal Peptides attributed by TargetP, ⁵EC: Eucalyptus camaldulensis; EG: Eucalyptus grandis; EU: Eucalyptus urophylla, ⁶Description assigned by the Phytozome database; ER: Endoplasmic reticulum.

CAPÍTULO 3 – Alterações no proteoma de caules e seiva de plantas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em alta concentração de CO₂

1. INTRODUÇÃO

As ações antropogênicas, como aquelas induzidas pelo desmatamento e pela emissão de gases estufa, podem resultar em uma série de problemas ambientais e mudanças expressivas no meio ambiente (MENEZES-SILVA et al., 2019). Uma das mais impactantes mudanças ambientais induzidas pelo homem é o incremento na concentração de CO₂ na atmosfera, a qual vem aumentando drasticamente desde meados de 1760 com o início da revolução industrial (ARCE et al., 2014). Foi registrado o valor de 420 ppm no ano de 2023 pelo observatório de Mauna Loa, no Havaí, sendo este o maior registro desde 1958 quando o monitoramento começou (NOAA, 2023). De acordo com o Painel Intergovernamental sobre as Mudanças Climáticas (IPCC) a concentração atmosférica de CO₂ deve chegar a incrível marca de 700-1000 ppm no ano de 2100.

Neste cenário, as espécies florestais têm um enorme valor social e econômico pois podem servir como um dos mais importantes organismos responsáveis pelo sequestro de carbono, mitigando substancialmente as elevadas emissões de CO₂ causadas pelo homem (JIANG et al., 2020). Em vista disso, o gênero *Eucalyptus* é um ótimo modelo para o uso em florestas plantadas (SILVEIRA et al., 2020) e seu metabolismo do tipo C₃ é de extrema importância no âmbito social e econômico, uma vez que plantas que utilizam a via fotossintética C₃ dependem de uma maior relação CO₂:O₂, sendo capazes de realizar com mais eficiência a fixação de esqueletos de carbono e aumentar sua biomassa em cenários climáticos futuros.

A taxa de concentração de CO₂ disponível também afeta diretamente diversas vias metabólicas em plantas, como a fotossíntese e a respiração celular (DUSENGE et al., 2019). Além disso, enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares também aumentam significativamente nestas condições, sugerindo a adaptação do metabolismo de carboidratos das plantas ao CO₂ disponível (ABDELGAWAD et al.,

2014). Ademais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também pode sofrer alteração, principalmente devido ao fechamento estomático quando submetidas a uma alta concentração de CO₂ (KOLLA et al., 2007; SHI et al., 2015).

O sistema vascular das plantas, embora menos estudado, também pode sofrer alterações em seu proteoma quando submetido a mudanças ambientais (EVERT, 1990; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011). Isso se deve principalmente à comunicação entre a raiz e os tecidos aéreos existentes nas plantas (SCHEPPER et al., 2013). Embora o estudo e compreensão das respostas sistêmicas na seiva das plantas depende muito do método e da espécie utilizada, o interesse na investigação do proteoma de seiva tem aumentado para o entendimento da resposta a estresses abióticos (KASPER et al., 2022), defesa contra patógenos (SOLIMAN et al., 2021) e desenvolvimento das plantas (PATEL et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar diferenças no proteoma de seiva e caules de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* quando cultivados em atmosfera enriquecida com CO₂.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e destacar as proteínas diferencialmente abundantes entre os tratamentos de CO₂ nos caules de cada espécie de *Eucalyptus*;
- Analisar as mudanças na abundância das proteoformas caulinares dentro de cada espécie/tratamento envolvidas nos metabolismos da: lignina, celulose, ciclo do ácido tricarboxílico e antioxidante.
- Analisar as mudanças no proteoma de seiva das espécies de *Eucalyptus* quando cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ e identificar aquelas potencialmente envolvidas na sinalização a longa distância.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo do material vegetal e tratamento de CO₂

As espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* foram inicialmente semeadas em tubetes contendo substrato comercial Bioplant Plus sob constante irrigação por 30 dias até a capacidade campo do vaso. As mudas foram então transplantadas para vasos de 10L e cultivadas por mais 90 dias nas mesmas condições de irrigação. Em seguida, para a análise do proteoma caulinar, as mudas adubadas com fertilizante foliar misto “Heringer FH HF Start” e acondicionadas em câmara de crescimento por 30 dias. Para o proteoma vascular, o período de crescimento nas câmaras foi de 20 dias. Em ambas situações, os parâmetros nas câmaras foram ajustados para: 12h de fotoperíodo, 40% de umidade do ar, 300 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 28°C de temperatura. Foram utilizadas 3 repetições biológicas por espécie/tratamento para o experimento de proteômica de caule, onde cada repetição foi constituída por 4 plantas. Por sua vez, o experimento do proteoma vascular também foi constituído de 3 repetições por espécie/tratamento, onde cada repetição foi constituída de 3 plantas e um total de 3mL de seiva coletada.

3.2. Quantificação de açúcares na seiva

A seiva coletada foi submetida a centrifugação a vácuo utilizando o aparelho Concentrator Plus (Eppendorf) e as amostras em tubos eppendorf foram completamente secas para quantificação de açúcares utilizando um sistema adaptado de Pagliuso et al. (2018). Para isso, as amostras foram ressuspendidas em 1mL de H₂O Milli-Q e 1mL de clorofórmio para a solubilização e limpeza dos açúcares analisados (sacarose, frutose, glicose e rafinose). Os açúcares solúveis foram analisados por Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance com Detecção por Ampérometria de Pulso (HPAEC-PAD) em um sistema Dionex R (ICS 3000) utilizando uma coluna CarboPac PA1 e eluídos com hidróxido de sódio 150 μM em uma corrida isocrática de 27 minutos.

3.3. Extração proteica

3.3.1. Extração de proteínas caulinares

Os caules foram cortados em pequenos pedaços e congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a retirada das plantas das câmaras de CO₂. Em seguida, uma alíquota de 1 g de caule foi separada, congelada novamente e macerada com auxílio de cadinho e pistilo. Após a pulverização do material, foi adicionado 3 mL de tampão de extração (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM sacarose, 100 mM KCl, pH 8,0, 1% beta-mercaptoetanol) em tubos do tipo Falcon 15 mL e as amostras submetidas a agitação mecânica em 4 °C. Após 10 min, foi adicionado o mesmo volume de fenol equilibrado e o volume agitado em temperatura ambiente. O pellet proteico foi separado do material vegetal por centrifugação a 4100 g por 10 min à 4 °C e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Após separação, 4x o volume de solução precipitante (0,1 M acetato de amônio em metanol) foi adicionado ao sobrenadante para precipitação das proteínas. Após precipitação, a amostra foi centrifugada novamente a 4100 g por 5 min à 4°C para a formação do pellet proteico e o líquido restante descartado. As proteínas foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl (125 mM de Tris, pH 6,8, 20% de glicerol, 1% de SDS, 0,1% de DTT). Por fim, foi realizada a quantificação dos extratos proteicos por fluorimetria no equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific).

3.3.2. Extração de proteínas de seiva

As seivas das plantas jovens de eucalipto foram coletadas por meio do uso de uma câmara de pressão do tipo Scholander, imediatamente após a saída das câmaras de enriquecimento de CO₂ atmosférico. Para tanto, as mudas foram separadas do substrato a uma distância de aproximadamente 20 cm a partir do ápice caulinar e inseridas no sistema da câmara de pressão de modo que a base do caule removido fosse exposta para a exsudação e coleta das gotículas de seiva. Com base nos dados do capítulo anterior, optou-se por utilizar a pressão máxima de 4.0 MPa para a extração de seiva nas duas espécies/tratamentos.

A seiva foi coletada diretamente em tubos eppendorf de 1.5 ml limpos sempre acondicionados em gelo. Ao final da coleta de cada amostra, os tubos foram

congelados em nitrogênio líquido até a próxima etapa da extração. Para a extração proteica, a seiva foi transferida para tubos tipo Falcon de 50 mL e adicionados 10 mL de Tampão Tris-HCl (125 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 1% DTT e 20% glicerol) por 10 minutos em constante agitação em ambiente gelado (4 °C). Em seguida, foi adicionado 5x o volume de acetona gelada para precipitação das proteínas por 48h a -30 °C. O pellet proteico foi obtido por centrifugação (3200 g) e ressuspendido com tampão Tris-HCl, seguido de quantificação protéica por fluorometria utilizando-se o equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific).

3.4. *Análise por espectrometria de massas*

Uma alíquota de 50µg de proteína foi utilizada para digestão em solução do experimento do proteoma de caule e 30µg para seiva. As proteínas foram inicialmente precipitadas em metanol e ressuspendidas em 25 mM de bicarbonato de amônio e aquecidas a 70 °C por 10min. As proteínas foram reduzidas com solução de redução utilizando ditione 200mM e incubadas a 56 °C por 20 min. Em seguida, foi adicionado solução de alquilação utilizando iodoacetamida 200 mM em temperatura ambiente por 20 min no escuro. Após os processos, foi utilizado a tripsina (Trypsin Gold, Promega) na proporção de 1:10 solubilizada em solução de digestão (10% 100 mM bicarbonato de amônio, 10% Acetonitrila e 80% Água Milli-Q), durante 16 h a 37 °C. As amostras peptídicas foram concentradas e dessalinizadas utilizando ponteiras do tipo ZipTip (Merck-Millipore) segundo as instruções do fabricante e quantificadas por fluorimetria utilizando o Qubit (Thermo Fisher Scientific).

Foram utilizados 1 µg e 500 ng de cada amostra peptídica para os experimentos de caule e seiva, respectivamente. Os peptídeos foram ressuspendidos em água Milli-Q contendo 0,1% Ácido Fórmico e separados em um sistema cromatográfico EASY-nLC1000 (Thermo Fisher Scientific) por 95min utilizando uma nano-coluna C18 (15 cm, 3 µm, 100 Å) sob fluxo constante e concentração de acetonitrila crescente (7 a 30% por 70 min e constante a 70% por 25 min). As análises de espectrometria de massas foram realizadas utilizando um instrumento Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) operado no modo íon positivo. A aquisição de espectros ocorreu em modo dependente de dados com ciclos consistindo em uma varredura completa (20-20000

m/z) em 70,000 FWHM (Full Width at Half Maximum) seguido por vinte varreduras dependentes de dados em 35,000 em um tempo máximo de injeção de 100 ms. A fragmentação dos peptídeos foi obtida a partir da fragmentação no HCD (dissociação de colisão de alta energia) usando uma energia de colisão igual a 35 eV. Íons carregados individualmente foram excluídos dos eventos de fragmentação e íons peptídicos selecionados (+2 e +3) para fragmentação foram excluídos dinamicamente por 5 s.

3.5. Identificação de proteínas

A identificação de peptídeos tripticos e a inferência de proteínas de seiva foi realizada utilizando-se o software MaxQuant [v. 1.6.3.3] (TYANOVA et al., 2016) através de correlações dos dados experimentais com o banco de dados de proteínas de Eucalyptus v.2.0 disponível na plataforma Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012). Os parâmetros utilizados nas buscas foram ajustados em: 20 ppm para íons percursores, oxidação de metioninas como modificação variável e carbamidometilação de cisteínas como modificação estática, máximo de duas clivagens perdidas e taxa de falsas descobertas (FDR) em 1%. Foi utilizado o método de quantificação livre de marcação (LFQ) para a quantificação relativa das proteínas identificadas.

3.6. Processamento de dados e bioinformática

Primeiramente, as repetições biológicas foram separadas em grupos de acordo com a espécie/tratamento e as proteínas só foram consideradas caso estivessem presente em ao menos uma repetição biológica nestas condições. A base de dados contendo os acessos proteicos e os valores de abundância (LFQ) foi importada para o software Perseus (TYANOVA et al., 2016b). Neste momento, os valores foram normalizados através da transformação em $\log_2$ e os valores ausentes foram atribuídos para cada amostra através de uma distribuição normal desenvolvida pelo próprio software.

No experimento do proteoma de seiva, os acessos proteicos foram primeiramente submetidos às ferramentas de bioinformática para a atribuição das localizações celulares. Para tanto, as sequências proteicas foram analisadas com o

programa TargetP 2.0 (ARMENTEROS et al. 2019) visando a identificação de peptídeos sinalizadores (SP) característicos de plastídios e de matriz extracelular. Posteriormente, para a atribuição de demais localizações celulares foi utilizado o programa DeepLoc 1.0 (ARMENTEROS et al. 2017). Desse modo, somente o proteoma vascular de eucalipto foi considerado para as futuras análises.

Os proteomas de caule e seiva foram então submetidos isoladamente ao teste t de student ($p < 0.05$) para a comparação entre o controle (410 ppm) e o tratamento (680 ppm) das espécies de *Eucalyptus* estudadas. Além disso, as proteínas que apresentaram um fold-change maior ou igual 2 foram reconhecidas como diferencialmente abundantes entre as condições biológicas. A anotação funcional das proteínas identificadas foi realizada através da plataforma EGGNOG (CANTALAPIEDRA et al. 2021) utilizando o grupo Viridiplantae como filtro taxonômico.

Para o experimento do proteoma de caule, as proteoformas envolvidas no metabolismo antioxidante, biossíntese de lignina, biossíntese de celulose e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) foram selecionadas manualmente através do banco de dados disponível na plataforma Phytozome. Os domínios conservados indicados pela ferramenta InterPro foram utilizados na seleção das proteínas envolvidas nos metabolismos-alvo. Ademais, também foi aplicado o teste t de student ($p < 0.05$) a nível de enzima (soma de proteoformas) para comparar os tratamentos de CO₂ aplicados nas espécies de eucalipto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diferenças no proteoma caulinar das espécies de *Eucalyptus* frente ao estímulo de CO₂ ambiente

Nas espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas, foram identificadas 2293 proteínas não redundantes. De acordo com as análises pareadas, 20 proteínas para *E. grandis* e 25 para *E. urophylla* foram consideradas diferencialmente expressas e mais abundantes. Isso significa que foram selecionadas no teste pareado (p -valor < 0.05) e seu fold-change foi maior que 2x. Dessa mesma maneira, 13 e 19 proteínas

foram consideradas menos abundantes (p -valor < 0.05 e fold-change < -2) para *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente (Figura 1).

