

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Efeito da alta temperatura e do enriquecimento por CO₂
em poliploides de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus*
*grandis***

Naiara Scarabeli Zancanari
Engenheira Agrônoma

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Efeito da alta temperatura e do enriquecimento por CO₂
em poliploides de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus*
*grandis***

Discente: Naiara Scarabeli Zancanari

Orientador: Dr. Tiago Santana Balbuena

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

2023

Z27e

Zancanari, Naiara Scarabeli

Efeito da alta temperatura e do enriquecimento por CO₂ em poliploides de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* / Naiara Scarabeli Zancanari. -- , 2023

58 p.

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

1. *Eucalyptus*. 2. Poliploidia. 3. Proteômica. 4. Carbono. 5. Temperatura. 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: EFEITO DA ALTA TEMPERATURA E DO ENRIQUECIMENTO POR CO₂ EM POLIPLOIDES DE *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*

AUTORA: NAIARA SCARABELI ZANCANARI

ORIENTADOR: TIAGO SANTANA BALBUENA

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

Documento assinado digitalmente
 **TIAGO SANTANA BALBUENA**
Data: 18/10/2023 09:12:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Dra. FABIANA REZENDE MUNIZ (Participação Virtual)
Suzano Papel e Celulose S/A / Ribeirão Preto/SP

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA REZENDE MUNIZ**
Data: 30/10/2023 16:52:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Prof. Dr. HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA (Participação Virtual)
Departamento de Botânica / Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Documento assinado digitalmente
 **HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA**
Data: 18/10/2023 11:17:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 16 de outubro de 2023

Documento assinado digitalmente
 **JESUS APARECIDO FERRO**
Data: 19/10/2023 18:06:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL GUARIZ PINHEIRO**
Data: 30/10/2023 11:49:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAIARA SCARABELI ZANCANARI – Nascida em 08 de janeiro de 1992 em Santa fé do Sul – São Paulo. É filha de Edson Carlos Zancanari e Ilaide Scarabeli Zancanari. Em 2012 entrou para o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira - SP, onde teve o primeiro contato com a área melhoramento genético de plantas por meio do exemplo e ensinamentos do Prof. Dr. João Antonio da Costa Andrade no grupo de GMGM. Ainda durante a graduação participou do grupo “Estudo das relações entre a cobertura vegetal e as características edáficas e biológicas do solo”, sob responsabilidade da Prof. Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, que resultou no trabalho de conclusão de curso “Atributos químicos e biológicos de um subsolo exposto quatro anos após inoculação de microrganismos e adição de resíduos no Cerrado”. Durante o período de agosto a dezembro de 2016 foi estagiária na empresa Vilmorin do Brasil onde participou das atividades no programa de melhoramento de hortaliças. No ano seguinte concluiu a graduação e obteve o grau de Engenharia agrônoma e, em agosto ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento e Plantas) na Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal – SP, com auxílio financeiro da CAPES, sob orientação da Prof. Dr^a Fabíola Vitti Môro e co-orientação dos Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro e Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino adotando como linha de pesquisa Anatomia e morfologia de plantas de milho com diferentes números de alelos transgênicos. Em agosto de 2019 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na mesma Universidade, com orientação do Dr. Tiago Santana Balbuena, e bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CNPq, adotando como linha de pesquisa as alterações proteômicas resultantes do efeito da elevada temperatura e do enriquecimento de CO₂ em poliploides de *Eucalyptus*.

DEDICO

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conduzir durante toda essa jornada, pelas oportunidades, suporte e conquistas.

Agradeço aos meus pais, Ilaide Scarabeli Zancanari, Edson Carlos Zancanari, minha irmã Natalia Scarabeli Zancanari, e meu noivo Leonardo Miranda de Souza Granja pelo apoio todos os dias e em todos os momentos, por terem a paciência, e principalmente pelo amor. Sem vocês ao meu lado, esse caminho não teria sido o mesmo.

Ao meu orientador, Tiago Santana Balbuena, agradeço imensamente por ter aceitado esse desafio, por ter confiado na minha capacidade, por sempre estar disponível, e por todos os ensinamentos e contribuições.

A Suzano SA, em especial a Fabiana Muniz, Shinitiro Oda, Leandro Mendes e José Wilacildo de Matos, por disponibilizarem o material de estudo, pelas riquíssimas discussões e interações.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Proteômica, que me acolheram desde o primeiro dia, Amanda Cristina Baldassi, Gabriel Lemes, Felipe Alexsander, Patrícia Sitta e Marina de Lima Nogueira.

Ao Grupo de Estudos em Genética e Melhoramento de Plantas (GEMP) por me proporcionar tantas vivências e crescimento profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias” (UNESP/FCAV) por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

Com muito carinho, aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental e do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) que sempre foram muito presentes.

Aos amigos que fiz durante esses seis anos de UNESP/FCAV que foram imensamente importantes.

Em memória, agradeço muito ao Marcelo Scatolin, pelos momentos de descontração e aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos (142360/2020-1).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de recursos para execução do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A cultura do eucalipto	2
2.2. A poliploidia	4
2.3. Mudanças climáticas.....	7
2.4. A proteômica	9
3. OBJETIVO	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Material genético e tratamentos	10
4.2. Avaliação do crescimento das plantas: número de folhas e área foliar	11
4.3. Avaliação do crescimento das plantas: altura.....	11
4.4. Avaliação do crescimento das plantas: ramificações	12
4.5. Identificação de estresse oxidativo	12
4.6. Análise do proteoma foliar: extração de proteínas.....	12
4.7. Análise do proteoma foliar: preparo da amostra	13
4.8. Análise do proteoma foliar: espectrometria de massas	14
4.9. Análise do proteoma foliar: análise de dados	14
4.10. Perfis de comparação	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1. Crescimento e estresse oxidativo em folhas de plantas cultivadas em atmosfera modificada.	15
5.2. Análise global do proteoma foliar de plantas cultivadas em atmosfera modificada.	19
5.3. Respostas do proteoma foliar de plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO ₂ e em alta temperatura.....	25
5.4. Alterações metabólicas das plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO ₂ e em alta temperatura.	34
6. CONCLUSÃO	42

7. REFERÊNCIAS	42
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
APÊNDICES.....	57
Apêndice 1A. Número de folhas.	57
Apêndice 2A. Área foliar média.....	57
Apêndice 3A. Número de ramos foliares.....	58
Apêndice 4A.	58

Efeito da alta temperatura e do enriquecimento por CO₂ em poliploides de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*

RESUMO - O *Eucalyptus* é uma árvore de crescimento rápido e com alta capacidade em assimilar e estocar grandes quantidades de carbono atmosférico. No presente trabalho, foi realizado um estudo do crescimento e das mudanças induzidas no proteoma global de *Eucalyptus* poliploides cultivados em diferentes combinações de temperatura e CO₂. O crescimento em alta concentração de CO₂ induziu a redução na área foliar de todos os genótipos. No entanto, foi observada expansão da área foliar quando as plantas foram cultivadas em ambiente de alta temperatura. Além disso, sob alta temperatura houve a redução no número de folhas e no número de ramificações para a maioria dos genótipos de *Eucalyptus*. No entanto, o conteúdo de peróxido de hidrogênio e malonaldeído sugeriram que nenhuma das condições e estímulo desencadearam resposta a estresse oxidativo em nenhum dos genótipos cultivados. Análises de espectrometria de massas das amostras foliares do genótipo diploide contrastado com os cinco poliploides sob condição controle, demonstraram que a poliploidia, induziu diferenças particulares para cada um dos genótipos poliploides, porém não se destacam como grandes mudanças no proteoma constitutivo. Diferentes padrões na abundância do proteoma foram observados quando as plantas foram cultivadas em estímulo de CO₂ e temperatura, o qual está de acordo com os dados fenotípicos que mostram que a alta temperatura é maior indutor de diferenciação do proteoma entre os genótipos de *Eucalyptus*. Foram identificadas enzimas de todas as reações do Ciclo de Calvin-Benson e Ácido tricarboxílico, no entanto, nenhuma alteração na abundância destas frente aos estímulos foi observada. Deste modo, podemos inferir que a heterozigosidade do gênero aliada a duplicação dos cromossomos permitiu aos genótipos maior plasticidade para enfrentarem as diferentes condições sem afetar seu desenvolvimento.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, poliploidia, proteômica, carbono, temperatura.

Elevated temperature and CO₂ enrichment effects on *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* polyploids

ABSTRACT - *Eucalyptus* is a fast-growing tree with a high capacity to assimilate and store large amounts of atmospheric carbon. In this study, we investigated the growth and induced changes in the global proteome of polyploid *Eucalyptus* cultivated under different combinations of temperature and CO₂. Growth in high CO₂ concentration led to a reduction in leaf area for all genotypes. However, an expansion of leaf area was observed when plants were cultivated in a high-temperature environment. Additionally, under high temperature, there was a reduction in the number of leaves and branches for most *Eucalyptus* genotypes. Nevertheless, hydrogen peroxide and malondialdehyde content suggested that none of the conditions and stimuli triggered oxidative stress response in any of the cultivated genotypes. Mass spectrometry analyses of leaf samples from the diploid genotype contrasted with the five polyploids under control conditions showed that polyploidy induced differences for each of the polyploid genotypes, but they did not stand out as major changes in the constitutive proteome. Different patterns in proteome abundance were observed when plants were cultivated under CO₂ and temperature stimuli, aligning with phenotypic data indicating that high temperature is a more significant inducer of proteome differentiation among *Eucalyptus* genotypes. Enzymes from all reactions of the Calvin-Benson Cycle and Tricarboxylic Acid were identified, yet no changes in their abundance in response to stimuli were observed. We can conclude that the heterozygosity of the genus, coupled with chromosome duplication, granted the genotypes greater plasticity to face different conditions without affecting their development.

Keywords: *Eucalyptus*, polyploid, proteomics, carbon, temperature.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as mudanças climáticas têm se tornado cada vez mais evidentes. Segundo o último relatório do IPCC (IPCC, 2022), mesmo em caso de adoção de medidas mitigadoras dos efeitos climáticos, o aumento médio na temperatura do planeta Terra está estimado em 2°C, com possibilidade de atingir 4°C até o final do próximo século. Associado e intimamente relacionado ao aumento da temperatura global está o aumento da concentração do dióxido de carbono (CO₂), que pode chegar a 800 ppm, um aumento de 90% em relação aos 420 ppm atuais (NOAA, 2022).

As florestas são importantes agentes mitigadores das mudanças climáticas devido ao seu potencial em sequestrar e armazenar o CO₂ atmosférico (Sork, et al., 2013). Atualmente, há uma grande quantidade de trabalhos que buscam entender o efeito do aumento na concentração de CO₂ e da temperatura em espécies arbóreas; porém, a grande maioria busca compreender tais efeitos isoladamente, principalmente em relação às alterações na expressão dos genes. O aumento da temperatura induz alterações no proteoma, com ênfase para as proteínas envolvidas no metabolismo antioxidante (Santana Costa et al., 2017; Maher et al., 2019). Em *Picrorhiza kurroa* o cultivo em atmosfera enriquecida de CO₂ e de alta temperatura induziu mecanismos bioquímicos adaptativos para cada uma das condições (Kumar et al., 2020). Enquanto o cultivo em alto CO₂ estimulou a incorporação de carbono atmosférico, o crescimento em alta temperatura estimulou o metabolismo antioxidante. Além disso, a alta temperatura estimulou a expressão de reguladores específicos, proteínas termotolerantes e sinalizadores (Vu et al., 2019). O incremento combinado de CO₂ e de alta temperatura induz modulações das características de massa, altura, área foliar e nos metabólitos, a magnitude das respostas é genótipo dependente (Pinto et al., 2022).