A análise funcional do proteoma combinado das duas espécies de *Eucalyptus* revelou que, muito embora para uma grande fração das proteínas não foi possível atribuir uma função conhecida, aquelas relacionadas à estrutura celular, modificações pós-traducionais e produção de energia foram majoritariamente reportadas nesta análise. É importante destacar também a predominância de proteínas responsáveis pela tradução e metabolismo e transporte de carboidratos. Por outro lado, as proteínas menos predominantes no caule das espécies são principalmente proteínas envolvidas na estrutura nuclear, sinalização celular e mobilidade celular (Figura 2A).

Para a caracterização das respostas induzidas pelo aumento de CO₂ atmosférico nas duas espécies, todas as proteínas que foram consideradas mais abundantes de acordo com os critérios acima foram destacadas. Para algumas proteoformas, foi impossível estabelecer uma descrição e uma análise funcional a partir da busca com o banco de dados do UniProtKB (UniProt, 2023). Os acessos proteicos sem funções biológicas atribuídas são: Eucgr.C00793.1; Eucgr.D01166.1; Eucgr.E01117.5; Eucgr.F03446.1; Eucgr.F03808.3; Eucgr.F03965.2; Eucgr.I02214.1; Eucgr.L02517.1; Eucgr.F04156.1; Eucgr.J02112.1; Eucgr.L03200.2 para as espécies de eucalipto aqui estudadas.

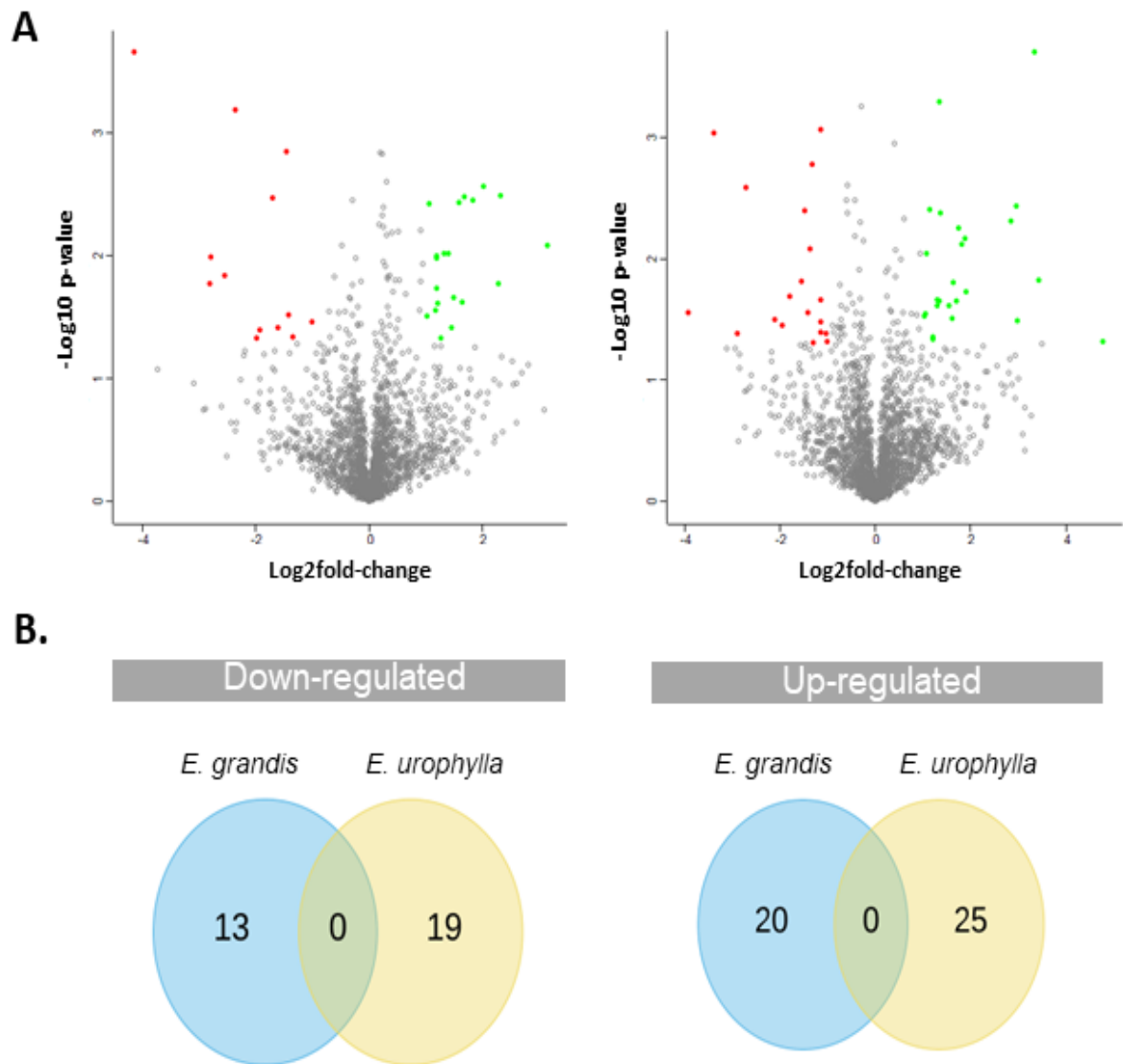


Figura 1. Proteínas diferencialmente abundantes nos tecidos caulinares nas espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica (420 ppm) e alta concentração de CO₂ (680 ppm). **(A)** Volcano plot (proteínas destacadas em vermelho são down-regulated e proteínas destacadas em verde são up-regulated). **(B)** Diagrama de Venn aprontando as proteínas diferencialmente reguladas dentro de cada espécie.

As proteínas mais abundantemente reguladas nas espécies aqui estudadas não mostrou acessos proteicos em comum, entretanto, as funções proteicas identificadas em ambas as espécies se resumem principalmente em síntese e metabolismo de

carboidratos, desenvolvimento da planta, adaptações a estresse, proteínas envolvidas em vias metabólicas e de maquinaria celular (Figura 2B). Em *E. urophylla*, a proteína Eucgr.A02888.1 é uma beta-fructofuranosidase, tratando-se de uma invertase que utiliza sacarose para a síntese de fruto-oligossacarídeos (BELECKI E SOMIARI, 1998). No mesmo sentido de síntese de carboidratos, a proteína Eucgr.E03370.3 é uma proteoforma de SCAMPs (“Secretory Carrier-Associated Membrane Proteins”) principalmente envolvida no tráfego na membrana plasmática (LAW et al., 2012). Obudulu et al. (2018) identificaram a função das SCAMPs em *Populus* (L.), revelando a influência dessas proteínas no acúmulo de componentes de parede secundária, principalmente polissacarídeos e compostos fenólicos no tecido caulinar de espécies desse gênero, que também são lenhosas como o eucalipto. Ademais, a proteína Eucgr.K02355.2 trata-se de uma “glycosyltransferase”, possuindo diversas funções em plantas, porém a principal é a biossíntese de polissacarídeos e glicoproteínas na parede celular (HANSEN et al., 2012). A maioria das glycosyltransferases catalisam a transferência de um resíduo de açúcar de um nucleotídeo ativado para uma molécula específica, formando uma ligação glicosídica, processo esse que pode ser realizado de maneira bem específica por tais enzimas (BRETON et al., 2006). A proteoforma Eucgr.A02700.1 também se refere a uma glycosyltransferase identificada e abundantemente regulada em *E. grandis*, mostrando também a presença de proteínas desta categoria nesta espécie.

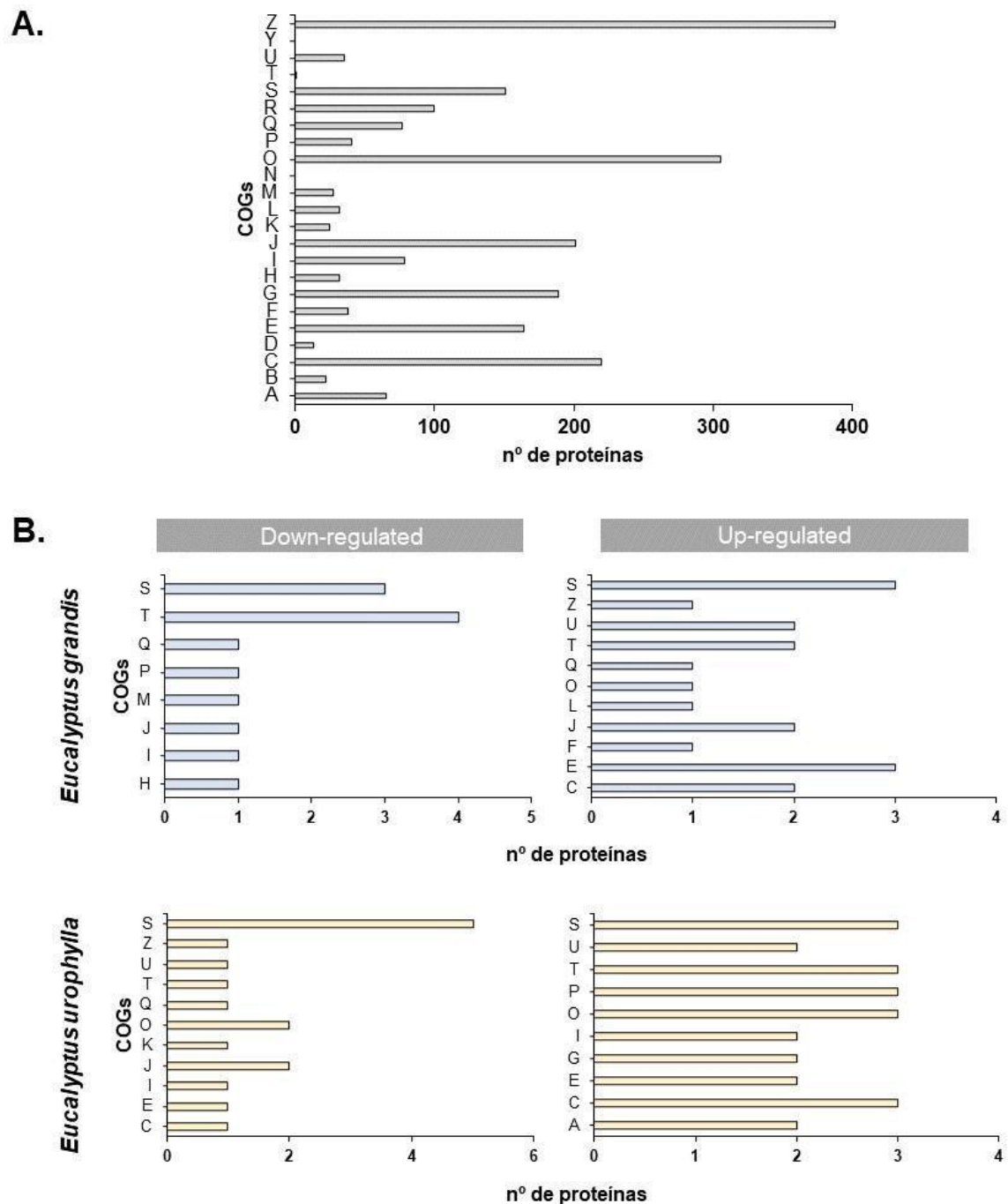


Figura 2. Anotação funcional de acordo com a plataforma EGGNOG das proteínas presentes em todo o proteoma e das diferencialmente reguladas no estudo das espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. **(A)** Panorama combinado do proteoma caulinar de plantas jovens de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentrações controladas de atmosfera enriquecida por CO₂. **(B)** Proteínas mais e menos reguladas de acordo com os tratamentos de

enriquecimento de CO₂. **Legenda:** A - RNA processing and modification, B - Chromatin Structure and dynamics, C - Energy production and conversion, D - Cell cycle control and mitosis, E - Amino Acid metabolism and transport, F - Nucleotide metabolism and transport, G - Carbohydrate metabolism and transport, H - Coenzyme metabolism, I - Lipid metabolism, J – Translation, K – Transcription, L - Replication and repair, M - Cell wall/membrane/envelop biogenesis, N - Cell motility, O - Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions, P - Inorganic ion transport and metabolism, Q - Secondary Structure, T - Signal Transduction, U - Intracellular trafficking and secretion, Y - Nuclear structure, Z – Cytoskeleton, R - General Functional Prediction only and S - Function Unknown.

Proteínas envolvidas em vias metabólicas e ciclos celulares também foram identificadas em ambas espécies. A proteína Eucgr.G00868.1 (CN hydrolasedomain-containing protein) é uma enzima envolvida na redução de componentes orgânicos formados por nitrogênio e na produção de amônia, sendo presente principalmente no metabolismo de pirimidinas e beta-alanina (BORK E KOONIN, 1994). Uma proteoforma de difosfatase inorgânica (Eucgr.G01121.1) também foi altamente regulada em plantas cultivadas em alto CO₂ atmosférico. A presença dessa enzima está principalmente relacionada na reciclagem da pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase para a economia na síntese de ATP, regulação de hexose fosfatos e no funcionamento do ciclo de Calvin-Benson (KHMELENINA et al., 2011). Neste mesmo sentido, uma proteoforma pertencente ao grupo das CHCH (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix) também foi identificada (Eucgr.H03663.2). Estas proteínas estão estritamente relacionadas com fatores celulares que vão regular a respiração mitocondrial, metabolismo antioxidante, homeostase lipídica e a dinâmica da membrana celular (MODJTAHEDI et al., 2016). Por fim, uma proteoforma da superóxido dismutase (Eucgr.K00110.7) também foi altamente expressa no grupo de tratamento em *E. urophylla*, indicando o funcionamento deste metabolismo celular e também a resposta ao crescimento vegetativo e respostas ao tratamento de CO₂ induzido (ZAMEER et al., 2022). A presença de proteoformas da superóxido dismutase altamente reguladas sob o tratamento de CO₂ corrobora também com o indicado na Figura 5, uma vez que sua expressão aumentou consideravelmente na espécie *E. urophylla* de acordo com o mapa de calor apresentado.

Em *E. grandis*, foi identificado a subunidade menor da RuBisCO (“Ribulose biphosphate carboxylase small unit” - Eucgr.B03013.1). Esta subunidade pequena é sintetizada como um precursor carregando uma sequência amino-terminal que direciona a proteína para o cloroplasto sendo clivada posteriormente (MAZUR E CHUI, 1985). Além disso, outra enzima cloroplastidial foi altamente regulada em *E. grandis* nas plantas cultivadas em alta concentração de CO₂. A “zeaxanthin epoxidase” (Eucgr.I00922.2) desempenha funções fotoprotetoras em plantas terrestres (JAHNS E HOLZWARTH, 2012). Está principalmente envolvida na extinção não fotoquímica (NPQ) do excesso de energia luminosa no fotossistema II (PSII), além de atuar como um antioxidante da membrana tilacoide (HAVAUX et al., 2007; BETHMANN et al., 2019). Uma Peptidase M20 (Eucgr.F04363.1) também foi identificada nas condições propostas, e pode estar envolvida na reação catalisada para a liberação de um aminoácido N-terminal de um polipeptídeo (RAWLINGS E BARRETT, 1995). Além disso, a presença de proteínas desta família pode estar relacionada também com a utilização de aminoácidos e a via catabólica de nucleotídeos (AGARWAL et al., 2007). Contudo, outra enzima envolvida em vias metabólicas identificada em *E. grandis* foi a 5-oxoprolinase (Eucgr.I01066.1) que envolve a síntese e degradação da glutatona e tem um papel proposto no transporte de aminoácidos (ORLOWSKI E MEISTER, 1970). Neste sentido, a glutatona é convertida enzimaticamente em oxoprolina, que é então hidrolisada em glutamato por uma 5-oxoprolinase dependente de ATP (GRIFFITH et al., 1978; WERF et al., 1971).

Proteínas envolvidas na maquinaria celular também foram identificadas em ambas espécies nas condições de tratamento de CO₂. Em *E. urophylla*, foram identificadas as proteínas Eucgr.F03935.1 (MPN domain-containingprotein) e Eucgr.K02882.4 (Nucleotidyl transferase domain-containingprotein). A primeira proteína é principalmente responsável pela remoção da cadeia de poliubiquitina de proteínas substrato (TRAN et al., 2003) enquanto a segunda proteína está possivelmente envolvida no metabolismo de RNA (SONG et al., 2015). Por sua vez, em *E. grandis*, as proteínas Eucgr.A00474.2, Eucgr.F03884.1 e Eucgr.J00938.1 foram identificadas como proteínas envolvidas em processos celulares. A Eucgr.A00474.2 (30S ribosomalprotein S9) é um componente do ribossomo cloroplastidial, uma maquinaria de tradução dedicada à síntese de proteínas codificadas pelo genoma do

cloroplasto, incluindo proteínas da maquinaria de transcrição e tradução e componentes do aparato fotossintético (YAMAGUCHI et al., 2000). Neste mesmo sentido a Eucgr.F03884.1 (SRP54-type proteins GTP-bindingdomain-containingprotein) serve como adaptador biológico na maquinaria do citoplasma, como a síntese proteica e a translocação de componentes do retículo endoplasmático (ALTHOFF et al., 1994). Por fim, a Eucgr.J00938.1 (FAS1 domain-containingprotein) é uma glicoproteína da família das Fasciclin-Like Arabinogalactan-protein (FLA), principalmente envolvida em funções de estrutura e sinalização da matriz extracelular em plantas (JIN et al., 2020).

A presença de proteínas envolvidas no metabolismo de RNA e maquinarias do citoplasma pode indicar também a adaptação de plantas a estresses abióticos (YAMAZAKI et al., 1996). Ademais, o aumento da abundância de ubiquitina (Eucgr.F03935.1) pode estar envolvida na regulação da senescência de plantas e, conseqüentemente, na adaptação ao CO₂ atmosférico (AOYAMA et al., 2014).

No que diz respeito a respostas por estresse e desenvolvimento da planta, a espécie *E. urophylla* apresentou maiores identificações. A proteína Eucgr.C04395.2 (Heparanase-like protein 3) foi altamente regulada nesta espécie, possuindo como principal função a remodelagem estrutural da matriz extracelular subjacente ao tumor e as células endoteliais que leva a invasão celular. Isso ocorre através da regulação do agrupamento, desprendimento e ligação de proteínas transmembranares (FUX et al., 2009). Foi identificada também uma proteoforma da Thioredoxindomain-containing protein (Eucgr.H00536.2), proteína principalmente envolvida na adaptação de mudanças climáticas e estresses (MEYER et al., 2008). Uma oligopeptidase A (Eucgr.I00597.1) também foi identificada no proteoma de *E. urophylla*, proteínas desta família já foram descritas como proteínas relacionadas ao estresse abiótico em arroz (TAN et al., 2013). A phospholipase D (PLDs – Eucgr.I02303.2) desempenha também um papel importante nos hormônios da planta, bem como nas respostas ambientais. Esta enzima atua através da sinalização hormonal na defesa da planta por meio de interações proteína-proteína e proteína-lipídio ou sinalização hormonal (ZHAO, 2015). Por fim, a proteína Eucgr.K03532.1 (J domain-containingprotein) também está relacionada a reposta em condições estressantes da planta, sendo um componente essencial na rede de chaperonas celulares, o que acaba facilitando processos

celulares e a sobrevivência em diversas condições estressantes (VERMA et al., 2019). Em *E. grandis*, as proteínas Eucgr.F01059.1 (NB-ARC domain-containing protein) e Eucgr.F01618.2 (SH3 domain-containing protein) forma associadas a respostas a estresses altamente reguladas nesta espécie. A proteína NB-ARC está principalmente relacionada na regulação de proteínas R que, por sua vez, são as proteínas que estão envolvidas no reconhecimento de patógenos e subsequente ativação de respostas inatas nas plantas (VAN OOIJEN et al., 2008). Segundo Xie et al. (2022) a SH3 é uma enzima que pode interagir com o sistema de vesículas envolvidas por clatrin em células de arroz, controlando a atividade de determinados genes nesta espécie. O cultivo de plantas em ambientes enriquecidos com CO₂ pode ativar respostas centrais para a defesa contra patógenos (MHAMDI E NOCTOR, 2016). Os resultados de Mhamdi e Noctor (2016) sugerem que altas concentrações de CO₂ tem o potencial de ativar um espectro de respostas de defesa que dependem do metabolismo secundário em *Arabidopsis*. Além disso, o estresse oxidativo intracelular pode ativar tanto a via antioxidante como a via de defesa contra patógenos (HAN et al., 2013).

Um total de 8 proteínas envolvidas no desenvolvimento e crescimento de plantas foram identificadas como altamente reguladas em *E. urophylla* quando cultivada sob atmosfera enriquecida com CO₂, sendo estas: Eucgr.B02940.2 (ENTH domain-containing protein); Eucgr.F03443.1 (Tryptophan synthase); Eucgr.H00739.1 (AIR12 DOMON domain-containing protein); Eucgr.H03037.1 (Methyltransferase); Eucgr.H03559.1 (WPP domain-containing protein); Eucgr.I01790.1 (carbonic anhydrase); Eucgr.I02806.4 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase) e Eucgr.J00393.1 (Late embryogenesis abundant protein LEA-2). Já foi observado em *Arabidopsis thaliana* que proteínas do tipo ENTH (Epson N-terminal homology) podem estar envolvidas na citocinese em plantas, funcionando provavelmente como adaptadores em vesículas revestidas com clatrina (SONG et al., 2012). As TRPs (tryptophan synthase) por sua vez, são enzimas que catalisam a biossíntese de triptofano em plantas (RABONI, 2010). Os aminoácidos triptofano e metionina são compostos precursores de auxina e etileno, indispensáveis no desenvolvimento de plantas (DUNN, 2012; HYDE et al., 1988). A proteína AIR12 também está relacionada com o fito-hormônio auxina, atuando na membrana plasmática ativando a via de sinalização deste hormônio (PREGER et al., 2009). As

proteínas Methyltransferase e WPP são proteínas que envolvem o envelope nuclear e o DNA propriamente dito. Com isso, suas funções se resumem na modificação do DNA através das transferências de grupamento metil e na diferenciação do envelope nuclear em células indiferenciadas na ponta da raiz, ambos indispensáveis no desenvolvimento de plantas (FINNEGAN E KOVAC, 2000; PATEL et al., 2004). A proteína “carbonic anhydrase”, embora claramente importante na fotossíntese, também são necessárias para outras vias metabólicas, bem como vias de sinalização e desenvolvimento (DIMARIO et al., 2017). A enzima IspD (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase) desempenha um papel essencial na biossíntese de terpenoides. Os terpenoides compõem uma classe de metabólitos especializados em plantas, com funções biológicas, ecológicas e fisiológicas (JIN et al., 2016). As plantas sintetizam milhares de compostos derivados dos isoprenos, com função associada a atração de polinizadores, proteção contra pragas, desenvolvimento e crescimento das plantas. Por fim, segundo Chen et al. (2019), acredita-se que a proteína LEA (Late embryogenesis-abundant) possui função no desenvolvimento normal de plantas e na proteção contra estresses abióticos. Os resultados sugerem uma alta resposta sistêmica da planta ao estímulo externo de CO₂, onde a grande presença de proteínas envolvidas no crescimento e desenvolvimento da planta está interligada com as proteínas envolvidas nas respostas de estresses e de metabolismos secundários (CHEN et al., 2016; KUMAR et al., 2020).

Em *E. grandis*, somente duas proteínas identificadas desempenham um papel no crescimento de plantas. A proteína Eucgr.D00655.1 (TOG domain-containing protein) tem papel essencial no desenvolvimento de plantas, uma vez que está estritamente relacionada aos microtúbulos celulares (WASTENEYS E AMBROSE, 2009; LECHNER et al., 2012). Ainda neste sentido, a proteína Eucgr.D00718.1 (F-box domain-containing protein) também apresenta função nos processos de desenvolvimento de plantas através da transdução de sinais de fito-hormônios, desenvolvimento floral, metabolismo secundário, senescência e resposta a estresses bióticos e abióticos (ZHANG et al., 2019).

Por todo conjunto de dados aqui analisados, sugere-se que a espécie *E. urophylla* seja mais responsiva aos estímulos de CO₂ induzidos. Além disso, essa espécie apresentou um maior número de proteínas relacionadas a adaptações por

estresses e ao desenvolvimento, mostrando um reflexo esperado no tratamento conduzido. É interessante notar que não houve proteínas compartilhadas entre as espécies, indicando uma grande diferença nas respostas sistêmicas destas espécies dentro do mesmo estímulo.

4.2. Alterações metabólicas induzidas pelo estímulo em atmosfera enriquecida por CO₂

4.2.1. A via de biossíntese da lignina

O aumento da concentração de CO₂ atmosférico pode influenciar no crescimento das plantas através da expansão foliar (RACHEL E GAIL, 2010), aumento na capacidade da fotossíntese, alteração no metabolismo antioxidante e na regulação de metabolismos secundários (RACHEL E GAIL, 2010; RUIZ-VERA et al., 2013; GILLESPIE et al., 2011 e XU et al., 2015). No presente estudo, foi realizada a abordagem de proteômica de interpretação dirigida para a identificação e quantificação das enzimas e de suas formas proteicas estritamente envolvidas na produção de lignina em *Eucalyptus*. Segundo Carocha et al. (2015), há a presença de pelo menos 17 produtos gênicos envolvidos na biossíntese de lignina. Aqui, foi possível identificar 11 das 17 enzimas descritas como diretamente envolvidas no processo de lignificação em eucaliptos (Tabela 1).

De modo geral, não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa na abundância das enzimas apresentadas. A lignificação em plantas cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ já foi reportada em estudos prévios. Matros et al. (2006) não identificaram alteração na concentração de lignina em plantas de tabaco sob condições elevadas de CO₂. Entretanto, o estudo de Mattson et al. (2005) revelou mudanças nos tecidos caulinares de plantas de bétula quando expostas ao CO₂ elevado.

Além disso, os diferentes tipos de espécies e metabolismos de plantas podem responder diferentemente a estímulos. Plantas do tipo C3, C4 e CAM podem assimilar e aumentar sua produtividade diferentemente quando submetidas a concentração elevada de CO₂ atmosférico (NOBEL E HARTSOCK, 1986). Ademais, o desenho experimental também pode alterar nos resultados. Experimentos com longo período

de tempo têm resultados diferentes em capacidade fotossintética do que experimentos de curto período (LIU et al., 2018).

Liu et al. (2018) identificou um leve aumento no conteúdo de lignina nas folhas de salsão, porém nenhum aumento significativo foi reportado no desenvolvimento e altura da planta. Portanto, sugere-se que diferentes espécies, abordagens e órgãos estudados vão alterar as respostas das plantas cultivadas em concentrações elevadas de CO₂. No presente estudo, a abordagem proteômica de descoberta combinada com a interpretação dirigida sobre as quantidades relativas das enzimas envolvidas na via de biossíntese de lignina não indicou disparidade entre os tratamentos de CO₂ dentro das espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas.