A poliploidia consiste na duplicação do conjunto de cromossomos do organismo e pode ser obtida artificialmente em explantes submetidos ao tratamento com agentes antimitóticos, como colchicina, trifuralin e orizalin (Ruiz et al., 2020). Sendo assim, poliploides podem ser muito interessantes para obtenção de ganho genético devido à rápida resposta à duplicação em características como tamanho de alguns órgãos, duração do período vegetativo,

tolerância/resistência a estresse biótico e abiótico e na adaptabilidade em novos habitats (Chen e Ni, 2007). Contudo, o efeito da poliploidia estende-se além da duplicação no número de cromossomos acarretando reajuste no tamanho do núcleo, reorganização dos cromossomos e nova conformação das marcas epigenéticas, resultando em uma reação em cadeia para a nova dinâmica dos transcritos, metabólitos e das proteínas (Leitch e Leitch, 2008). Muitos estudos já foram realizados visando desvendar os mecanismos moleculares de poliploides que conferem melhores respostas fenotípicas (Li et al., 2021; Zhang et al., 2019), fisiológicas (Chen et al., 2021) e de tolerância estresses abióticos (Rao et al., 2020; Yibo et al., 2022; Syngelaki et al., 2021).

Tendo em vista (1) a importância de espécies florestais para a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas, (2) o potencial da poliploidia em gerar novas respostas fenotípicas e (3) a proteômica, como ferramenta de monitoramento da expressão dos produtos finais da expressão gênica, o objetivo do presente trabalho foi identificar mudanças e caracterizar as respostas do proteoma foliar em tetraploides de *E. urophylla* x *E. grandis*, e de seu isogênico diploide, quando estimuladas pela combinação do aumento na concentração de CO₂ e de temperatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do eucalipto

Pertencente à Família Myrtaceae, o gênero *Eucalyptus* compreende mais de 700 espécies (Silva et al., 2019), das quais menos de 30% são economicamente exploradas (Flores, 2016). O centro de origem da espécie é na Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e numa pequena porção de ilhas da Indonésia (Grattapaglia et al., 2012). Os subgêneros de destaque são *Symphyomyrtus* com predominância na representatividade das espécies, cujos exemplos são *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. globulus*, e *Monocalyptus* (Grattapaglia et al., 2012).

O gênero compreende espécies alógamas ou com sistema reprodutivo misto (limite de 35% de autofecundação), sendo um motivo de redução nos ganhos

genéticos e queda de produtividade relativamente recentes (Tambarussi et al., 2018).

O programa de melhoramento de *Eucalyptus* no Brasil iniciou suas atividades com Edmundo Navarro, em 1941, por meio do convite de Carlos Arnaldo Krug, do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC (Castro et al., 2016). Isso devido às pesquisas pioneiras de Edmundo na Estação Experimental em Rio Claro, por volta de 1919, quando já se caracterizavam mais de 150 espécies do gênero (Castellano et al., 2013).

As espécies que se destacam por suas propriedades para a indústria são *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. radiata*, *E. staigeriana*, além do *Corimbia citriodora* que ainda converge sua grande fonte de variação genética para o melhoramento (Grattapaglia, 2004; Coppen, 2002), bem como a hibridização destes.

No Brasil, o ano de 2021 foi encerrado com cerca de 9,93 milhões de hectares em área plantada, dos quais, aproximadamente 76% englobam plantios de Eucalipto, enquanto o *Pinus* corresponde a pouco mais de 19%, com uma produtividade média de 38,9m³/há/ano e 29,7 m³/ha/ano, respectivamente. Destaque é dado para os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (IBÁ, 2022).

Fonte: FGV IBRE & Ibá

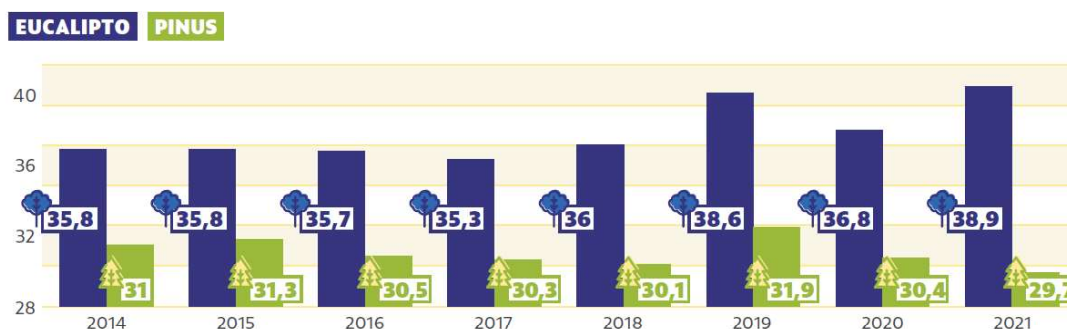


Figura 1: Produtividade anual de plantios de eucalipto e pinus segundo registros do IBA.

A cultura ainda se destaca por sua adaptação em ampla diversidade de ambiente, crescimento rápido, bem como o aproveitamento de subprodutos, como: papel, celulose, carvão, lenha, além dos produtos sólidos, como madeira

para construção e móveis (Albaugh et al., 2013). Com mais pesquisas no setor, novos usos e por vezes, usos mais sustentáveis são possíveis com a cultura, como produção de bio-óleo, celulignina catalítica, singás e álcool a partir da celulose (Paludzyszyn-Filho e Santos, 2011).

2.2. A poliploidia

Evolutivamente, estudos mais conservadores estimam que ao menos 30% das angiospermas tenham em sua ancestralidade pelo menos um evento de poliploidização, por outro lado, há grupos que defendem maior amplitude de espécies que passaram por esse mecanismo de diversificação, seguida da trajetória de diploidização (Koh et al., 2012).

A poliploidização consiste na duplicação do conjunto de cromossomos do genoma (Stebbins, 1947), e de acordo com a constituição dos parentais podem ser classificados como autopoliploides ou alopopoliploides, se houver apenas uma espécie envolvida ou duas, respectivamente (Figura 2).

Apesar de ser de grande uso para o melhoramento genético em plantas, a poliploidização tem muito baixas taxas de ocorrência natural (Zhu et al., 1998). Particularmente, para o gênero *Eucalyptus*, os poliploides descritos foram artificialmente obtidos (Guo et al., 2017), com destaque para a técnica de duplicação utilizando colchicina em células zigóticas. A colchicina, assim como orizalina e trifuralina, atuam inibindo a formação das fibras do fuso, e consequentemente as cromátides-irmãs não migram para polos opostos, uma vez que a citocinese também não ocorre (Silva et al., 2019).

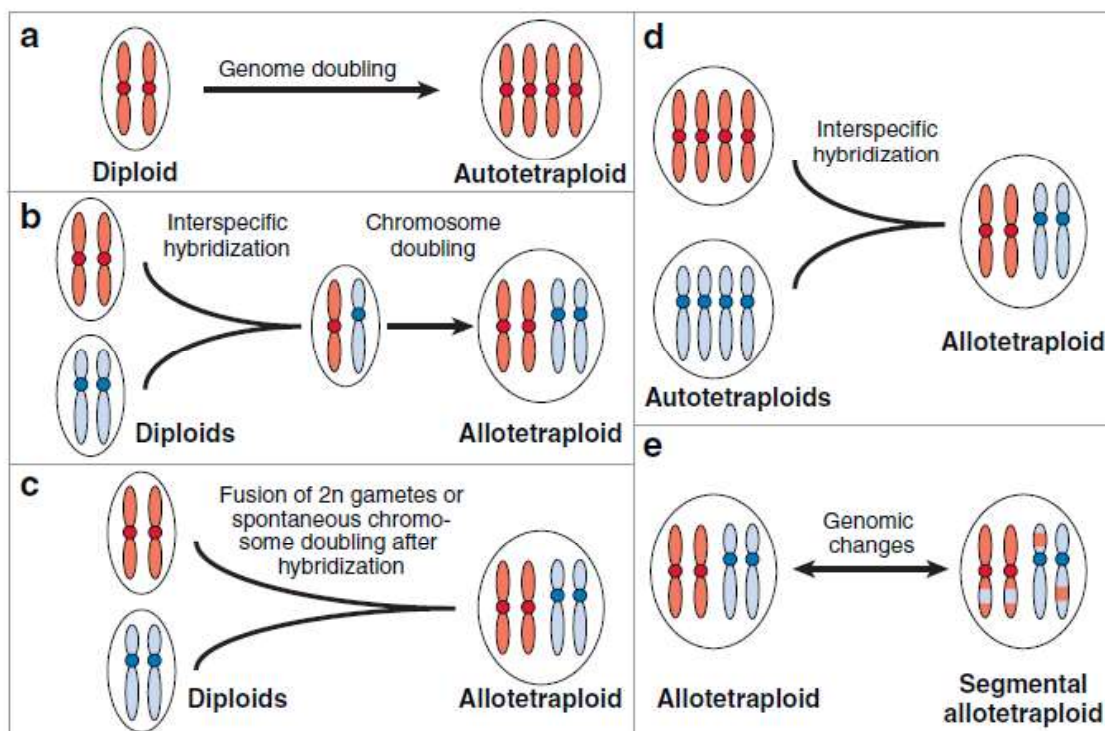


Figura 2: Representação da constituição de auto e alopoliploides. (a) origem de um autopoliploide a partir da duplicação dos cromossomos de um genótipo, cuja constituição é de apenas uma espécie. (b) origem de um alotetraploide a partir da hibridização entre duas espécies, seguida da duplicação cromossômica. (c) origem de um alotetraploide a partir da não redução dos gametas. (d) origem de um alotetraploide a partir da hibridização de dois parentais interespecíficos autopoliploides. (e) origem de um alotetraploide segmental a partir da troca de segmentos homólogos entre os cromossomos de espécies próximas. Fonte: Chen, 2007.

O uso da poliploidia como estratégia para obtenção de ganho ocorre em função da rápida resposta à duplicação em características como tamanho de alguns órgãos, duração do período vegetativo, tolerância/resistência a estresse biótico e abiótico e até por vezes na adaptabilidade em novos habitats (Chen, 2007).

O efeito da poliploidia, vai muito além da duplicação no número de cromossomos, acarretando reajuste no tamanho do núcleo, reorganização dos cromossomos e nova conformação das marcas epigenéticas, resultando em uma reação em cadeia para a nova dinâmica dos transcritos, metabólitos e das proteínas (Leitch e Leitch, 2008).

É importante destacar a complexidade no comportamento dos conjuntos de genomas (subgenomas) presentes no alopoliploide e esclarecer terminologias utilizadas. A expressão dos subgenomas pouco é igualitária, e uma diversidade

de dominância de um subgenoma sobre o outro pode ser encontrada (Figura 3). Há uma dualidade na utilização das terminologias para “dominância em nível de expressão” (ELD) e viés de expressão homóloga” (HEB). Aqui adotaremos que ELD diz respeito ao padrão de expressão quanto a todo o genoma, já HEB é particular a cada gene em poliploidia e contrastado com o parental (Buggs, 2013).