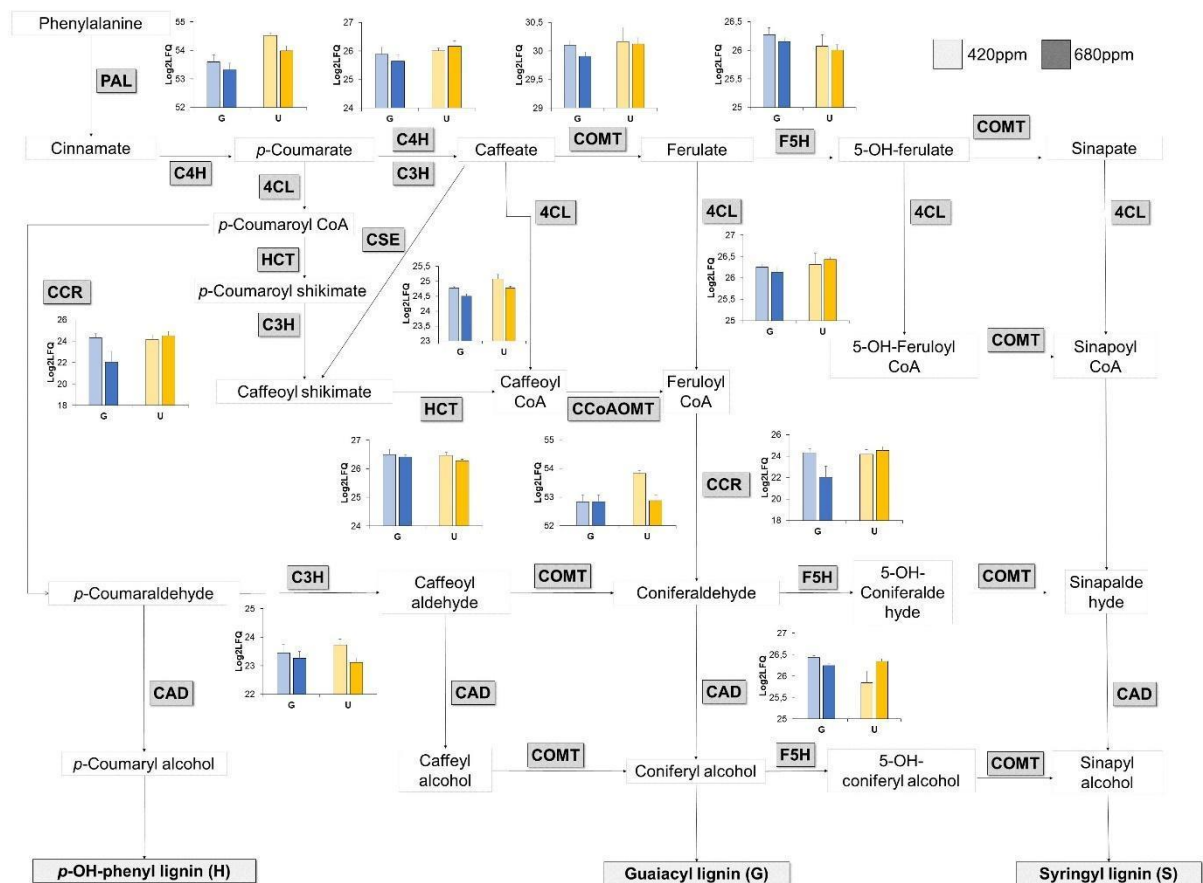


Figura 3. Biossíntese de lignina e a abundância relativa das enzimas identificadas em caules de plantas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680

ppm). As enzimas destacadas em cinza foram identificadas na análise de proteômica exploratória.

Tabela 1. Proteoformas envolvidas na biossíntese de lignina que foram identificadas na análise proteômica exploratória em plantas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Os valores de abundância estão representados em LFQ na escala log2.

Sigla	Enzima	Acessos	420 ppm		680 ppm	
			<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>
4CL	CoumarateCoA ligase	Eucgr.C02284.1	26,246	26,309	26,124	26,430
C3H	p-coumarate 3-hydroxylase	Eucgr.A02190.1	23,440	23,727	23,254	23,113
C4H	Cinnamate 4- hydroxylase	Eucgr.J01844.1	25,882	26,006	25,637	26,165
CAD	Cinnamyl-alcoholdehydrogenases	Eucgr.G01350.2	26,433	25,842	26,241	26,340
CCoAOM T	CinnamoylCoA O-methyltransferases	Eucgr.G01417.1	26,162	26,912	26,160	26,197
		Eucgr.I01134.1	26,664	26,918	26,673	26,675
CCR	CinnamylCoA reductases	Eucgr.J03114.1	24,314	24,162	22,044	24,514
COMT	Caffeic acid O-methyltransferases	Eucgr.A01397.1	30,092	30,163	29,910	30,119
CSE	CaffeoylShikimate Esterase	Eucgr.F02557.1	24,768	25,077	24,495	24,769
F5H	Ferulate 5-hydroxylases	Eucgr.J02393.1	26,275	26,069	26,152	26,006
HCT	Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase	Eucgr.J03126.1	26,493	26,463	26,419	26,280
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	Eucgr.G02848.1	26,039	26,682	25,813	26,310
		Eucgr.J01079.1	27,552	27,835	27,502	27,670

4.2.2. Análise da enzima 'sucrose synthase' (SuSy)

A sacarose e o amido são os principais produtos finais da fotossíntese na maioria das plantas e também são as principais fontes de carbono envolvidas na produção de metabólitos secundários, celulose e proteínas (MA et al., 2019).

Devido ao seu papel central e com o intuito de identificar respostas na via de biossíntese de celulose, foram destacadas 4 proteoformas da enzima sacarose sintase (SuSy) identificadas no proteoma de caule das espécies de *Eucalyptus* estudadas. Para tanto, o valor relativo da abundância das proteínas foi representado

na Figura 4 em comparação com os tratamentos de CO₂ atmosférico. A análise das proteoformas não revelou diferenças estatisticamente significativas.

Ma et al. (2021), reportou um aumento da atividade da enzima SuSy em folhas e frutos da espécie (*Lyciumbarbarum* L.) cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Além disso, neste mesmo estudo foi observado também uma tendência na diminuição de açúcares (glicose, frutose, amido e sacarose) nestes órgãos da planta, provavelmente devido à aclimação da fotossíntese sob tais condições.

Com o cultivo das espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas em elevada taxa de CO₂ atmosférico, era estimado o aumento da atividade/abundância das proteoformas da enzima SuSy (LIU et al., 2016). No entanto, os dados sugerem uma tendência em diminuir a abundância relativa dessas proteoformas quando submetidas ao tratamento de 680ppm.

Os dados aqui estudados sugerem uma inibição por retroalimentação representada pela tendência em decréscimo da abundância da enzima SuSy em situação de tratamento por CO₂ nas espécies de *Eucalyptus*. Para o funcionamento e manutenção do desenvolvimento de tecidos vasculares e outros tecidos de suporte, quantidades controladas de sacarose devem ser clivadas e metabolizadas (STEIN E GRANOT, 2019). Portanto, é provável que a inibição da atividade da SuSy tenha ocorrido em conjunto com a inibição do substrato da frutoquinase induzida pelo aumento da concentração de frutose (SCHAFFER E PETREIKOV, 1997; KANAYAMA et al., 1998). Ambas inibições podem trabalhar juntas para controlar a quantidade de clivagem de sacarose no tecido vascular (GERMAN et al., 2003). Ou seja, no caso de excesso de clivagem da sacarose pela SuSy e o aumento de frutose inibindo a atividade da frutosequinase, há um acúmulo de frutose, inibindo a clivagem adicional de sacarose pela enzima SuSy (STEIN E GRANOT, 2019).

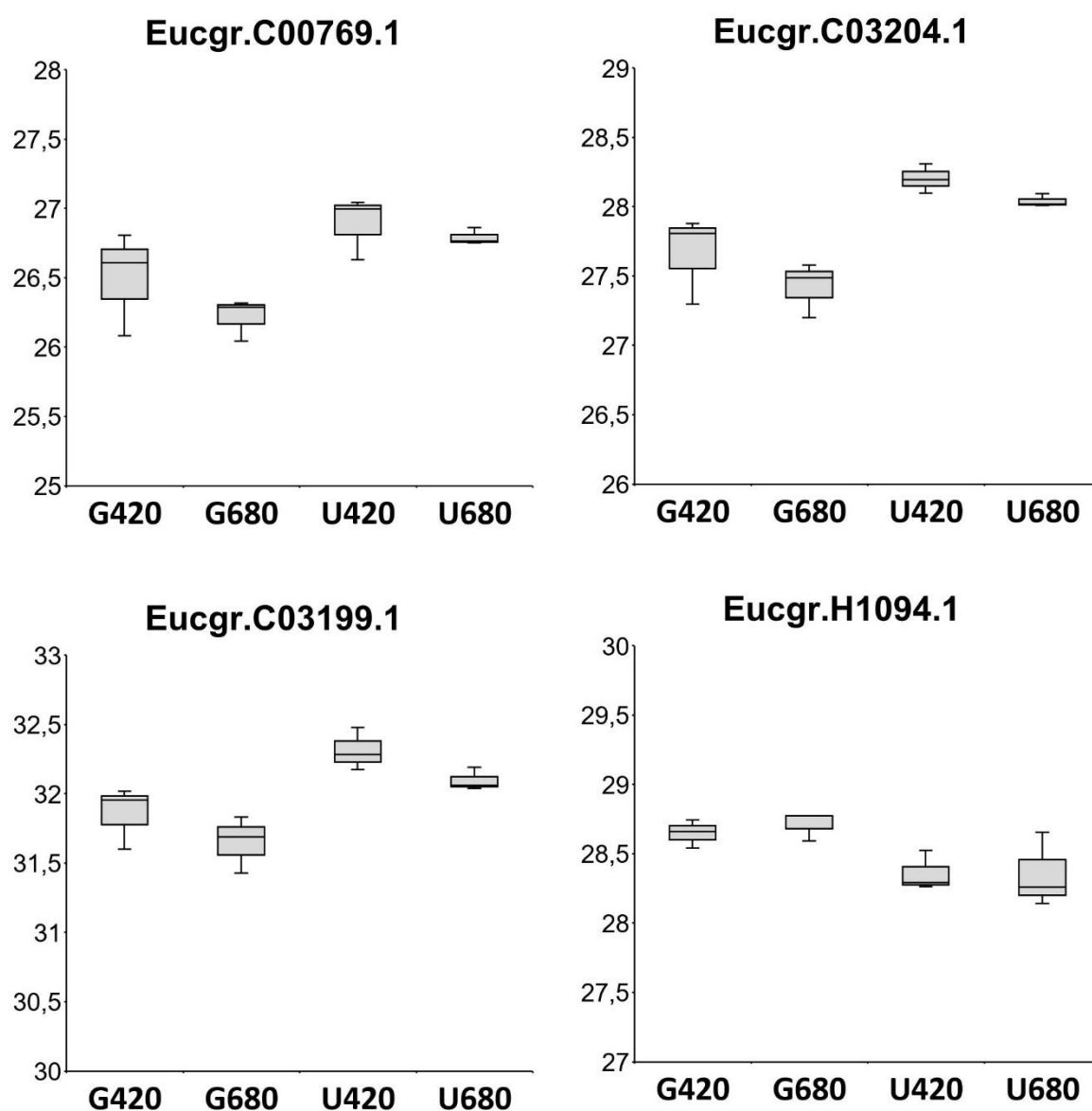


Figura 4. Abundância (Log2LFQ) das proteoformas da enzima SUSY (Sucrose synthase) identificadas na análise de proteômica exploratória nas espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em atmosfera controlada (420 ppm) e enriquecida (680 ppm) por CO₂. G: *E. grandis*; U: *E. urophylla*.

4.2.3. O metabolismo antioxidante

Um dos principais reflexos de resposta ao estresse em plantas é a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). O mecanismo capaz de metabolizar tais componentes é chamado de mecanismo antioxidante. Este mecanismo é composto

principalmente pelas enzimas catalase, glutatona peroxidase, peroxirredoxina e superóxido dismutase (SOD) (APEL E HIRT, 2004; HASANUZZAMAN et al, 2012; ZINTA et al., 2014).

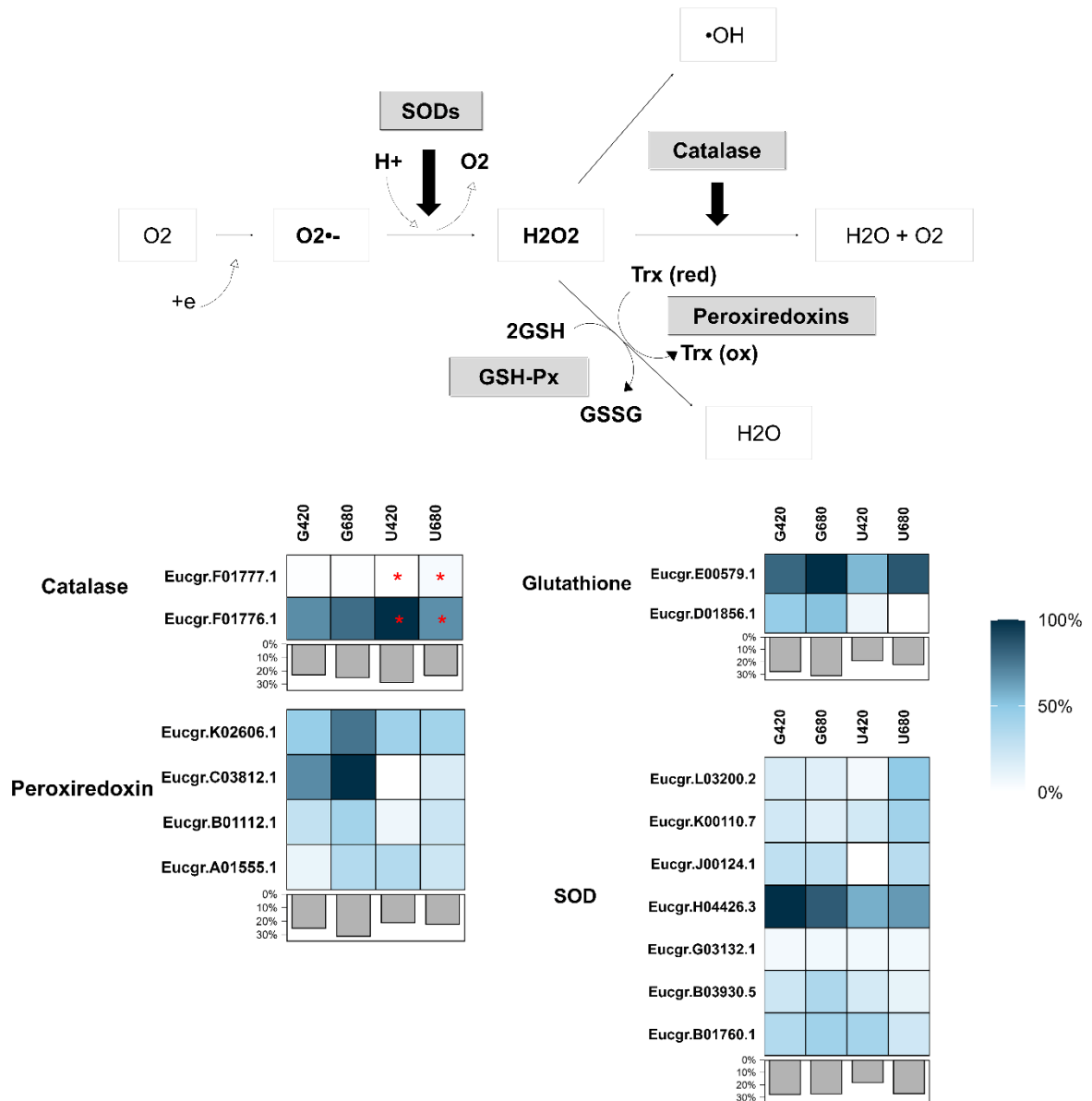


Figura 5. Processo geral de defesa antioxidante em plantas e a abundância relativa das enzimas identificadas em caules de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração de CO_2 controle (420 ppm) e concentração enriquecida (680 ppm). A escala de cor na figura representa a abundância de cada proteoforma, dentro de cada enzima. Os gráficos ilustram a soma das proteoformas