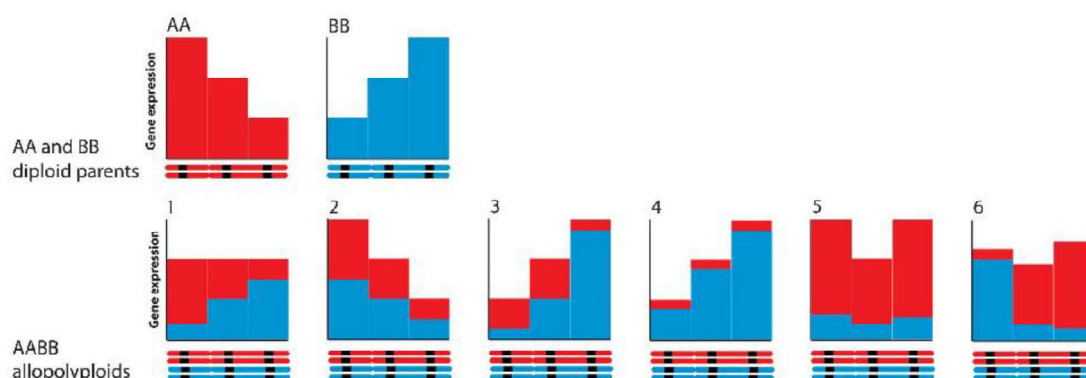


Figura 3: Ilustração da expressão dos parentais diploide e do alopoliploide. As cores vermelha e azul, correspondem ao distinto cromossomo de cada um dos parentais e os segmentos pretos correspondem aos locus exemplificados. (1) perfil de expressão alélico igualitário ao parental para cada subgenomas (padrão aditivo). (2) dominância da expressão para o subgenoma A, em todos os locus pontuados e B seguindo a tendência de A. (3) dominância em nível de expressão para o subgenomas B para todos os locus pontuados, com contribuição aditiva e A seguindo a tendência de B. (4) dominância em nível de expressão do subgenoma B e viés, uma vez que a expressão de A é reprimida para todos locus. (5) dominância da expressão do subgenomas A para todos os locus, com contribuição (viés) variável para cada locus pontuado. (6) ausência de dominância, uma vez que a contribuição depende do locu analisado. Fonte: Buggs, 2013.

A possibilidade de ocorrer o viés de expressão, também conhecida como subfuncionalização, é uma possibilidade onde ambos os subgenomas estão ativos, mesmo que não proporcionalmente. Neste sentido, a expressão dos dois subgenomas podem tomar alguns caminhos distintos além da subfuncionalização, como a não-funcionalização e a neo-funcionalização (Glombik et al., 2020). Quando levamos em consideração a existência de genomas de espécies diferentes em um mesmo organismo é possível a sobreposição ou dominância de um genoma a outro, como a expressão materna dominante ou a

paterna dominante (Yoo et al., 2014), culminado em níveis de expressão que não atendem o quesito de aditividade, como os transgressivos up e transgressivo down (Yoo et al., 2014).

Outra possibilidade é a de mutações genéticas ou epigenética que podem inativar um subgenoma completamente, também podem conferir uma nova função. No entanto, são necessárias pesquisas com o intuito de desvendar a respeito das forças direcionadoras para tais alterações (Soltis et al., 2016).

2.3. Mudanças climáticas

O último relatório divulgado pelo Painel Intergovernamental das Mudanças Climáticas (IPCC, AR6) traz cinco cenários climáticos dependentes da atividade antrópica a nível social, econômico e de responsabilidade ambiental para o final deste século. A emissão dos gases que contribuem para o efeito estufa se destaca pela complexidade do panorama, onde não é mais sustentável apenas as medidas de redução de emissão, mas também de resgate.

Os gases que mais contribuem para o efeito estufa são o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e dióxido sulfúrico (SO_2), no entanto, o CO_2 é fator chave devido a sua maior vida útil na atmosfera e por favorecer o aumento da temperatura do globo (NOAA, 2022).

Está previsto para o final deste século um aumento de quase duas vezes a concentração de CO_2 em relação ao atual: 423,68 ppm, registrada neste junho (NOAA, 2023). Intimamente relacionada, até o final do século, há grande probabilidade de que a temperatura do planeta Terra irá aumentar em pelo menos 2°C , com possibilidade de aumento próximo aos 4°C . A partir dos dados registrados pelo observatório de Mauna Loa no Hawai (NOAA), o ano de 2022 foi um dos anos mais quentes da história (NOAA, 2022).

Ainda sobre o último relatório, os panoramas trazidos correlacionam os diferentes fatores climáticos, como disponibilidade hídrica, concentração dos gases que contribuem para o efeito estufa, nível dos mares, e outros fatores indiretamente afetados. Além disso, os outros fatores como disponibilidade hídrica e nutricional também serão impactados com as oscilações, trazendo mais variáveis para um cenário cada vez mais obscuro com relação a resposta das plantas a tais variações.

Em especial, as florestas são importantes agentes nas mudanças climáticas, a respeito do panorama presente e futuro, em razão do potencial em sequestrar e armazenar o CO₂ atmosférico (Sork et al., 2013). A plasticidade fenotípica é a capacidade que algumas plantas possuem para ajustarem o metabolismo frente a oscilações, como por exemplo garantir aquisição do C, principalmente em condições de temperaturas acima da ótima (Drake et al., 2015) e é a característica explorada nos programas de melhoramento para garantir o estabelecimento das culturas.

O crescimento das espécies frente ao aumento de temperatura apresenta índices variáveis e dentre os fatores que influenciam nesta resposta está sua origem geográfica (Way e Oren, 2010). Há um limiar de temperatura ótima, e para as espécies arbóreas de clima temperado, o aumento de temperatura contribuirá para um maior crescimento, já as de clima tropical esse limiar já está muito próximo, acarretando redução nas taxas de crescimento. Além disso, trabalhos que consideram vários fatores no desenvolvimento de arbóreas reforçar temperatura como principal força de estímulo para as particularidades dos genótipos.

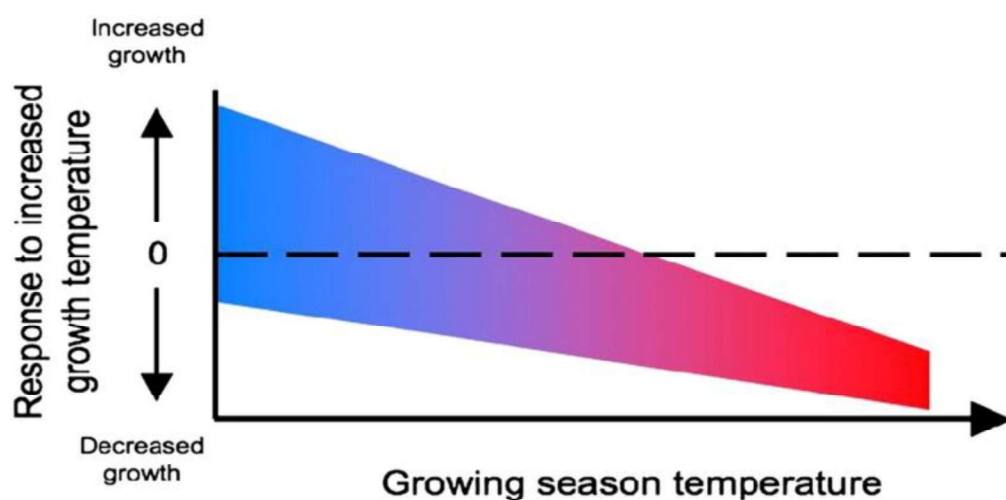


Figura 4. Crescimento teórico de espécies arbóreas frente a diferentes temperaturas. As nuances de cores indicam a variação de respostas possíveis. Espécies de clima temperado (azul) podem apresentar resposta positiva quanto ao crescimento quando em maiores temperaturas, mas reduzem o crescimento frente a condições limitantes à água e nutrientes. Espécies de clima tropical (em vermelho), podem apresentar redução no crescimento, além de menor variação de resposta entre os indivíduos ou espécies. Fonte: (Way e Oren, 2010).

Tão importante quanto conhecer os efeitos dos estresses de maneira isolada, é entender o funcionamento do metabolismo das plantas quando estes estão combinados. No entanto, pouco é sabido quanto a esta combinação específica, incluindo o nível de sensibilidade das culturas que foram desenvolvidas em programas de melhoramento para regiões específicas (Mittler e Blumwald, 2010).

A abordagem de proteômica permite entender os mecanismos-resposta a nível molecular e fisiológico, induzidos frente aos diferentes estresses, bem como as respostas das plantas quando isoladas a cada um dos estresses ou então, em resposta combinada (Rizhsky et al., 2002) e quando partilham algumas rotas, denominadas cross-talk (Chinnusamy et al., 2004). A interação entre ambos os estresses cria um novo estado molecular (Mittler, 2006), que pode ser aditivo ou antagonista, o qual é determinada pelo estresse mais severo (Pandey et al., 2015), permitindo assim o entendimento quanto aos mecanismos adaptativos em resposta a combinação dos estresses (Hu et al., 2015).

2.4. A proteômica

Comparativamente a outras técnicas de estudo da expressão de genes, a proteômica se destaca por atuar sobre o produto final dos genes, ou seja, as proteínas, uma vez que a sequência de DNA somente oferece poucas informações consistentes quanto a sua funcionalidade e a de mRNA não oferece tão mais informações (Salvato e Carvalho, 2010). Além disso, oferece melhor elucidação quanto à cascata de resposta das plantas à combinação de diferentes estresses, podendo ela ser exclusiva, independente para cada agente ou comum a ambos (Rizhsky et al., 2002).

Há duas abordagens para a identificação de proteínas, quando intactas é denominada top-down, e bottom-up quando há uma etapa de digestão das proteínas e então os peptídeos são analisados (Nesatyy e Suter, 2008). A ascensão da espectrometria de massas e também da computação permitiu técnicas de identificação e quantificação das proteínas com maior precisão, desde a separação até a minuciosa atribuição das identificações de cada elemento biológico analisado (Rozanova et al., 2021).

Para a separação dos peptídeos na cromatografia, há duas estratégias que podem ser aplicadas dependendo do objetivo da análise. Quando a busca parte da obtenção de informação predominantemente quantitativa e exploratória (Rozanova et al, 2021) há a seleção dos MS1 mais abundantes (estabelecido o N a priori) e conduzindo-os para a obtenção dos scans do tipo MS2, denominada aquisição dependente de dados (*data-dependent acquisition – DDA*) (Sajic et al., 2015). Já quando a busca por informação é mais direcionada, uma “janela” de fragmentação é escolhida e então todos os MS1 são conduzidos para fragmentação e obtenção dos scans do tipo MS2 (Bruderer et al., 2015).

A técnica tem ampla abordagem para estudos na detecção de proteínas diferencialmente acumuladas para espécies cultivadas sob estímulo de CO₂ (Baldassi et al., 2018; Aspinwall et al., 2018; Wujeska-Klaue et al., 2019), aquecimento (Lee et al., 2007; Skylas et al., 2002; Ferreira et al., 2006), comparação de poliploides de espécies cultivadas como o trigo (Islam et al., 2003), canola (Albertin et al., 2006), algodão (Hu et al., 2011), *Tragopogon* (Koh et al., 2012), *Arabidopsis* (Ng et al., 2012), entre outros fatores. No entanto, a combinação da concentração de CO₂ e a alta temperatura são fatores pouco explorados na literatura, principalmente quando associada a genótipos poliploides.