para cada espécie/tratamento. Legenda: SOD – Superoxide dismutase, GSH-Px – Glutathione peroxidase. *Indica diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

A análise das enzimas do metabolismo antioxidante em *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* revelou a presença de superóxido dismutase, peroxirredoxinas, catalase e glutathione peroxidase em ambas as espécies (Figura 5). A Figura 5 representa a abundância relativa das proteoformas de cada enzima identificada. De modo geral, observa-se uma tendência no aumento da expressão de todas as enzimas no tratamento de concentração elevada de CO₂ atmosférico, com exceção da enzima catalase na espécie *E. urophylla*, onde suas duas proteoformas (Eucgr.F01777.1 e Eucgr.F01776.1) tiveram uma redução significativa em sua abundância de acordo com o teste t de student ($p < 0.05$).

Li et al. (2020) apresentaram em seu estudo uma análise das mudanças no metabolismo antioxidante da soja cultivada em CO₂ atmosférico elevado juntamente com estresse hídrico. Os resultados mostram que as plantas cultivadas apenas no CO₂, sem estresse adicional, não tiveram alterações nas enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante. Porém a combinação das condições abióticas levou a um aumento na enzima glutathione transferase (LI et al., 2020). Um aumento da abundância da enzima malato desidrogenase atua como um agente regulador da homeostase redox das organelas, reduzindo a respiração foliar, fotorrespiração e fornecendo uma capacidade de crescimento à planta (TOMAZ et al., 2010). No ciclo do ácido tricarboxílico aqui estudado (seção 4.2.4.), foram observadas algumas proteoformas da enzima malato desidrogenase, e sua abundância relativamente superior nos tratamentos de atmosfera enriquecida por CO₂.

Portanto, apesar de não haver variações estatísticas significantes em todas as proteoformas estudadas, os resultados sugerem que as mudas de *Eucalyptus* tiveram seu metabolismo antioxidante afetado pelo tratamento de CO₂, sendo capaz de provavelmente evitar danos provenientes das EROs e ainda promover a capacidade de crescimento da planta sob tais condições. De todo modo, é totalmente esperado que o cultivo de plantas em atmosfera enriquecida com CO₂ provoque alterações no metabolismo de plantas. No entanto, não se sabe a concentração ideal para a indução desse estresse nas plantas. Com isso, os resultados aqui apresentados sugerem uma

resposta das plantas em seu metabolismo antioxidante, porém a concentração de CO₂ estudada ou a falta de mais estímulos não alterou significativamente a abundância de todas as proteoformas estudadas.

4.2.4. O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), também conhecido como ciclo de Krebs, é um componente crucial para o processo de respiração de todos os seres vivos. O TCA é composto por um conjunto de 9 enzimas presentes na matriz mitocondrial que possuem a função de metabolizar o carbono orgânico (NAKASAKI et al., 1985). Os produtos da respiração, o ATP (adenosina trifosfato), a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e o nucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂) no ciclo do TCA, podem ser utilizados como reguladores deste metabolismo (ZHOU et al., 2009).

Para entender a resposta das enzimas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico, foram utilizadas amostras de caule de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* submetidas ao tratamento controle (420ppm) e concentração elevada (680ppm) de CO₂ atmosférico. Foram identificadas todas as enzimas responsáveis pelo ciclo do ácido tricarboxílico no proteoma de caule das espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas. A abundância relativa das proteoformas de cada enzima foi plotada de modo a comparar os tratamentos de CO₂ (Figura 6).

A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à abundância relativa das enzimas analisadas. No entanto, foi possível observar um leve aumento na expressão das proteoformas da enzima malato desidrogenase (MDH) em ambas as espécies (Tabela 2). A ausência da enzima MDH no ciclo pode afetar diretamente a taxa de respiração, assimilação de carbono e o crescimento dos organismos (TOMAZ et al., 2010). Por outro lado, a expressão da enzima fumarase pareceu cair em ambas as espécies no tratamento de CO₂ utilizado (Tabela 2). Segundo Dyson et al. (2016), a fumarase tem um papel essencial na aclimação das plantas. Além disso, todas as demais enzimas presentes no TCA aqui apresentadas mostraram ter um comportamento antagônico entre as espécies.

Os resultados sugerem que a concentração de CO₂ empregada para o tratamento pode não ter sido o suficiente para a indução de respostas estatisticamente significativas e/ou, as espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas além de expressarem comportamentos diferentes, podem não ter seu ciclo TCA significativamente alterado pela concentração de CO₂ atmosférico.

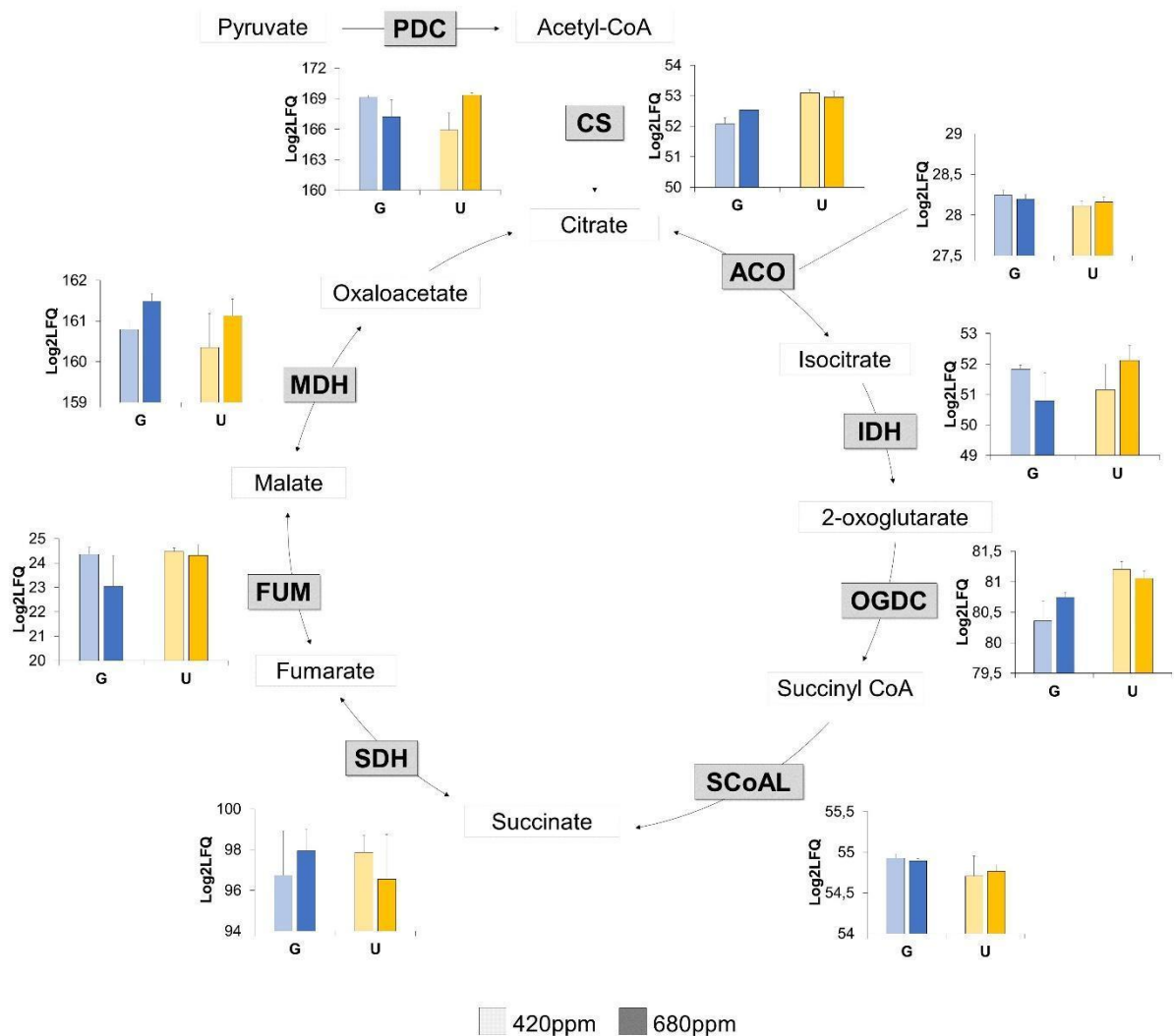


Figura 6. Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a abundância relativa das proteoformas identificadas em caules de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentrações controladas de CO₂ atmosférico (420 ppm e 680 ppm). (PDC - Pyruvatedehydrogenase, CS - Citratesynthase, ACO - Aconitase, IDH - Isocitratedehydrogenase, OGDC - Oxoglutaratedehydrogenase, SCS - SuccinylCoAsynthetase, SDH - Succinatedehydrogenase, FUM- Fumarase, MDH - Malatedehydrogenase).

Tabela 2. Proteoformas envolvidas no Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) identificadas na análise de proteômica exploratória em plantas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Os valores de abundância estão representados em LFQ na escala log2.

Sigla	Enzima	Acessos	420 ppm		680 ppm	
			E. grandis	E. urophylla	E. grandis	E. urophylla
CSY	citrate synthase	Eucgr.G03412.1	27,431	27,512	27,546	27,460
		Eucgr.A01955.2	24,644	25,011	25,542	25,491
ACO	aconitase	Eucgr.I02307.2	28,242	28,194	28,112	28,158
IDH	isocitrate dehydrogenase	Eucgr.F02901.2	28,291	28,312	28,442	28,283
		Eucgr.A00348.1	23,527	22,477	22,716	23,833
ODC	oxoglutarate dehydrogenase complex	Eucgr.G01375.1	27,653	27,685	27,660	27,596
		Eucgr.A01129.1	28,060	28,048	28,001	27,972
		Eucgr.A01955.2	24,644	25,011	25,542	25,491
SCoAL	succinyl-CoA ligase	Eucgr.H00143.1	27,578	27,459	27,630	27,404
		Eucgr.J00864.1	27,352	27,433	27,078	27,360
SDH	succinate dehydrogenase	Eucgr.B00344.1	24,030	23,711	23,206	22,715
		Eucgr.I02452.1	27,054	27,347	27,009	27,312
		Eucgr.J00347.1	23,647	24,799	23,501	24,976
		Eucgr.J00592.1	22,016	22,081	24,159	21,552
FUM	fumarase	Eucgr.H01081.1	24,355	23,027	24,475	24,305
		Eucgr.B00511.2	23,047	23,084	22,037	22,776
		Eucgr.H02358.1	26,511	26,576	26,884	26,669
MDH	malate dehydrogenase	Eucgr.K02475.2	25,646	25,795	25,213	25,722
		Eucgr.H03047.1	30,325	30,429	30,441	30,352
		Eucgr.F03251.1	28,502	28,710	28,741	28,723
		Eucgr.F01209.1	26,767	26,899	27,029	26,882
		Eucgr.G03412.1	27,431	27,512	27,546	27,460
ME	malic enzyme	Eucgr.E01713.1	26,156	26,113	26,108	26,137
		Eucgr.D02251.1	26,687	26,740	26,978	26,855
		Eucgr.B03379.1	26,879	26,472	26,604	26,806
PDC	pyruvate dehydrogenase complex	Eucgr.E01069.2	22,841	22,860	21,787	22,980
		Eucgr.F02506.1	27,226	26,882	27,050	27,240
		Eucgr.J01028.1	22,264	20,909	21,760	21,917
		Eucgr.G02332.1	21,135	21,074	20,733	21,232
		Eucgr.F04134.1	22,611	23,063	21,916	23,087
		Eucgr.F03161.3	26,140	25,935	26,063	26,098

4.3. Alterações no proteoma de seiva frente ao estímulo de CO₂

Com o intuito de estudar as alterações no proteoma de seiva das espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* frente ao estímulo de CO₂, as mudas foram cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ e o proteoma da seiva foi analisado. Foram identificadas 146 proteínas não-redundantes de origem extracelular, as quais são compostas por proteínas que possuem peptídeos sinalizadores, proteínas descritas como da matriz extracelular ou do apoplasto das plantas aqui estudadas.

Para a caracterização de respostas sistêmicas, a proteômica vascular foi conduzida de maneira semelhante às amostras de caule previamente descritas, onde foram realizados testes pareados entre os tratamentos de CO₂ (420 e 680 ppm) (Figura 7). Com isso, foram destacadas as proteínas que foram mais e menos abundantes de acordo com os critérios de fold-change > 1 (2x) e o valor do teste t significativo a 5% de confiabilidade ($p < 0.05$). Foram destacadas 6 proteínas ‘up-regulated’ para a espécie *E. grandis* e 4 para a espécie *E. urophylla*. Desse mesmo modo, 12 proteínas foram ‘down-regulated’ para *E. grandis* e somente 1 atribuída a *E. urophylla*. Nenhuma proteína foi diferencialmente expressa em ambas as espécies concomitantemente (Tabela 3).

Os acessos proteicos foram submetidos ao banco de dados UniProtKB para a atribuição de descrição e função biológica (Tabela 3). Não foi possível atribuir uma descrição conhecida para as proteínas Eucgr.D00500.2 e Eucgr.F00184.2 destacadas em *E. grandis*. Contudo, as proteínas destacadas em *E. grandis* aparentam ser principalmente envolvidas em processos de proteólise e metabolismos de carboidratos, com suas funções desempenhadas principalmente na parede celular.

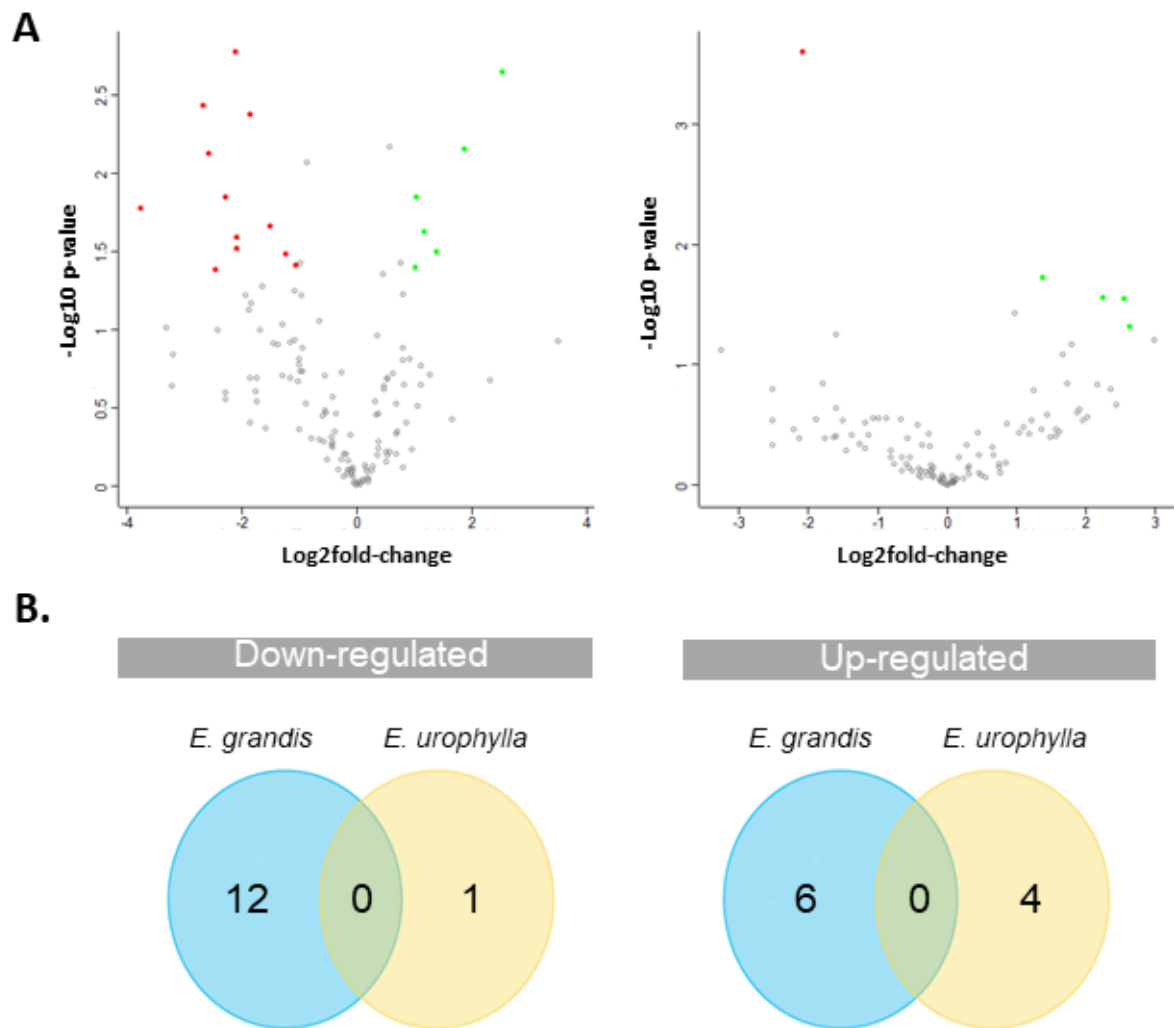


Figura 7. Proteínas diferencialmente abundantes na seiva nas espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica (420 ppm) e alta concentração de CO₂ (680 ppm). **(A)** Volcanoplot (proteínas destacadas em vermelho são down-regulated e proteínas destacadas em verde são up-regulated). **(B)** Diagrama de Venn aprontando as proteínas diferencialmente reguladas dentro de cada espécie.

A proteína Eucgr.A00780.1 (mannan endo-1,4-beta-mannosidase) é uma proteína típica de parede celular e tem como papel diversas funções na modificação da parede celular durante o desenvolvimento da planta (WITZEL et al., 2011; ZHANG et al., 2008). A presença desta e de outras hidrolases mostra uma grande quantidade de glicoproteínas no apoplasto das plantas (DIETZ et al., 2000). Por sua vez, a

proteína Eucgr.B03677.1 (AbfB domain-containing protein) está relacionada ao processo metabólico de arabinose, estritamente relacionada à síntese e integração de polissacarídeos na parede celular durante o crescimento da planta (COSGROVE, 2005). As expansinas (Eucgr.E00357.1) também são proteínas modificadoras de parede celular ativas durante alguns processos fisiológicos e de desenvolvimento (NARVÁEZ-BARRAGÁN et al., 2022). Além disso, através de outras proteínas sinalizadoras de membrana, as plantas podem desencadear diversas sinalizações intracelulares, induzindo respostas de defesa e reforço da parede celular, contribuindo para vários fenótipos de infecção, nos quais as expansinas também podem estar envolvidas (NARVÁEZ-BARRAGÁN et al., 2022). Por fim, proteínas do tipo leguminas são uma família de proteinases geralmente localizadas no vacúolo ou na parede celular. Estas proteínas vão agir principalmente na mobilização de outras proteínas durante o processo de crescimento das plantas (MUNTZ et al., 2002).

Tabela 3. Proteínas diferencialmente reguladas identificadas no proteoma de seiva das espécies de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*.

Acessos ¹	Descrição ²	Processo Biológico ³	420ppm ⁴	680ppm ⁵
<i>Eucalyptus grandis</i>				
<i>Up-regulated</i>				
Eucgr.A00780.1	mannan endo-1,4-beta-mannosidase	organicsubstance metabolicprocess	21,503	22,660
Eucgr.B03677.1	AbfBdomain-containingprotein	L-arabinose metabolicprocess	27,515	28,535
Eucgr.D00500.2	Uncharacterizedprote in	proteolysis	22,389	24,251
Eucgr.E00357.1	Expansin-like B1	anatomicalstructur emorphogenesis	20,185	21,200
Eucgr.F00184.2	Uncharacterizedprote in	proteolysis	20,302	22,823
Eucgr.J03190.1	Legumain	proteolysis involved in protein catabolic process	25,092	26,466
<i>Down-Regulated</i>				
Eucgr.B02122.2	Barwindomain-containingprotein	defense response	21,358	19,504
Eucgr.E00557.1	Thaumatococcus-like protein	defense response	28,073	25,792

Eucgr.E00560.1	Thaumatococcus-like protein	defense response	28,610	26,511
Eucgr.E00814.1	Dirigent protein	phenylpropanoid biosynthetic process	21,464	19,950
Eucgr.E01382.1	Thaumatococcus-like protein	defense response	23,016	20,346
Eucgr.E02736.1	Peptidase C1A papain C-terminal	proteolysis involved in protein catabolic process	25,057	21,289
Eucgr.F02349.1	Alpha-amylase	sucrose catabolic process	24,255	21,682
Eucgr.G01336.1	Plant basic secretory protein (BSP)	unknown	25,319	24,258
Eucgr.H00325.1	Chitin-binding type-1	carbohydrate metabolic process	26,293	24,204
Eucgr.K02326.1	Uncharacterized protein	endopeptidase inhibitor	24,507	22,036
Eucgr.K03382.1	Peptidase A1	proteolysis	22,392	20,269
Eucgr.L00941.1	unknown	unknown	24,005	22,769

Eucalyptus urophylla

Up-regulated

Eucgr.H00669.5	Alpha-galactosidase	carbohydrate metabolic process	20,085	22,638
Eucgr.K02425.1	Carboxypeptidase	proteolysis	20,391	21,759
Eucgr.H01399.1	Carboxypeptidase	proteolysis	18,789	21,035
Eucgr.E00105.1	Pectate lyase superfamily protein	carbohydrate metabolic process	21,186	23,819

Down-Regulated

Eucgr.A00682.1	Peroxidase	response to oxidative stress	26,557	24,475
----------------	------------	------------------------------	--------	--------

¹Acesso proteico disponível no banco de dados Phytozome, ²Descrição da proteína de acordo com o banco de dados UniProt, ³Função biológica de acordo com o banco de dados UniProt, ⁴Log₂ do LFQ referente ao tratamento de 420ppm de CO₂, ⁵Log₂ do LFQ referente ao tratamento de 680ppm de CO₂.

A espécie *E. urophylla* apresentou no seu proteoma abundantemente regulado não somente proteínas pertencentes ao metabolismo de carboidratos de parede celular, mas também proteínas envolvidas na proteólise geralmente localizadas no xilema de plantas. A alpha-galactosidase (Eucgr.H00669.5) é uma enzima envolvida no metabolismo de polissacarídeos, relacionada principalmente na degradação da parede celular primária e remodelação da parede celular (ROSS et al., 1994; VAN DEN ENDE et al., 2004). Uma vez que a parede celular primária deve ser degradada para a formação da parede secundária (DEMURA et al., 2002), a alpha-galactosidase age em conjunto com outras enzimas e hemicelulases (MINIC et al., 2008)

promovendo o suporte necessário para o xilema exercer sua função (BOYCE et al., 2004). Ademais, a pectina também é um componente crucial na formação da parede celular (VORAGEN et al., 2009). Por consequência, a pectatylase (Eucgr.E00106.1) desempenha inúmeros processos biológicos, como a expansão celular (COSGROVE, 2000), adesão intercelular (Knox, 1992), entre outras (FISCHER E BENNETT, 1991; WEN et al., 1999; ROBERTS et al., 2000). Por fim, as proteínas relacionadas a proteólise (pepsinas, subtilisinas, peptidases) constituem a matriz extracelular de plantas e também já identificadas e descritas neste manuscrito, em amostras de *Eucalyptus*. Além da manutenção natural que a presença destas proteínas provém ao xilema, através da degradação de proteínas danificadas, estas proteínas vão constituir um sistema de defesa inato no aparato vascular de plantas (RODRÍGUEZ-CELMA et al., 2016).

Os processos metabólicos que envolvem as proteínas aqui descritas sugerem pertencer à maquinaria constitutiva da seiva e/ou matriz extracelular e de apoplasto das mudas de *Eucalyptus*. Entretanto, algumas proteoformas foram altamente expressas em condições de CO₂ elevados. Tais proteoformas, apesar de participarem basicamente das mesmas vias metabólicas ou exercerem funções semelhantes à aquelas identificadas no experimento controle, podem ser utilizadas como moléculas sinalizadoras presentes na seiva. As proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos podem indicar e sinalizar a resposta imediata da planta ao ambiente de CO₂ elevado (KUMAR et al., 2020). As proteínas envolvidas no metabolismo de parede celular, indicam o caminho de comunicação da planta para seu desenvolvimento e crescimento (NARVÁEZ-BARRAGÁN et al., 2022; VORAGEN et al., 2009). Por sua vez, as proteínas envolvidas na defesa sistêmica, vão ter um papel de regular a homeostase do tecido vascular bem como promover condições ideais para o crescimento da planta (SHABAB et al., 2008; XIA et al., 2004). Acredita-se que estratégias de engenharia genética podem ser utilizadas visando tais proteoformas. Estudos no ramo do melhoramento genético de plantas podem ser desenvolvidos para estimular a expressão dos genes responsáveis pela regulação das proteoformas aqui descritas. Neste sentido, a planta geneticamente modificada, juntamente com um ambiente favorável para o crescimento da planta, pode levar a um aumento da

biomassa de *Eucalyptus*, gerando um possível organismo com características agronômicas interessantes para o setor florestal.

4.4. Quantificação de açúcares na seiva das espécies de *Eucalyptus*

Foi realizada a quantificação dos açúcares glicose, frutose, sacarose e rafinose na seiva das espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, com o objetivo de avaliar a resposta e intensidade da resposta das plantas frente ao estímulo de CO₂. A análise dos açúcares presentes na seiva é uma importante ferramenta para entender a resposta das plantas ao estresse abiótico, como a exposição ao CO₂ elevado.

Os resultados obtidos nesta pesquisa podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta das espécies de eucalipto ao aumento de CO₂. Foi observado um aumento em todos os açúcares quantificados presentes na seiva quando exposta ao tratamento de CO₂ (680 ppm), para as duas espécies aqui estudadas (Figura 8). Somente a espécie *E. urophylla* obteve uma diferença estatística na quantificação de sacarose, entretanto, a tendência do aumento de todos os açúcares nas espécies sugere uma possível alteração no metabolismo das plantas em resposta ao estímulo de CO₂ elevado.