3. OBJETIVO

Caracterizar as respostas fenotípicas e do proteoma foliar em tetraploides de *E. urophylla* x *E. grandis* e de seu isogênico diploide, quando estimulados pelo aumento na concentração de CO₂, temperatura e ação combinada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material genético e tratamentos

Os genótipos utilizados foram cedidos pela empresa Suzano SA (Jacareí, SP, Brasil). De um único híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* diploide, os brotos *in vitro* foram submetidos a duplicação cromossômica por colchicina, e selecionados cinco tetraploides somáticos (2n=4x) em função do melhor desempenho quanto ao incremento médio anual de celulose por hectare por ano

(IMACEL), totalizando seis genótipos. Os genótipos foram então denominados de G1 a G5 para os tetraploides e G6 para o parental diploide. As mudas se desenvolveram em tubetes do tipo ellepot até atingirem 60 dias e então foram transferidas para vasos de 5 litros contendo substrato (Bioplant). Quando atingidos aproximadamente 30 cm de comprimento, as mudas foram adubadas (superfosfato simples, sulfato de amônio e cloreto de potássio nas proporções: 8-2-1) e transferidas para câmaras de crescimento controlado (Fitotron). As câmaras foram ajustadas para 60% de umidade e fotoperíodo de 12h/12h e luminosidade de 250 micromol photons $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Os tratamentos combinaram temperatura e concentração de CO_2 com base nas previsões climáticas do IPCC (IR6), sendo as temperaturas de 25°C (controle) e 29°C e as concentrações de 420 ppm (controle) e 680 ppm, totalizando 4 cenários, dos quais as mudas foram submetidas por um período de 30 dias, tendo sido as mesmas adubadas a cada 15 dias por meio de adição de NPK (superfosfato simples, sulfato de amônio e cloreto de potássio nas proporções: 8-2-1). Foram utilizadas 3 repetições biológicas de cada genótipo, sendo cada uma delas composta de 2 plantas.

4.2. Avaliação do crescimento das plantas: número de folhas e área foliar

Foram contabilizadas as folhas completamente expandidas que se desenvolveram durante os 30 dias de estímulo de cada planta, seguido do registro de área foliar com auxílio do medidor eletrônico de área foliar da marca LI-COR, modelo 3100. A partir desses dados foi estabelecida a área foliar normalizada, sendo:

$$\frac{\text{número de folhas}}{\text{área foliar}}$$

4.3. Avaliação do crescimento das plantas: altura

Antes da entrada das plantas nas câmaras a altura entre o coleto e o meristema apical foi realizada e assim repetida ao final do experimento para obtenção do incremento (altura final - altura inicial).

4.4. Avaliação do crescimento das plantas: ramificações

Da mesma maneira que a altura, o número de ramos laterais também foi obtido a partir da diferença entre os ramos laterais do último dia de experimento e o primeiro.

4.5. Identificação de estresse oxidativo

A identificação de um possível estresse oxidativo nas plantas foi monitorado por meio da quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de peroxidação lipídica (formação de malonaldeído, MDA). A quantificação de H_2O_2 foi realizada por meio do protocolo de Alexieva et al. (2001), em que 0,250 g de folhas foram maceradas em ácido tricloroacético e centrifugadas por 12.000 g à 5 °C durante 15 min. O sobrenadante foi suspenso em 200 μL de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.5) e 800 μL de solução 1 M de iodeto de potássio e mantido em ambiente escuro e em baixa temperatura. A quantificação de absorbância foi realizada no espectrofotômetro PerkinElmer-Lambda a 390 nm e expressa em $\mu\text{mol/g}$ de matéria fresca. Já a peroxidação lipídica foi estimada pelo método descrito por Gratão et al. (2012) cuja concentração é estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para tanto, foi macerado 0,250 g de folha, seguida da homogeneização com 20% (p/v) de polivinilpirrolidona insolúvel (PVPP) e 0,1% de TCA e centrifugação a 10.000 g durante 5 min. Uma alíquota de 250 μL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de TBA a 0,5% em TCA a 20%. Esta solução foi incubada em banho-maria a 95 °C por 20 min e a reação interrompida por resfriamento rápido em gelo. A absorbância do TBARS formada foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm. As medições seguiram por correção para turbidez inespecífica subtraindo a absorbância a 600 nm. A concentração de equivalentes de MDA foi calculada usando o coeficiente de absorbância $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e os resultados expressos em $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de massa fresca.

4.6. Análise do proteoma foliar: extração de proteínas

Uma alíquota de 1 g de material foliar foi macerada em nitrogênio líquido e homogeneizado em solução de extração (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM sacarose, 100 mM KCl, 1% beta-mercaptoetanol, pH 8,0) por 10 min a 4°C.

Posteriormente, foi adicionado fenol comercial (Phenol saturated, Pierce™) e a mistura agitada em temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 4 °C e 4.100 g e o sobrenadante coletado. As proteínas foram precipitadas por 16 h em solução precipitante (0,1 M acetato de amônio em metanol) a -30 °C. Em seguida, centrifugadas por 20 min a 4 °C e 4.100 g, o sobrenadante descartado e as proteínas ressuspendidas em tampão de amostra (125 mM Tris pH 6,8; 20% glicerol; 1% SDS e 1% DTT). Finalmente, a quantidade de proteínas extraídas foi quantificada por meio do “Qubit protein assay kit” (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7. Análise do proteoma foliar: preparo da amostra

Previamente à digestão proteica, uma alíquota de 50 µg de proteínas foi transferida para um microtubo e 10x o volume equivalente de solução de 0,1 M de acetato de amônio em metanol foram adicionados ao mesmo tubo. A precipitação ocorreu por 40 min a 4°C, seguida de centrifugação por 6 min a 4.000 g. O sobrenadante foi descartado ao final do processo de precipitação. Para lavagem do *pellet* proteico, o metanol foi adicionado às proteínas, a mistura centrifugada por 8 min a 4.000 g, seguido do descarte do sobrenadante. Finalmente, o precipitado foi reconstituído em 25 mM de solução aquosa de bicarbonato de amônio (AmBic) por 10 min a 70 °C, seguido do processo de redução de pontes dissulfeto (30 mg ditioneitol em 1 ml Ambic a 25mM) por 20 min a 56 °C e resfriado em gelo. A alquilação (36 mg de iodoacetamida em 1 mL de AmBic 25 mM) ocorreu por 20 min a temperatura ambiente no escuro.

A digestão proteica ocorreu utilizando tripsina na proporção 1:10 (tripsina : proteína) por amostra a 37 °C *overnight* e posteriormente submetidas à centrifugação a vácuo. Para dessalinização, os peptídeos trópticos foram ressuspendidos em 0,1% ácido fórmico em pontas de pipeta do tipo zip-tip (Merck Millipore) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a quantificação dos peptídeos por meio de fluorescência usando o “Qubit protein assay kit” (Thermo Fisher Scientific), a alíquota de 1 µg foi analisada em cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.

4.8. Análise do proteoma foliar: espectrometria de massas

Foi utilizado um cromatógrafo líquido do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fisher Scientific) para a separação *online* dos peptídeos, por 90 min em nano-coluna de fase reversa (15 cm, 3 μ m, 100 Å) e em gradiente decrescente de polaridade (solvente A: 0,1% ácido fórmico em água e solvente C: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila). A separação cromatográfica ocorreu em fluxo constante de 300 nL.min⁻¹. As aquisições de espectros de massas ocorreram em sistema de alta resolução do tipo Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific), utilizando-se o modo de operação DDA. Para tal, para cada ciclo de aquisição de espectros do tipo *survey* (MS1), de 400 a 1.600 m/z, os vinte peptídeos mais abundantes foram selecionados para fragmentação de aquisição de espectro de fragmentação (MS2). A fragmentação utilizada foi do tipo HCD a 35 eV. As resoluções utilizadas para as aquisições dos espectros de MS1 e de MS2 foram 70.000 e 35.000 FWHM (full width at half maximum), respectivamente. Somente foram selecionados para fragmentação os íons peptídicos de carga igual a +2 e +3, com exclusão dinâmica ajustada para 10 s.

4.9. Análise do proteoma foliar: análise de dados

A identificação dos peptídeos e inferência das proteínas foliares foram realizadas por meio de buscas utilizando o software MaxQuant (v2.1.3.0) e a ferramenta de busca Andromeda (Tyanova, Temu, Cox, 2016). Para tanto, as informações espectrais foram contrastadas com aquelas oriundas do processamento do banco de dados de *Eucalyptus grandis* v.2.0, encontrado no portal Phytozome (Goodstein et al., 2012). Os parâmetros utilizados nas buscas foram: 20 ppm de tolerância para o íon precursor, a oxidação da metionina foi adicionada como modificação variável e a carbamidometilação da cisteína como modificação estática. Foram permitidas até duas ausências de digestão nos sítios de clivagem da tripsina, assumindo 1% para false-discovery rate (FDR) considerando a estratégia target-decoy. A abundância se deu por meio do LFQ (Label-free quantification) intensity. Nas análises comparativas, inicialmente a abundância das proteínas foi normalizada pela relação “LFQ/MSMS count”, transformada para log₂ e submetidas a análise de normalidade e homocedasticidade, seguidas do Teste-t de Student pelo software Perseus (Tyanova, Temu, Cox, 2016) quando necessário. A identificação nas variações

das quantidades das proteínas foi realizada de forma relativa, aplicando-se o teste estatístico mencionado acima ($p < 0,05$) e a diferença do log2LFQ igual ou maior que 1.

4.10. Perfis de comparação

Para as características fenotípicas analisadas, os dados foram submetidos a ANOVA, seguida do teste de tukey ($p \leq 0.05$) para resposta na concentração de CO₂ controle comparada com a resposta na concentração de CO₂ elevada em cada uma das temperaturas separadamente.

Os dados do proteoma foliar foram submetidos inicialmente a um agrupamento hierárquico, em que as proteínas diferencialmente abundantes foram normalizadas pelo z-score e a distância Euclidiana com ligação completa foi aplicada nos agrupamentos, utilizando-se o software Perseus. Para a abordagem comparativa da resposta do proteoma foliar, com ênfase na poliploidia, e entre os estímulos, foi aplicado o *teste-t* ($p \leq 0,05$) e diferença log2LFQ ≥ 1 entre os genótipos tetraploides comparados com parental diploide, e a condição controle (CT°C e aCO₂) comparada com os estímulos, respectivamente. Na proteômica dirigida do Ciclo de Calvin e do Ciclo do ácido tricarboxílico, foram utilizadas as informações da rota, das enzimas e suas proteoformas depositadas no banco de dados Phytozome, onde os bancos Pfam, InterPro e Phanter foram utilizados na classificação funcional.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento e estresse oxidativo em folhas de plantas cultivadas em atmosfera modificada.

O cultivo em atmosfera enriquecida por CO₂ resultou em diminuição da área foliar em plantas do genótipo diploide (G6) e dos tetraploides G3 e G5 em relação àquelas cultivadas em menores concentrações de CO₂ (Figura 1). Embora sem significância estatística, o mesmo padrão de resposta foi observado nas plantas dos genótipos tetraploides G1, G2 e G4. O cultivo em atmosfera enriquecida por CO₂ e em alta temperatura induziu menor ramificação de brotos, em especial nos genótipos G1, G2, G5 e G6, e redução no número de folhas das plantas aqui estudadas, principalmente nos genótipos G1, G2, G3 e G5 (Figura

1). Contrariamente à resposta observada quando as plantas foram cultivadas somente em alta concentração de CO₂, um aumento na área foliar foi observado nas plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ e em alta temperatura, especialmente nas plantas dos genótipos G2, G4, G5 e G6 (Figura 1).

O desenvolvimento das plantas é um processo dinâmico e sob influência de muitos fatores, (Root et al., 2003), dentre eles, o CO₂ (Rogers et al., 2004). Apesar de muitos trabalhos indicarem um aumento da área foliar como consequência ao aumento de CO₂, essa não é uma resposta obrigatória (Duursma et al., 2016). Particularmente, a alta temperatura tem a característica de induzir a iniciação de algumas estruturas, como raízes, folhas, ramificações, brotamento, perfilhamento e órgãos reprodutivos, e expandir num período menor (Morison e Lawlor, 2002). A partir disso, podemos sugerir que em temperatura ambiente, o eCO₂ atrasou o desenvolvimento das folhas de *Eucalyptus*, ao passo que o efeito combinado da maior temperatura e elevada concentração de CO₂ (eCO₂) estimulou o desenvolvimento destas. Em sorgo, por exemplo, o CO₂ tem maior influência sobre o período reprodutivo, retardando as plantas a iniciarem a emissão da panícula, prolongando o ciclo da planta (Ellis et al. 1995). Nesta dinâmica, Dermody, Long e Delucia (2006) demonstram que o eCO₂ atrasou a senescência do dossel de plantas, induzindo o crescimento de novas folhas.

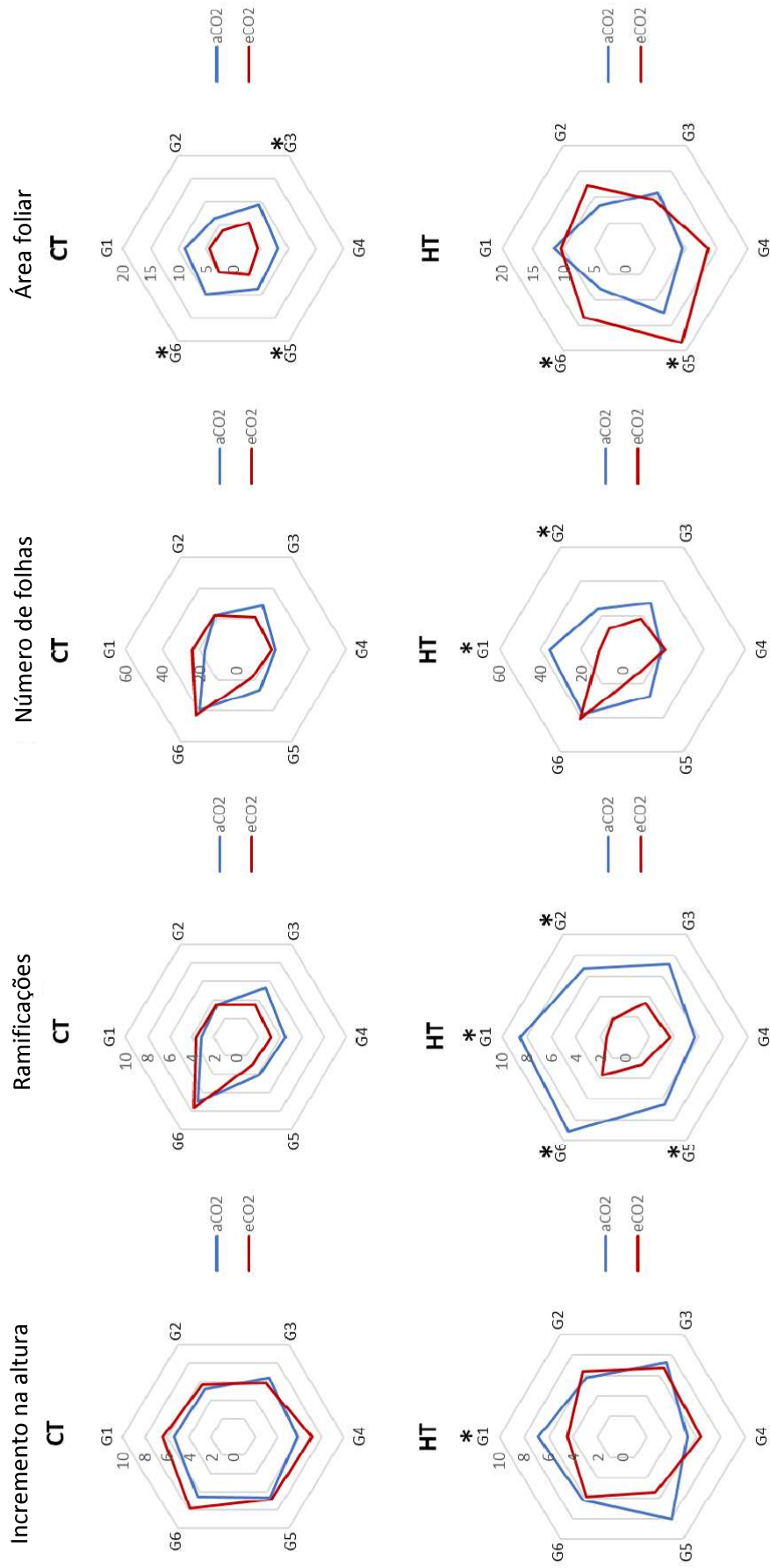


Figura 1. Respostas fenotípicas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C. *Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$).

No entanto, não podemos deixar de pontuar a importante influência que o genótipo tem nessa interação e nos mecanismos desencadeados por essa (Morison e Lawlor, 2002). Drake et al. (2015) enfatizam a influência da variabilidade e do centro de origem das várias espécies e genótipos de *Eucalyptus* na resposta a diferentes estímulos. Na interação entre o aumento da temperatura e do CO₂ em genótipos de arbóreas *Telopea speciosissima*, a influência da área foliar mostrou-se dependente do genótipo, já que ambos responderam com a expansão das folhas, mas em diferentes amplitudes.

Outra consequência do estímulo combinado foi a redução no número da emissão das ramificações. Apesar de não constatada a diferença estatística, Pinto et al. (2022) também notaram essa tendência de redução sob as mesmas condições em genótipos híbridos de *E. grandis*. O mecanismo de penalizar uma característica em favor de outra é comum no balanço metabólico (Hartmann et al., 2020) e aqui notamos a penalização do crescimento lateral em decorrência do aumento da área foliar.

Em plantas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são frequentemente geradas como subprodutos do transporte de elétrons, o qual ocorre na membrana interna das mitocôndrias e na membrana dos tilacóides cloroplastidiais. A produção desequilibrada de ERO pode ocasionar danos celulares o que, em larga escala, pode resultar em morte tecidual e comprometimento do crescimento das plantas (Petrov et al., 2015). No presente trabalho, os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do malonaldeído (MDA) foram utilizados para avaliação do estresse oxidativo e possíveis danos celulares associados a esse. Embora não se tenha observado variações significativas entre os tratamentos aqui estudados, algumas considerações se fazem importantes: foi possível observar que o crescimento em atmosfera enriquecida em CO₂ induziu um maior acúmulo de H₂O₂ em plantas do genótipo diploide (G6) e que essa condição foi revertida quando as plantas foram cultivadas em atmosfera combinada (Figura 2). Contrariamente, plantas do genótipo poliploide G1 apresentaram redução no acúmulo de H₂O₂ quando cultivadas somente em atmosfera enriquecida por CO₂ (Figura 2). Nessas plantas, o padrão de acúmulo de H₂O₂ foi retornado aos níveis controle quando cultivadas em atmosfera enriquecida em CO₂ e em alta temperatura combinadas. Plantas do genótipo G3 e G4 mostraram-se as mais recalcitrantes para a reversão dos efeitos

oxidativos induzidos por cultivo em alta concentração de CO₂. A quantificação de MDA não indicou lise celular nos genótipos e tratamentos aqui avaliados (Figura 2).

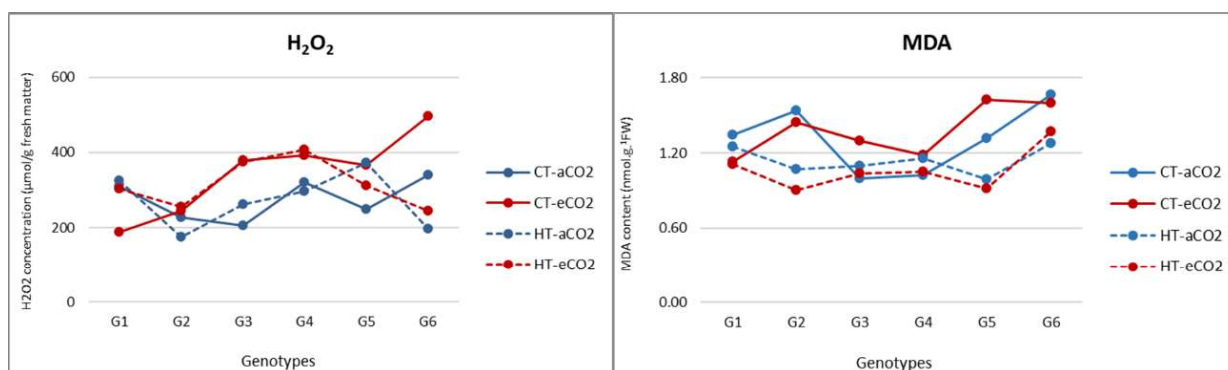


Figura 2: Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA) nas folhas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25 °C; HT= 29°C. *Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$).

5.2. Análise global do proteoma foliar de plantas cultivadas em atmosfera modificada.

A avaliação de agrupamento hierárquico, realizada entre os proteomas foliar dos genótipos aqui estudados em condição ausente de estímulo controlado, indicou similaridade entre o proteoma foliar do genótipo diploide (G6) e o proteoma foliar de plantas tetraploides G4, o que sugere maior semelhança entre esses genótipos na expressão constitutiva de genes em condições de crescimento ausentes de estímulos (Figura 3). Contudo, a relação de semelhança entre os genótipos G6 e G4 foi alterada quando as plantas foram submetidas a diferentes condições de cultivo. Embora o cultivo das plantas em condição controle (CT-aCO₂) tenha resultado na manutenção da similaridade do proteoma foliar do genótipo diploide em relação ao tetraploide G4, nota-se que o estímulo combinado de atmosfera enriquecida de CO₂ e de alta temperatura resultou em maior dissimilaridade do proteoma do genótipo diploide em relação a todos os tetraploides aqui avaliados. É importante notar que as relações entre os proteomas dos genótipos estudados não apresentaram um padrão definido, alternando-se de acordo com as condições de cultivo impostas às plantas (Figura 3).