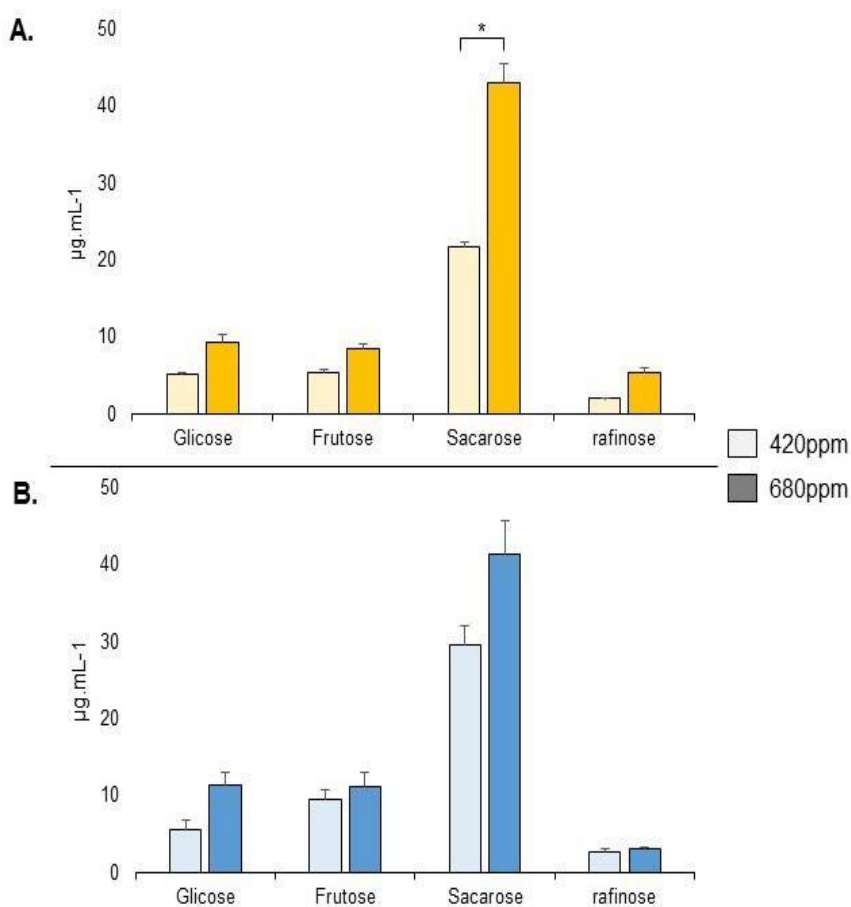


Figura 8. Quantificação de açúcares na seiva das espécies de *Eucalyptus* cultivadas em atmosfera enriquecida por CO₂. **(A)**Quantidade de açúcares presentes na seiva de *Eucalyptus urophylla*. **(B)** Quantidade de açúcares presentes na seiva de *Eucalyptus grandis*. * representa variação estatisticamente significativa (P<0.05).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise funcional das proteínas identificadas no proteoma total de caule das espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas, revelou proteínas envolvidas em mecanismos celulares, vias metabólicas, respostas a estresses e proteínas envolvidas com o desenvolvimento de plantas. Os resultados indicaram que as espécies apresentaram dissimilaridade em relação à regulação proteômica em resposta ao CO₂ atmosférico, com a espécie *E. urophylla* apresentando um maior número de proteínas diferencialmente expressas após o estímulo ambiental. A análise da via de biossíntese

de lignina e o ciclo do ácido tricarboxílico não indicou disparidade entre os tratamentos de CO₂. Os dados correspondentes às proteoformas da sacarose sintase não retornou diferenças estatísticas, no entanto, a abundância observada desta enzima sugeriu uma tendência de diminuição no caule de plantas submetidas à atmosfera enriquecida com CO₂. Além disso, de acordo com os resultados obtidos das proteínas envolvidas no metabolismo antioxidante, também foi possível identificar uma tendência no aumento da abundância relativa dessas proteoformas nas duas espécies quando submetidas ao tratamento de CO₂ atmosférico. O aumento no metabolismo de carboidratos no proteoma vascular indica um fornecimento de energia para manter a homeostase energética da planta. Além disso, a presença de enzimas envolvidas na respiração celular sugere um estímulo da glicólise para aumentar a disponibilidade de carboidratos na condição de CO₂ atmosférico aumentado. O aumento do metabolismo de açúcares induzido pelo CO₂ também estimula a expressão de enzimas fotorrespiratórias, que estão envolvidas na adaptação da planta ao estímulo externo para gerar energia e sustentar o crescimento. Os resultados sugerem uma resposta sistêmica das plantas ao estímulo externo de CO₂, onde proteínas envolvidas no crescimento e desenvolvimento estão interconectadas com proteínas relacionadas a respostas de estresse e metabolismos secundários. Isso sugere uma reorganização do proteoma em resposta ao aumento de CO₂, fornecendo uma compreensão abrangente dos mecanismos moleculares subjacentes às respostas das plantas a concentrações elevadas de CO₂.

As análises do proteoma de seiva em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* indicou um aumento na abundância relativa de proteínas envolvidas em processos metabólicos principalmente relacionados ao metabolismo de substâncias orgânicas e proteólises na concentração de 680ppm de CO₂. Além disso, as proteínas principalmente envolvidas em respostas de defesa celular e estresse oxidativo tiveram sua expressão reduzida neste mesmo tratamento. Contudo, foi observado um aumento nos açúcares presentes na seiva das espécies estudadas quando expostas ao CO₂ elevado, sugerindo uma possível alteração no metabolismo das plantas em resposta ao estímulo de CO₂. As proteínas identificadas nas mudas de *Eucalyptus* cultivadas em condições de CO₂ elevado sugerem seu envolvimento nos processos metabólicos da seiva, matriz extracelular e apoplasto. Algumas dessas proteoformas

são altamente expressas em resposta ao CO₂ elevado e podem atuar como moléculas sinalizadoras na seiva. As proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos indicam a resposta imediata da planta ao CO₂ elevado, enquanto as envolvidas no metabolismo da parede celular desempenham um papel na comunicação e no crescimento da planta. As proteínas associadas à defesa sistêmica regulam a homeostase vascular e favorecem o crescimento. Estratégias de engenharia genética podem ser usadas para modular a expressão dessas proteínas, melhorando a resposta das plantas a concentrações mais altas de CO₂ e promovendo um crescimento mais eficiente. Esses resultados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta das espécies de eucalipto ao aumento de CO₂ e fornecer informações úteis para o manejo e cultivo dessas espécies em ambientes com altos níveis de dióxido de carbono.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELGAWAD, Hamada et al. Climate extreme effects on the chemical composition of temperate grassland species under ambient and elevated CO₂: a comparison of fructan and non-fructan accumulators. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92044, 2014.
- AGARWAL, Rakhi; BURLEY, Stephen K.; SWAMINATHAN, Subramanyam. Structural analysis of a ternary complex of allantoate amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. **Journal of molecular biology**, v. 368, n. 2, p. 450-463, 2007.
- Ainsworth, E.A.; Rogers, A.; Vodkin, L.O.; Walter, A.; Schurr, U. The Effects of Elevated CO₂ Concentration on Soybean Gene Expression. An Analysis of Growing and Mature Leaves. **Plant Physiol.** 2006, 142, 135–147.
- ALTHOFF, Steven M.; STEVENS, Scott W.; WISE, Jo Ann. The Srp54 GTPase is essential for protein export in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*, v. 14, n. 12, p. 7839-7854, 1994.
- ARCE, G. L. A. F.; CARVALHO JR, J. A.; NASCIMENTO, Luiz Fernando Costa. A time series sequestration and storage model of atmospheric carbon dioxide. **Ecological modelling**, v. 272, p. 59-67, 2014.
- ARMENTEROS, J. J. A.; SØNDERBY, C. K.; SØNDERBY, S. K.; NIELSEN, H.; WINTHER, O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, p. 3387–3395, 2017.
- ARMENTEROS, J. J. A.; SALVATORE, M.; EMANUELSSON, O.; WINTHER, O.; HEIJNE, G. V.; ELOFSSON, A.; NIELSEN, H. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. **Life Science Alliance**, vol 2 (5), p. 1-14, 2019.
- AOYAMA, Shoki et al. Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 2, p. 293-305, 2014.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BETHMANN, Stephanie et al. The zeaxanthin epoxidase is degraded along with the D1 protein during photoinhibition of photosystem II. **Plant Direct**, v. 3, n. 11, p. e00185, 2019.

- BIELECKI, S.; SOMIARI, R. I. Enhancement of invertase activity in organic media for oligosaccharide synthesis. In: Progress in Biotechnology. **Elsevier**, 1998. p. 423-428.
- BRETON, Christelle et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 29R-37R, 2006.
- BORK, Peer; KOONIN, Eugene V. A new family of carbon-nitrogen hydrolases. **Protein Science**, v. 3, n. 8, p. 1344-1346, 1994.
- BOYCE, C. Kevin et al. Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 50, p. 17555-17558, 2004.
- CANTALAPIEDRA, C. P.; HERNANDEZ-PLAZA, A.; LETUNIC, I.; PEERBORK HUERTACEPAS, J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. **Molecular Biology and Evolution**, p. msab293, 2021.
- CAROCHA, V.; HEFER, C.; CASSAN-WANG H.; FEVEREIRO, P.; ALEXANDER, A.; PAIVA, J. A. P.; GRIMA-PETTENATI, J. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. **New Phytol.**, v. 4, p. 1297–1313, 2015.
- CHEN, T.; ZHANG, L.; SHANG, H.; LIU, S.; PENG, J.; GONG, W.; SHI, Y.; ZHANG, S.; LI, J.; GONG, J. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of cotton roots and leaves reveals pathways associated with salt stress. **PLoS ONE** 2016, 11, e0148487.
- CHEN, Yongkun et al. The role of the late embryogenesis-abundant (LEA) protein family in development and the abiotic stress response: a comprehensive expression analysis of potato (*Solanum tuberosum*). **Genes**, v. 10, n. 2, p. 148, 2019.
- COSGROVE DJ: Growth of the plant cell wall. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6:850-861. 2005.
- COSGROVE, Daniel J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1-2, p. 109-124, 2000.
- DEMURA, Taku et al. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15794-15799, 2002.
- DIMARIO, Robert J. et al. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. **Molecular plant**, v. 10, n. 1, p. 30-46, 2017.

- DIETZ, Karl-Josef et al. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 346, p. 937-944, 2000.
- DUSENGE, Mirindi Eric; DUARTE, André Galvao; WAY, Danielle A. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. **New Phytologist**, v. 221, n. 1, p. 32-49, 2019.
- DUNN, Michael F. Allosteric regulation of substrate channeling and catalysis in the tryptophan synthase holoenzyme complex. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 519, n. 2, p. 154-166, 2012.
- DYSON B. C.; MILLER M. A. E.; FEIL, R.; RATTRAY, N.; BOWSER C. G.; GOODACRE, R.; LUNN, J. E.; JOHNSON, G. N. FUM2, a Cytosolic Fumarase, Is Essential for Acclimation to Low Temperature in Arabidopsis thaliana, **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 118–127, 2016.
- EVERT, R. DICOTYLEDONS. IN: BEHNKE, H.D., SJOLUND, R.D. (Eds.), Sieve Elements. **Springer**, p. 103–137, 1990.
- FERNANDEZ-GARCIA, N.; HERNANDEZ, M.; CASADO-VELA, J.; BRU, R.; ELORTZA, F.; HEDDEN, P e OLMOS, E. Changes to the proteome and targeted metabolites of xylem sap in Brassica oleracea in response to salt stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 821–836, 2011.
- FINNEGAN, E. J.; KOVAC, K. A. Plant DNA methyltransferases. **Plant Gene Silencing**, p. 69-81, 2000.
- FISCHER, Robert L.; BENNETT, Alan B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 675-703, 1991.
- FUX, Liat et al. Heparanase: busy at the cell surface. **Trends in biochemical sciences**, v. 34, n. 10, p. 511-519, 2009.
- GERMAN, M. A., DAI, N., MATSEVITZ, T., HANAEL, R., PETREIKOV, M., BERNSTEIN, N., et al. (2003). Suppression of fructokinase encoded by LeFRK2 in tomato stem inhibits growth and causes wilting of young leaves. **Plant J.** 34, 837–846.
- GILLESPIE, K.M., ROGERS, A., AND AINSWORTH, E.A., 2011. Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (Glycine max). **Journal of Experimental Botany**. 62, 2667.

- GRIFFITH, Owen W.; BRIDGES, Richard J.; MEISTER, Alton. Evidence that the gamma-glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione: effects of amino acids and selective inhibition of enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 11, p. 5405-5408, 1978.
- GOODSTEIN, D. M., SHU, S., HOWSON, R., ..., and ROKHSAR, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, **Nucleic Acids Res.** 40 (D1): D1178-D1186.
- Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, Noctor G (2013a) Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. **Antioxid Redox Signal** 18: 2106–2121.
- HANSEN, Sara Fasmer et al. Plant glycosyltransferases beyond CAZy: a perspective on DUF families. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 59, 2012.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. INTECH Open Access Publisher, 2012, p. 169–205.
- HAVAUX, Michel; DALL'OSTO, Luca; BASSI, Roberto. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in Arabidopsis leaves and functions independent of binding to PSII antennae. **Plant physiology**, v. 145, n. 4, p. 1506-1520, 2007.
- HYDE, C. C. et al. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from Salmonella typhimurium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17857-17871, 1988.
- IPCC - Summary for Policymakers [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, M. Tignor, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem (eds.)]. In: **Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability**. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. In Press, 2022.
- JAHNS, Peter; HOLZWARTH, Alfred R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 182-193, 2012.