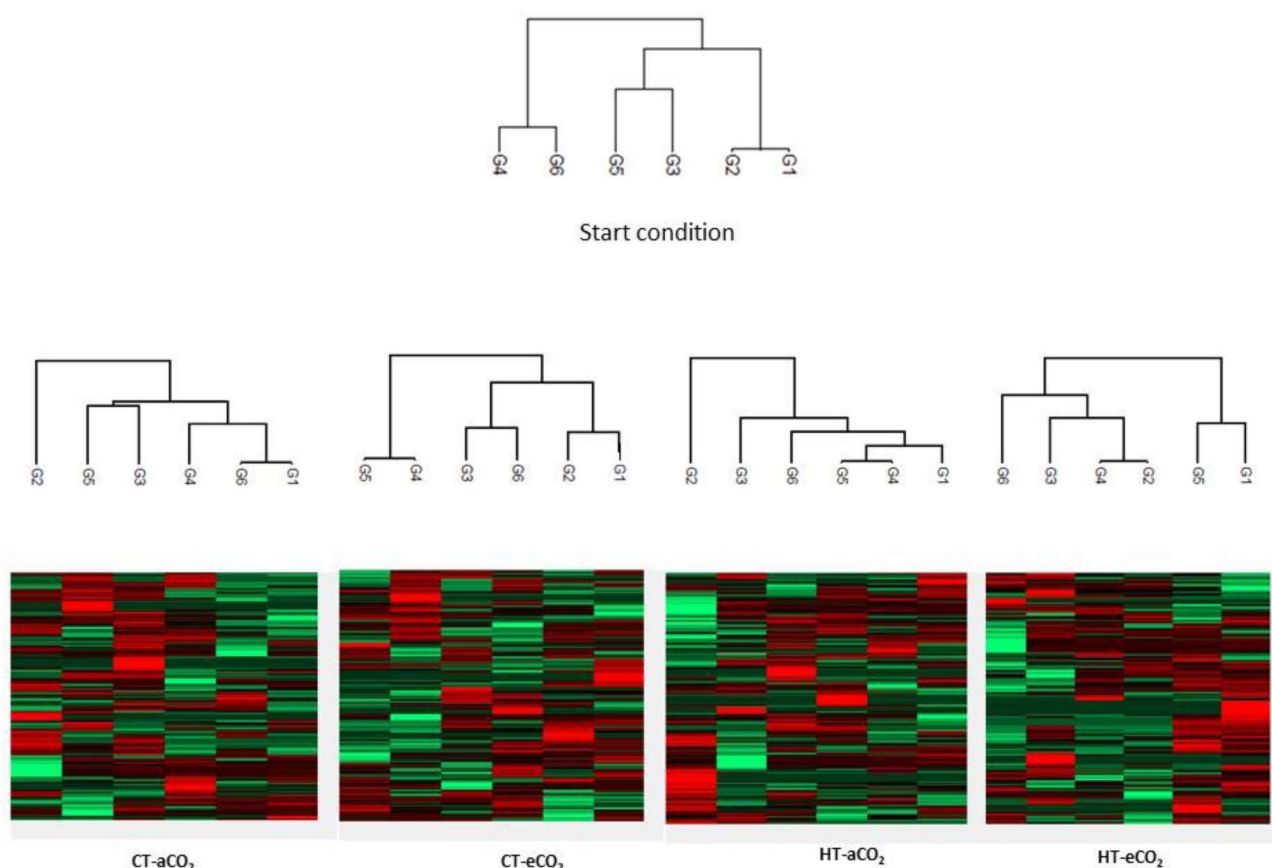


Figura 3. Cluster hierárquico do proteoma foliar de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C.

A plasticidade apresentada pela avaliação do proteoma global indica que além do centro de origem das espécies, as diferenças produzidas estão intimamente relacionadas às particularidades do próprio genótipo (Huang et al., 2015). Com relação aos genótipos aqui analisados, a hibridização entre duas espécies diferentes, o processo de duplicação do conjunto de cromossomos e o reajuste da informação genética podem ser fonte de diferenciação. Denaeghel et al., (2018) já demonstraram que para cada uma das espécies do gênero *Escallonia*: *E. rubra*, *E. rosea*, e *E. illinita* o processo de duplicação foi particular, resultando em diferentes comportamentos referentes a arquitetura, morfologia e plasticidade fenotípica quanto à tolerância a baixas temperaturas. O processo de duplicação cromossômica pode causar grandes alterações no genoma por gerar mutações, alterações no balanço da abundância das proteínas, na disposição dos elementos

transponíveis, além de inúmeras possibilidades de alterações na mitose e meiose (Comai, 2005).

No entanto, são escassos os relatos na literatura sobre a variabilidade dos vários novos poliploides induzidos a partir de um mesmo parental. Riley e Chapman (1958) conseguiu provar a existência de modulação nas taxas de crossover entre os cromossomos homólogos (Hollister, 2015).

As dissimilaridades entre o proteoma foliar dos genótipos aqui avaliados foram mais pronunciadas quando as plantas foram cultivadas em alta temperatura (Figura 4). Nota-se que o padrão mais dissimilar na expressão global de genes (*i.e.* do proteoma) do genótipo diploide foi observado quando as plantas foram cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ e em alta temperatura. Dong et al., (2011) monitoraram a expressão dos genes em alopoliploides de *G. hirsutum* a nível de estresse e de órgão. A variabilidade foi pontuada a partir dos genomas parentais, e demonstrou ser particular para cada nível analisado, enfatizando o viés de expressão e na sub-funcionalização. Os autores ainda mostraram que a expressão é órgão e tempo-dependente e que, para o material estudado pelos autores, o estresse salino e o térmico (calor) foram os que mais induziram alterações.

Tendo em vista a ausência de um padrão de respostas do proteoma foliar entre os genótipos, uma abordagem comparativa foi realizada visando à identificação individual das proteínas com variação significativa de abundância (teste-t $p < 0,05$ e diferença $\log_2\text{LFQ} \geq 1$) entre o genótipo diploide (G6) e os genótipos poliploides (G1 a G5) em condição ausente de indução de qualquer estímulo durante cultivo (Tabela 1). Não foram identificadas proteínas com variação significativa na abundância entre o proteoma do genótipo G6 e o proteoma foliar do genótipo poliploide G4. Esse resultado corrobora aquele descrito na análise de agrupamento hierárquico, evidenciando uma maior semelhança entre esses dois genótipos dentre todos aqui estudados. Contrariamente, o genótipo mais dissimilar, quanto ao número de proteínas diferencialmente abundantes, em relação ao genótipo diploide foi o tetraploide G3 e evidenciando que nenhuma proteína diferencialmente abundante foi comum entre os tetraploides (Tabela 1).

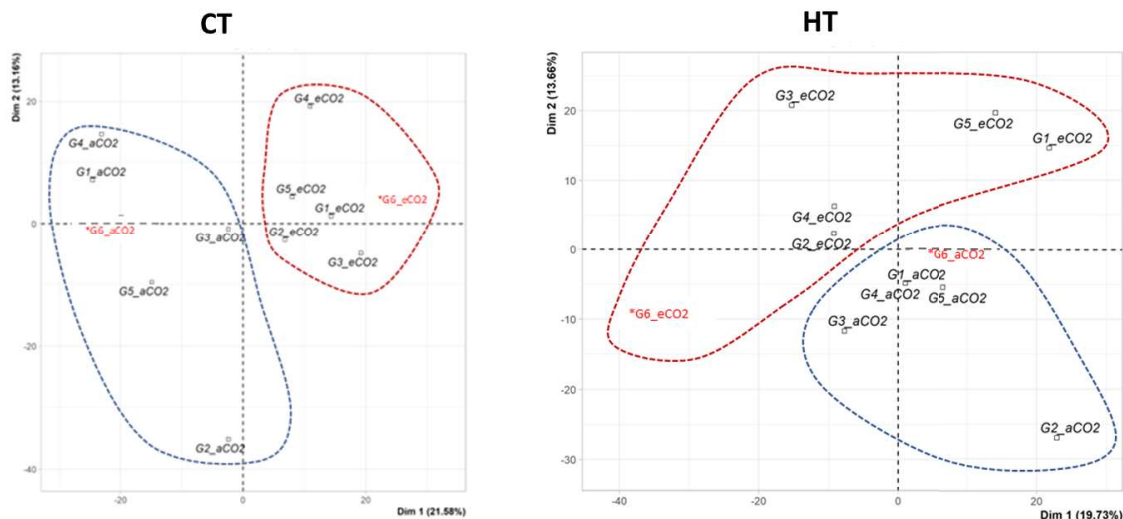


Figura 4. Análise multivariada do proteoma foliar de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C.

Em *A. thaliana* o número de transcritos em genótipos tetraploides mostrou-se sutilmente variável quando comparados com o parental diploide (Song et al., 2020). Em *Tragopogon*, a quantidade de proteínas, i.e., produto gênico específico, do poliploide foi similar ao diploide parental e menor que o híbrido diploide, indicando que, por vezes, a hibridização confere maior diversidade de respostas do que a duplicação (Koh et al., 2012). Com isso, entendemos que a abundância de proteínas em genótipos poliploides induzidos não é homogênea e, muito menos, previsível.

Os eventos descritos anteriormente indicam que apesar dos tetraploides terem a mesma origem parental, o padrão de expressão entre eles não é o mesmo. Principalmente considerando que eles se originam de um híbrido interespecífico e de alta heterozigosidade. Neste sentido Grover et al. (2012) sugere a possibilidade de ocorrência do desbalanço quanto ao padrão de expressão dos pares gênicos em alopoliploides. Song et al (1995) demonstraram a instabilidade do genoma de poliploides artificialmente induzidos de *Brassica*, a qual acarretou variação do perfil de expressão dos genes. Dessa forma, podemos hipotetizar que os diferentes padrões de abundância dos genes/proteínas devem-se, possivelmente, a um processo de randomização do material genético ocorrido durante o processo de poliploidização, onde parte dos cromossomos podem ter sido perdidas (1), ou parte

pode ter sido silenciada (2), ou então, cópias gênicas podem ter se reorganizado e passado a codificar para uma nova função (neofuncionalização) (3) (Wang et al., 2012 e Yoo et al., 2014).

Entre as proteínas mais abundantes na distinção dos tetraploides com parental diploide (Tabela 1), duas delas são heat shock proteins (Eucgr.H04692.1 e Eucgr.L02860.1). As Heat Shock Proteins (HSP) são proteínas expressas durante o ciclo de vida natural das plantas para manutenção das atividades gerais (Waters et al., 1995), no entanto, seu principal papel é o de minimizar os efeitos negativos desencadeados pela alta temperatura durante o ciclo de vida das espécies (Comastri et al., 2018). Wang et al. (2017) identificaram o aumento e manutenção no número de genes codificantes para as Small Heat Shock Proteins (sHSP) em trigo, considerado uma evidência de melhor adaptação nos ambientes mais hostis. Neste mesmo sentido, a casein lytic proteinase B3 (Eucgr.I01982.1), também tem sua expressão aumentada em condições de estresse térmico, induzindo conformações particulares aos cloroplastos impedindo danos (Parcerisa et al., 2020). Como estratégia evolutiva, durante o processo de diploidização dos ancestrais poliploides das espécies, foi favorecido a retenção dos genes duplicados que conferem tolerância a agentes bióticos e abióticos, como as HSPs (Sterck et al., 2007).

Outra proteína que apresentou a diferença na abundância maior que duas vezes quando tetraploide, foi a ferritin 4 (Eucgr.J00176.1). Muitas hipóteses para a função da ferritin nas plantas foram sugeridas, mas pouco foi atribuído com grande grau de confiança (Briat et al., 2010). Ravet et al. (2009) associaram os níveis diretamente proporcionais de ferritin na folha e a atividade das enzimas detoxificantes, demonstrando seu papel em combater os efeitos negativos desencadeados por algum estresse. Em plantas de pêra submetidas a estresse térmico (alta temperatura) e salino, apresentaram maior acúmulo da ferritin 4 (*PpFer4*) enfatizando sua importante atuação durante o período de adaptação à nova condição imposta (Xi et al., 2011). Esses dados só reforçam a hipótese de que a poliploidia permitiu maior plasticidade metabólica para que alguns genótipos de *Eucalyptus* se tornassem mais resilientes às mudanças de CO₂ e temperatura. Tal característica é de suma importância frente às mudanças climáticas que se tornam cada vez mais intensas e frequentes, principalmente para culturas perenes que enfrentaram tais alterações durante todo seu ciclo de vida.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente abundantes de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* entre genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5). A comparação se deu utilizando o genótipo diploide como referência.

Comparação ^a	Identificador ^b	Descrição ^c	LFQ ^d	log (p-value) ^e	log ₂ FC ^f
G1_G6	Eucgr.B03166.3	glycosyl transferase, family 35	18.10	1.84	1.27
G1_G6	Eucgr.C00990.1	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	17.96	1.38	1.46
G1_G6	Eucgr.E00233.1	shikimate kinase like 2	19.11	1.41	1.01
G1_G6	Eucgr.I00535.2	histone superfamily protein	19.63	1.49	1.01
G1_G6	Eucgr.G03258.4	scarecrow-like 3	17.10	1.81	1.03
G1_G6	Eucgr.J01502.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	22.44	1.31	1.13
G1_G6	Eucgr.J02986.1	putative methyltransferase family protein	19.87	1.55	1.19
G1_G6	Eucgr.K01671.1	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	17.32	1.99	1.00
G2_G6	Eucgr.B03013.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	21.14	1.47	1.60
G2_G6	Eucgr.H00726.1	lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein	20.08	1.47	1.42
G2_G6	Eucgr.J01354.1	ribosomal protein S2	20.12	1.33	1.26
G2_G6	Eucgr.J02208.1	formate dehydrogenase	18.70	1.53	1.24
G3_G6	Eucgr.C03953.1	ATP binding	16.87	2.41	1.05
G3_G6	Eucgr.E03981.1	fibrillin	17.20	2.17	1.17
G3_G6	Eucgr.G02327.1	alpha-xylosidase 1	16.38	1.41	1.15
G3_G6	Eucgr.H04692.1	heat shock protein 21	15.04	1.82	4.84
G3_G6	Eucgr.I01263.1	coatomer gamma-2 subunit, putative	17.25	1.40	1.07
G3_G6	Eucgr.I01982.1	casein lytic proteinase B3	16.86	1.65	2.01
G3_G6	Eucgr.J00176.1	ferritin 4	16.64	1.53	2.29
G3_G6	Eucgr.J00766.1	chaperonin-like RbcX protein	17.55	1.39	1.13
G3_G6	Eucgr.J01823.1	ACD1-like	17.38	1.32	1.03
G3_G6	Eucgr.L02860.1	heat shock protein	16.77	1.61	2.17
G5_G6	Eucgr.F01077.1	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	16.91	1.73	1.08
G5_G6	Eucgr.G00777.1	light harvesting complex photosystem II subunit 6	18.28	1.35	1.47

^aComparação pareada. ^bTranscrito segundo o portal Phytozome para proteínas únicas. ^cAnotação funcional associadas ao identificador.

^dAbundância proteica normalizada (em log₂). ^e -log p-value (t-test). ^fFold-change a partir da diferença da abundância no tetraploide em relação ao diploide.

5.3. Respostas do proteoma foliar de plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ e em alta temperatura

Visando uma melhor compreensão das alterações induzidas pelo crescimento em atmosfera enriquecida de CO₂ e em combinação com a alta temperatura, as respostas e efeitos no proteoma foliar dos genótipos aqui avaliados foram individualmente estudados e classificados de acordo com as categorias indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação da resposta do proteoma foliar segundo a abundância em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) depois de 30 dias sob cultivo em condições controladas.

Tipo de efeito	Alta temperatura (HT)	Enriquecimento de CO ₂ (eCO ₂)	HT + eCO ₂
Dominante (caso 1)	aumento	diminuição ou sem alteração	aumento
Dominante (caso 2)	diminuição ou sem alteração	aumento	aumento
Codominante	aumento	aumento	aumento
Antagonista (caso 1)	aumento	diminuição	sem alteração
Antagonista (caso 2)	diminuição	aumento	sem alteração
Inibitório	diminuição ou aumento	diminuição ou aumento	ausência
Exclusivo	sem alteração	sem alteração	aumento

As respostas do proteoma foliar do genótipo diploide (G6, Tabela 3) para o estímulo combinado de alta temperatura e enriquecimento de CO₂, foram predominantemente caracterizadas pelo efeito exclusivo no estímulo combinado da alta temperatura e enriquecimento por CO₂ (classificações na Tabela 2). Contrariamente, a resposta do proteoma das plantas dos genótipos poliploides mostrou-se mais diversa, tendo sido também observados efeitos de codominância, inibição e antagonismo entre os estímulos avaliados. Os genótipos que apresentaram os maiores números de proteínas diferencialmente abundantes quando estimuladas pelo CO₂ e pela temperatura e em relação aos estímulos individuais, foram os poliploides G3 e G4.

Tabela 3. Lista das proteínas diferencialmente abundantes identificadas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) quando cultivados em atmosfera enriquecida em CO₂ e alta temperatura com relação a condição controle de crescimento.

Identificador ^a	Descrição ^b	(LFQ) ^c		
		eCO ₂	HT	eCO ₂ +HT
G1				
efeito dominante				
Eucgr.B02310.1	rubisco activase	-	14.66	14.04
Eucgr.E01107.1	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	-	-16.06	-14.83
Eucgr.H03983.1	MLP-like protein 423	-	-13.83	-13.42
Eucgr.J01502.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-16.37	-15.53
efeito inibitório				
Eucgr.I00535.2	histone superfamily protein	-15.89	-15.77	-
efeito exclusivo				
Eucgr.A01711.1	ribosomal protein L6 family	-	-	15.95
Eucgr.B01744.1	O-methyltransferase 1	-	-	15.28
Eucgr.F02835.1	pfkB-like carbohydrate kinase family protein	-	-	14.23
Eucgr.F03538.1	SKU5 similar 5	-	-	17.13
Eucgr.J00819.1	lipoxigenase 2	-	-	14.44
Eucgr.A00020.1	homolog of carrot EP3-3 chitinase	-	-	-14.02
Eucgr.A00159.1	MLP-like protein 423	-	-	-13.14
Eucgr.B00144.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	-	-	-12.58
Eucgr.D01888.1	osmotin 34	-	-	-13.73
Eucgr.H00972.1	chaperone protein htpG family protein	-	-	-13.45
Eucgr.H02295.1	acetamidase/Formamidase family protein	-	-	-12.91
G2				
efeito dominante				

Eucgr.J02986.1	putative methyltransferase family protein	17.07	-	17.10
Eucgr.G01960.3	acyl carrier protein 4	-15.38	-	-14.96
Eucgr.K03545.1	CP12 domain-containing protein 1	-14.15	-	-13.61
efeito codominante				
Eucgr.D01707.2	ARM repeat superfamily protein	-12.77	-12.83	-12.55
Eucgr.E01416.1	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	-12.70	-11.92	-12.37
efeito antagonico				
Eucgr.F01878.1	ribosomal protein L31	-14.53	16.79	-
Efeito inibitório				
Eucgr.K00881.1	terpene synthase 03	13.78	13.67	-
Eucgr.J00176.1	ferritin 4	-14.80	-14.55	-
efeito exclusivo				
Eucgr.G03258.4	scarecrow-like 3	-	-	14.60
Eucgr.H01629.1	thioredoxin F2	-	-	14.55
Eucgr.H03041.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	-	-	13.82
Eucgr.J00820.1	lipoxigenase 2	-	-	14.14
Eucgr.K02223.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	15.13
Eucgr.B01262.2	acyl carrier protein 3	-	-	-14.08
Eucgr.D01888.1	osmotin 34	-	-	-14.76
Eucgr.D02461.1	ribosomal protein S13A	-	-	-13.99
Eucgr.F01428.1	glutathione S-transferase TAU 19	-	-	-13.43
Eucgr.I00535.2	histone superfamily protein	-	-	-14.75
Eucgr.H03865.1	osmotin 34	-	-	-13.90
G3				
efeito dominante				
Eucgr.G03258.4	scarecrow-like 3	14.33	-	14.49
Eucgr.K03545.1	CP12 domain-containing protein 1	-14.19	-	-13.87
Eucgr.J00431.1	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	-	13.47	13.58
Eucgr.J00819.1	lipoxigenase 2	-	14.42	14.66

Euagr.J00820.1	lipoxygenase 2	-	14.32	15.01
Euagr.K01283.1	lipid transfer protein 1	-	-15.40	-15.75
efeito antagonico				
Euagr.J01502.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	16.32	-	-15.20
efeito exclusivo				
Euagr.A01915.2	phosphoenolpyruvate carboxylase 3	-	-	15.28
Euagr.A02451.1	plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	-	-	15.14
Euagr.B03573.1	translation protein SH3-like family protein	-	-	15.47
Euagr.B03013.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	14.51
Euagr.B03067.2	phosphoenolpyruvate carboxylase 4	-	-	14.28
Euagr.C01003.3	NADP-malic enzyme 3	-	-	14.42
Euagr.C03415.3	lycopene beta/epsilon cyclase protein	-	-	19.23
Euagr.E00628.3	plasma membrane intrinsic protein 1B	-	-	14.21
Euagr.H00206.1	sieve element occlusion B*	-	-	15.42
Euagr.H01172.1	glutathione S-transferase 6	-	-	16.77
Euagr.H03041.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	-	-	14.71
Euagr.J00237.2	plasma membrane intrinsic protein 1;4	-	-	12.96
Euagr.K02223.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	15.50
Euagr.A00746.1	lipid transfer protein 1	-	-	-15.20
Euagr.B01262.2	acyl carrier protein 3	-	-	-14.22
Euagr.B01760.1	copper/zinc superoxide dismutase 1	-	-	-13.85
Euagr.B02879.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase	-	-	-13.17
Euagr.D01115.1	ribosomal protein L3 family protein	-	-	-13.55
Euagr.D02179.2	single hybrid motif superfamily protein	-	-	-15.13
Euagr.I00535.2	histone superfamily protein	-	-	-14.93
Euagr.H02279.1	subtilase family protein	-	-	-12.56
Euagr.J00657.1	glutathione S-transferase, C-terminal-like; Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6	-	-	-15.93
Euagr.J01250.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	-	-	-14.54
G4				

efeito dominante

Eucgr.B02495.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	13.44	-	13.26
Eucgr.H01629.1	thioredoxin F2	14.37	-	14.47
Eucgr.F01428.1	glutathione S-transferase TAU 19	-13.81	-	-13.73
Eucgr.I01643.1	ribosomal protein large subunit 27	-15.77	-	-15.94
Eucgr.A01241.1	histone H2A 12	-	17.23	17.32
Eucgr.B00335.1	aldehyde dehydrogenase 10A8	-	14.98	15.13
Eucgr.F02551.1	rubredoxin-like superfamily protein	-	13.30	13.41
Eucgr.H00206.1	sieve element occlusion B*	-	14.91	14.68
Eucgr.H01176.4	glutathione S-transferase 6	-	14.88	15.07
Eucgr.K03300.3	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	-	16.20	15.90
Eucgr.H02489.1	mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	-	-13.74	-13.73

efeito codominante

Eucgr.B02162.1	photosystem I subunit E-2	-14.02	-14.79	-14.25
Eucgr.D00319.1	chlorophyll A/B binding protein 1	-14.55	-15.54	-15.39
Eucgr.J01502.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-16.53	-15.73	-15.94

efeito exclusivo

Eucgr.B01744.1	O-methyltransferase 1	-	-	14.49
Eucgr.H04433.2	gamma histone variant H2AX	-	-	17.55
Eucgr.D01798.1	VIRB2-interacting protein 1	-	-	13.24
Eucgr.E00001.1	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	-	-	13.68
Eucgr.E03875.1	O-methyltransferase 1	-	-	13.83
Eucgr.H01235.1	geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1	-	-	12.55
Eucgr.H03423.1	ribosomal protein S3Ae	-	-	15.19
Eucgr.I01803.1	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	-	-	16.42
Eucgr.I01807.1	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	-	-	12.83
Eucgr.K02223.1	ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	14.94
Eucgr.B01262.2	acyl carrier protein 3	-	-	-14.05
Eucgr.D00322.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	-	-	-18.10