- JIN, Yun et al. A structural and functional study on the 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase (IspD) from *Bacillus subtilis*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36379, 2016.
- JIANG, Mingkai et al. The fate of carbon in a mature forest under carbon dioxide enrichment. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 227-231, 2020.
- KANAYAMA, Y., GRANOT, D., DAI, N., PETREIKOV, M., SCHAFFER, A., POWELL, A., et al. (1998). Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. **Plant Physiol.** 117, 85–90.
- Kasper, K., Abreu, I. N., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Herrfurth, C., 206 Ischebeck, T., Janz, D., ... Polle, A. (2022). Multi-omics analysis of xylem sap uncovers dynamic modulation of poplar defenses by ammonium and nitrate. **The Plant Journal**, 111, 282–303. Doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.15802>. 210.
- KHMELENINA, Valentina N.; ROZOVA, Olga N.; TROTSENKO, Yuri A. Characterization of the recombinant pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinases from *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z and *Methylococcus capsulatus* Bath. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 2011. p. 1-14.
- KNOX, J. Paul. Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. **The Plant Journal**, v. 2, n. 2, p. 137-141, 1992.
- Kolla, V.A., Vavasseur, A. and Raghavendra, A.S.(2007) Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. **Planta**, 225, 1421–1429.
- KUMAR, Rajiv et al. Elevated CO₂ and temperature influence key proteins and metabolites associated with photosynthesis, antioxidant and carbon metabolism in *Picea koraiensis*. **Journal of proteomics**, v. 219, p. 103755, 2020.
- LAW, Angus Ho Yin; CHOW, Cheung-Ming; JIANG, Liwen. Secretory carrier membrane proteins. **Protoplasma**, v. 249, p. 269-283, 2012.
- LECHNER, Bettina et al. The N-terminal TOG domain of *Arabidopsis* MOR1 modulates affinity for microtubule polymers. **Journal of cell science**, v. 125, n. 20, p. 4812-4821, 2012.
- LI, B., FENG, Y., ZONG, Y., ZHANG, D., HAO, X., & LI, P. (2020). Elevated CO₂-induced changes in photosynthesis, antioxidant enzymes and signal transduction enzyme of soybean under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 154, 105-114.
- LIU, Y., ZHANG, Y., AND CAO, B. (2016). Effects of high atmospheric CO₂ concentrations on activities of sucrose metabolism-related enzymes in *Lycium barbarum* fruit. **J. Northwest For. Univ.** 31, 44–47.

- LIU, Jie-Xia et al. Elevated CO₂ induces alteration in lignin accumulation in celery (*Apium graveolens* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 310-319, 2018.
- MA, Y., REDDY, V. R., DEVI, M. J., SONG, L., AND CAO, B. (2019). De novo characterization of the Goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit transcriptome and analysis of candidate genes involved in sugar metabolism under different CO₂ concentrations. **Tree Physiol.** 39, 1032–1045.
- MATROS, A., AMME, S., KETTIG, B., BUCK-SORLIN, G.H., SONNEWALD, U., AND MOCK, H.P., 2006. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. **Plant Cell Environ.** 29, 126-137.
- MATTSON, W.J., JULKUNEN-TIITTO, R., AND HERMS, D.A., 2005. CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models? **Oikos**. 111, 486 337-347.
- MAZUR, Barbara J.; CHUI, Chok-Fun. Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose bis-phosphate carboxylase-oxygenase from tobacco. **Nucleic acids research**, v. 13, n. 7, p. 2373-2386, 1985.
- MENEZES-SILVA, P. E.; LORAM-LOURENÇO, L.; ALVES, R. D. F. B; SOUSA, L. F.; ALMEIDA, S. E. D. S.; FARNESE, F. S. Different ways to die in a changing world: consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. **Ecol Evol**, v. 9, p.11979–11999, 2019.
- MEYER, Yves et al. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 589-600, 2008.
- MHAMDI, Amna; NOCTOR, Graham. High CO₂ primes plant biotic stress defences through redox-linked pathways. **Plant Physiology**, v. 172, n. 2, p. 929-942, 2016.
- MINIC, Zoran. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, v. 227, n. 4, p. 723-740, 2008.
- MODJTAHEDI, Nazanine et al. Mitochondrial proteins containing coiled-coil-helix-coiled-coil-helix (CHCH) domains in health and disease. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 245-260, 2016.
- MÜNTZ, Klaus; SHUTOV, Andrei D. Legumains and their functions in plants. **Trends in plant science**, v. 7, n. 8, p. 340-344, 2002.

- NAKASAKI, K., SASAKI, M., SHODA, M., & KUBOTA, H. (1985). Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate. **Applied and Environmental Microbiology**, 49(1), 37-41.
- NARVÁEZ-BARRAGÁN, Delia A. et al. Mechanisms of plant cell wall surveillance in response to pathogens, cell wall-derived ligands and the effect of expansins to infection resistance or susceptibility. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.
- NIEHAUS, Thomas D. et al. Discovery of a widespread prokaryotic 5-oxoprolinase that was hiding in plain sight. **Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 39, p. 16360-16367, 2017.
- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration - Earth System Research Laboratory, **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**, 2023. Disponível em: <<https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>> Acesso em: 02 abr. 2023.
- NOBEL, P.S., AND HARTSOCK, T.L., 1986. Short-term and Long-term responses of crassulacean acid metabolism plants to elevated CO₂. **Plant Physiology**. 82, 495-604.
- OBUDULU, Ogonna et al. A multi-omics approach reveals function of Secretory Carrier-Associated Membrane Proteins in wood formation of Populus trees. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-18, 2018.
- OHKAMA-OHTSU, Naoko et al. A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 148, n. 3, p. 1603-1613, 2008.
- ORLOWSKI, Marian; MEISTER, Alton. The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 67, n. 3, p. 1248-1255, 1970.
- PATEL, Shalaka et al. Arabidopsis WPP-domain proteins are developmentally associated with the nuclear envelope and promote cell division. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3260-3273, 2004.
- PATEL, N., Mohd-Radzman, N. A., Corcilius, L., Crossett, B., Connolly, A., Cordwell, S. J., Ivanovici, A., ... Djordjevic, M. A. (2018). Diverse Peptide Hormones Affecting Root Growth Identified in the Medicago truncatula Secreted Peptidome. **Molecular & Cellular Proteomics** 17.1, 160–174. Doi: 10.1074/mcp.RA117.000168.
- PAGLIUSO, D.; GRANDIS, A.; IGARASHI, E. S.; LAM, E. e BUCKERIDGE, M. S. Correlation of Apiose Levels and Growth Rates in Duckweeds. **Front. Chem.**, 6:291, 2018.

- PAULOSE, Bibin et al. A γ -glutamyl cyclotransferase protects Arabidopsis plants from heavy metal toxicity by recycling glutamate to maintain glutathione homeostasis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 11, p. 4580-4595, 2013.
- PREGER, Valeria et al. Auxin-responsive genes AIR12 code for a new family of plasma membrane b-type cytochromes specific to flowering plants. **Plant Physiology**, v. 150, n. 2, p. 606-620, 2009.
- RABONI, Samanta et al. Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes: Catalysis, Conformation and Genomics. In: **COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS II Chemistry and Biology**. Elsevier, 2010. p. 273-350.
- RACHEL, F., e GAIL, T., 2010. Contrasting effects of elevated CO₂ on the root and shoot growth of four native herbs commonly found in chalk grassland. **New Phytologist**. 125, 855-866.
- RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J. [13] Evolutionary families of metallopeptidases. In: **Methods in enzymology**. **Academic Press**, 1995. p. 183-228.
- RODRÍGUEZ-CELMA, Jorge et al. Plant fluid proteomics: delving into the xylem sap, phloem sap and apoplastic fluid proteomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 8, p. 991-1002, 2016.
- ROBERTS, Jeremy A. et al. Cell separation processes in plants—models, mechanisms and manipulation. **Annals of Botany**, v. 86, n. 2, p. 223-235, 2000.
- ROSS, Gavin S. et al. Apple [beta]-galactosidase (activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone). **Plant Physiology**, v. 106, n. 2, p. 521-528, 1994.
- RUIZ-VERA, U.M., SIEBERS, M., GRAY, S.B., DRAG, D.W., ROSENTHAL, D.M., KIMBALL, B.A., ORT, D.R, BERNACCHI, C.J., 2013. Global warming can negate the expected CO₂ stimulation in photosynthesis and productivity for soybean grown in the Midwestern United States. **Plant Physiology**. 162, 410-423.
- SCHAFFER, A. A., AND PETREIKOV, M. (1997). Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. **Physiol. Plant**. 101, 800–806.
- SCHEPPER, V.; DE SWAEF, T.; BAUWERAERTS, I.; STEPPE, K. Phloem transport: **A review of mechanisms and controls**. **J. Exp. Bot.**, 64, 4839–4850, 2013.
- Shi, K., Li, X., Zhang, H., Zhang, G., Liu, Y., Zhou, Y., Xia, X., Chen, Z. and Yu, J. (2015) Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂-induced stomatal movement in tomato. **New Phytol**. 208, 342–353
- SILVEIRA, C. S.; DE OLIVEIRA, L.; TALAMINI, E. Which species perform best in carbon sequestration and storage in planted forests? A review of the potential of

- Pinus and Eucalyptus. **International Forestry Review**, v. 22, n. 4, p. 544-557, 2020.
- Soliman, A., Rampitsch, C., Tambong, J.T., Daayf, F. (2021). Secretome Analysis of *Clavibacter nebraskensis* Strains Treated with Natural Xylem Sap In Vitro Predicts Involvement of Glycosyl Hydrolases and Proteases in Bacterial Aggressiveness. **Proteomes**, 9, 1. Doi: 214 10.3390/proteomes9010001. 215.
- SONG, Kyungyoung et al. An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in *Arabidopsis* root cells. **Plant Physiology**, v. 159, n. 3, p. 1013-1025, 2012.
- SONG, JianBo et al. Uridylation and adenylation of RNAs. **Science China Life Sciences**, v. 58, p. 1057-1066, 2015.
- STEIN O AND GRANOT D (2019) An Overview of Sucrose Synthases in Plants. **Front. Plant Sci.** 10:95.
- TAN, Cun-Mei et al. OsPOP5, a prolyl oligopeptidase family gene from rice confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 20204-20219, 2013.
- TOMAZ, T.; BAGARD, M.; PRACHAROENWATTANA, I.; LINDÉN, P.; LEE C. P.; CARROLL, A. J.; STRÖHER, E.; SMITH, S. M.; GARDESTRÖM, P.; MILLAR A. H. Mitochondrial Malate Dehydrogenase Lowers Leaf Respiration and Alters Photorespiration and Plant Growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1143–1157, 2010.
- TOMAZ, Tiago et al. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 154, n. 3, p. 1143-1157, 2010.
- TRAN, Huong JTT et al. Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11460-11465, 2003.
- TYANOVA, S.; TEMU, T.; COX, J. The MaxQuant computational platform for massspectrometry-based shotgun proteomics. **Nature Protocols**, v. 11, p. 2301-2319, 2016a.
- TYANOVA, S.; TEMU, T.; SINITSYN, P.; CARLSON, A.; HEIN, M. Y.; GEIGER, T.; MANN, M.; COX, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nat Methods**. v. 13, p. 731–740, 2016b.
- VAN DEN ENDE, Wim; DE CONINCK, Barbara; VAN LAERE, André. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense?. **Trends in plant science**, v. 9, n. 11, p. 523-528, 2004.

- VAN OOIJEN, Gerben et al. Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 6, p. 1383-1397, 2008.
- VERMA, Amit K. et al. The expanding world of plant J-domain proteins. **Critical reviews in plant sciences**, v. 38, n. 5-6, p. 382-400, 2019.
- VORAGEN, Alphons GJ et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.
- WASTENEYS, Geoffrey O.; AMBROSE, J. Christian. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 62-71, 2009.
- WERF, Paul Van Der; ORLOWSKI, Marian; MEISTER, Alton. Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the γ -glutamyl cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 12, p. 2982-2985, 1971.
- WEN, Fushi; ZHU, Yanmin; HAWES, Martha C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. **The Plant Cell**, v. 11, n. 6, p. 1129-1140, 1999.
- WITZEL, Katja et al. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. **Plant methods**, v. 7, p. 1-11, 2011.
- XIE, Yunjie et al. SH3P2, an SH3 domain-containing protein that interacts with both Pib and AvrPib, suppresses effector-triggered, Pib-mediated immunity in rice. **Molecular Plant**, v. 15, n. 12, p. 1931-1946, 2022.
- XU, Z., JIANG, Y., AND ZHOU, G., 2015. Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. **Frontiers in Plant Science**. 6,701.
- YAMAZAKI, Tsutomu et al. Endothelin-1 Is Involved in Mechanical Stress-induced Cardiomyocyte Hypertrophy (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 6, p. 3221-3228, 1996.
- YAMAGUCHI, Kenichi; SUBRAMANIAN, Alap R. The plastid ribosomal proteins: identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28466-28482, 2000.
- ZAMEER, Roshan et al. Genome-Wide Characterization of Superoxide Dismutase (SOD) Genes in *Daucus carota*: Novel Insights Into Structure, Expression, and Binding Interaction With Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Under Abiotic Stress Condition. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

- ZHAO, Jian. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein–protein and lipid–protein interactions to hormone signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 1721-1736, 2015.
- ZHANG, Jiangwei et al. Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 11, p. 2979-2990, 2008.
- ZHOU, J., LIU, L., SHI, Z., DU, G., & CHEN, J. (2009). ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. **Biotechnology advances**, 27(1), 94-101.
- ZINTA, G.; ABDELGAWAD, H.; DOMAGALSKA, M. A.; VERGAUWEN, L.; KNAPEN, D.; NIJS, I.; et al. Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels. **Global Change Biol.** v. 20, p. 3670–3685, 2014.
- ZHANG, Xuebin et al. F-Box proteins in plants. **Annu. Plant Rev**, v. 2, p. 307-328, 2019.