Eucgr.D01115.1	ribosomal protein L3 family protein	-	-	-13.68
Eucgr.D02588.1	breast basic conserved 1	-	-	-14.92
Eucgr.F02754.1	thioredoxin superfamily protein	-	-	-17.07
Eucgr.J01096.1	photosystem I light harvesting complex gene 1	-	-	-15.49
Eucgr.K03545.1	CP12 domain-containing protein 1	-	-	-13.24
G5				
efeito dominante				
Eucgr.C00846.1	pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein	12.90	-	12.80
Eucgr.H01235.1	geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1	13.07	-	12.79
Eucgr.K01508.1	cobalamin-independent synthase family protein	14.05	-	13.64
Eucgr.L03049.1	thioredoxin M-type 4	-16.35	-	-15.88
Eucgr.L00271.3	inorganic H pyrophosphatase family protein	-15.24	-	-15.39
Eucgr.B02310.1	rubisco activase	-	14.58	14.22
Eucgr.J00176.1	ferritin 4	-	16.59	16.72
Eucgr.J00820.1	lipoxigenase 2	-	14.42	14.48
Eucgr.B01262.2	acyl carrier protein 3	-	-14.50	-14.43
Eucgr.I00441.1	ribosomal L29 family protein	-	-14.71	-14.27
efeito codominante				
Eucgr.B02294.2	adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	14.80	15.08	15.01
Eucgr.B02495.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	13.28	13.22	13.58
Eucgr.C03415.3	lycopene beta/epsilon cyclase protein	18.51	18.55	18.76
Eucgr.F01428.1	glutathione S-transferase TAU 19	-14.11	-13.66	-13.27
efeito inibitório				
Eucgr.H03865.1	osmotin 34	-14.48	-14.09	-
efeito exclusivo				
Eucgr.E03613.1	plastid developmental protein DAG, putative	-	-	13.56
Eucgr.H01629.1	thioredoxin F2	-	-	14.63
Eucgr.H02333.1	thioredoxin superfamily protein	-	-	16.48
Eucgr.H02679.1	serine hydroxymethyltransferase 4	-	-	14.82

Eucgr.J01372.1	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	-	-	13.79
Eucgr.A0020.1	homolog of carrot EP3-3 chitinase	-	-	-14.06
Eucgr.A02337.1	NADPH-dependent thioredoxin reductase C	-	-	-14.18
Eucgr.D02339.2	uncharacterized protein	-	-	-16.28
Eucgr.F00208.1	subtilisin-like serine endopeptidase family protein	-	-	-12.83
Eucgr.H00143.1	ATP citrate lyase (ACL) family protein	-	-	-14.41
Eucgr.H03983.1	MLP-like protein 423	-	-	-13.83
Eucgr.J01771.1	ARM repeat superfamily protein	-	-	-20.32

G6

efeito dominante

Eucgr.G03258.4	scarecrow-like 3	-	13.58	9.27
Eucgr.B01747.2	O-methyltransferase 1	-	14.35	14.47
Eucgr.J00820.1	lipoxigenase 2	-	-13.46	-13.18
Eucgr.F02130.1	G-box regulating factor 6	-	-15.43	-15.95

efeito exclusivo

Eucgr.B03013.1	ribose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	15.55
Eucgr.C03415.3	lycopene beta/epsilon cyclase protein	-	-	19.07
Eucgr.L00627.1	temperature-induced lipocalin	-	-	10.09
Eucgr.G01289.2	SWIB/MDM2 domain superfamily protein	-	-	9.86
Eucgr.K02223.1	ribose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	15.58
Eucgr.E00872.1	UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 5	-	-	-12.70
Eucgr.E02058.1	uncharacterized protein	-	-	-16.86
Eucgr.E02747.1	general regulatory factor 9	-	-	-14.20
Eucgr.F02017.1	aldolase superfamily protein	-	-	-13.23
Eucgr.G01960.3	acyl carrier protein 4	-	-	-14.71
Eucgr.H01016.1	CP12 domain-containing protein 2	-	-	-13.24
Eucgr.K03545.1	CP12 domain-containing protein 1	-	-	-13.29

^aTranscrito segundo o portal Phytozome para proteínas únicas. ^bAnotação funcional associadas ao identificador. ^cAbundância proteica normalizada (em log₂). ^e -log p-value (t-test). HT= 29°C; eCO₂: 680 ppm. Valores negativos indicam down-regulation e valores positivos up-regulation para a abundância. "-": ausência de abundância.

Uma hipótese que deve ser considerada é que a diversificação na abundância das proteínas dos poliploides, exceto para G4, pode ser atribuída à dosagem alélica, a qual está intimamente relacionada aos parentais envolvidos na hibridização (Birchler et al. 2005). A relação entre a expressão e a dose do alelo, ou seja, a sua quantidade, pode ser dependente ou independente (Shi et al. 2015). No estudo aqui conduzido, a abundância das proteínas indica ser independente, uma vez que todos os tetraploides são gerados a partir do mesmo parental (hibridização) e, posteriormente, seguidos juntos para o evento de duplicação. A independência da expressão está relacionada à dinâmica de diversos elementos envolvidos na ativação ou desligamento dos genes em diversos momentos do estágio de desenvolvimento (Shi et al., 2015), a exemplo dos elementos transponíveis e famílias de RNA (Hollister et al. 2011).

Para algumas espécies a diversidade dos alelos acarretada pela poliploidização só é desencadeada quando efetivamente em ambiente hostil ao seu desenvolvimento, demonstrado na espécie modelo *A. arenosa* (Baduel et al., 2018, 2019). E a diversidade alélica é obtida devido ao favorecimento do rompimento de ligações entre genes (crossing-over) e que tem maior probabilidade de ocorrência em regiões gênicas para características desfavoráveis ao desenvolvimento, e o comportamento é oposto para genes que conferem adaptabilidade (Schmickl e Yant, 2021). No entanto, para a dosagem alélica em poliploides, além da condição de recombinação entre o conjunto de cromossomos, há também a estabilidade no pareamento dos cromossomos. A proximidade evolutiva das espécies envolvidas em um alopoliploide pode levar a instabilidade durante a meiose ou perfeita estabilidade, como ocorre em *Brassicac*, a depender das espécies combinadas (Zhou et al., 2016).

Visando um melhor entendimento das funções desempenhadas pelas proteínas exclusivas ao efeito combinado do eCO₂ e da alta temperatura entre os genótipos, destacamos as proteínas que foram comuns à maioria dos genótipos e que apresentaram um aumento na sua abundância em pelo menos 2x quando comparada com a condição controle (Tabela 3).

A ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein (Eucgr.K02223.1) foi comum ao diploide G6 e aos poliploides G2, G3 e G4. No mesmo sentido, o tetraploide G3 e o diploide G6, apresentaram maior abundância da ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein

(Eucgr.B03013.1), assim como a lycopene beta/epsilon cyclase protein (Eucgr.C03415.3). O maior efeito da interação eCO₂ e alta temperatura está na abundância da enzima RuBisCO, por meio de duas proteofomas codificantes para a subunidade menor. É interessante notar que há predominância dos poliploides na maior abundância da RuBisCO. Por muitos motivos, o melhoramento genético clássico invariavelmente assume perdas de características em favorecimento de outras características. Galmés et al., (2019) pontuam a ausência de responsividade da RuBisCO a variações ambientais, que, no entanto, pode ser recuperada com o processo de formação de híbridos e até mesmo da duplicação cromossômica. Associado a isso está a sensibilidade da RuBisCO genótipo-dependente, como relatada em genótipos de arroz (Gesch et al., 2003).

A lycopene beta/epsilon cyclase protein (Eucgr.C03415.3) também teve aumento na abundância em condição combinada. As lycopene ciclases, beta (LCY-β) e épsilon (LCY-ε) são amplamente conhecidas pelo papel dinâmico em salvar o fotossistema (Pogson e Ressler, 2000) isso devido ao processo de conversão de licopeno a luteína na via de biossíntese de carotenoides (Song et al. 2016), e na atenuação do estresse oxidativo (Cantrell et al., 2003). Além disso, em plantas transgênicas para superexpressão da LCY-ε, foi constatado menor dano de membrana por meio da quantificação de MDA e aumento no conteúdo de peroxidase (SOD) e superóxido dismutase (POD) para atenuação do estresse quando comparadas com plantas selvagem, ambas sob estresse salino (Yin et al., 2020). Apesar de haver apenas comprovações quanto ao estresse salino e hídrico (Shi et al., 2015; Qingbo et al., 2019) os mecanismos para minimizar o estresse oxidativo independem da natureza do estressor, sendo assim, é possível que as lycopene ciclases estejam atuantes nos poliploides de eucalipto pelas mesmas razões.

Os poliploides G2, G3 e G4 compartilham a redução na abundância da acyl carrier protein 3 (Eucgr.B01262.2). Há diferentes isoformas para a acyl carrier protein (ACP's), no entanto, apesar de serem cofatores na rota dos ácidos graxos (Huang et al., 2017), o impacto individual de cada uma delas não é igualitário (Fu et al., 2020). A atuação das ACP's é a de prevenir os organismos de uma interferência direta do ambiente sobre o seu metabolismo, para isso

promove uma interface, através de camadas de cutícula, suberina e membranas (Beisson et al., 2007)

O diploide G6 e o tetraploide G4, tiveram a inibição na abundância da CP12 domain-containing protein 1 (Eucgr.K03545.1). Em consonância com a (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) e phosphoribulokinase (PRK), a CP12 atua no ciclo de Calvin (Gontero e Maberly, 2012). De modo que a CP12 está na forma de um complexo, em conjunto com GADPH e PRK para regular a atividade do ciclo de Calvin durante o ciclo circadiano das plantas (Tamoi et al., 2005). Marri et al. (2009) propõem a ação antagônica da CP12 e as tiorredoxinas, cuja maior proporção pode levar a impulsionar o ciclo na assimilação de CO₂ ou supressão dele, respectivamente. Além disso, quando em condições que perturbam o metabolismo e se faz a produção de espécies reativas de oxigênio, a CP12 atua sobre essas, impedindo que a fixação do carbono seja comprometida (Marri et al., 2014).

5.4. Alterações metabólicas das plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ e em alta temperatura.

No presente trabalho, foram identificadas proteoformas das 11 enzimas que atuam no Ciclo de Calvin-Benson (figura 5). Visando monitorar o efeito dos do eCO₂ e da alta temperatura no metabolismo das mudas de *Eucalyptus*, ressaltamos a somatória da abundância das proteoformas para cada enzima aqui identificadas (Tabela 4).

O ciclo é o responsável por captar CO₂ atmosférico, por meio das 13 reações, e gerar moléculas de carbono simples (Bassham et al., 1950). Nenhuma diferença estatística foi detectada entre os tratamentos ou entre os genótipos, no entanto, é notável uma tendência de aumento na abundância das enzimas quando em incremento de CO₂ apenas. Segundo Santos et al. (2014) a abundância das enzimas do Ciclo é mais pronunciada quando as mudas de *E. urophylla* são submetidas a atmosfera de 1000 ppm, concentração superior em mais de 30% da utilizada no nosso trabalho.

Contudo, em condição de aumento de temperatura somente ou combinada com o eCO₂, a abundância é bastante similar ao controle, sugerindo haver mecanismos de regulação ou até mesmo inibição pelo aumento em 4°C na temperatura.

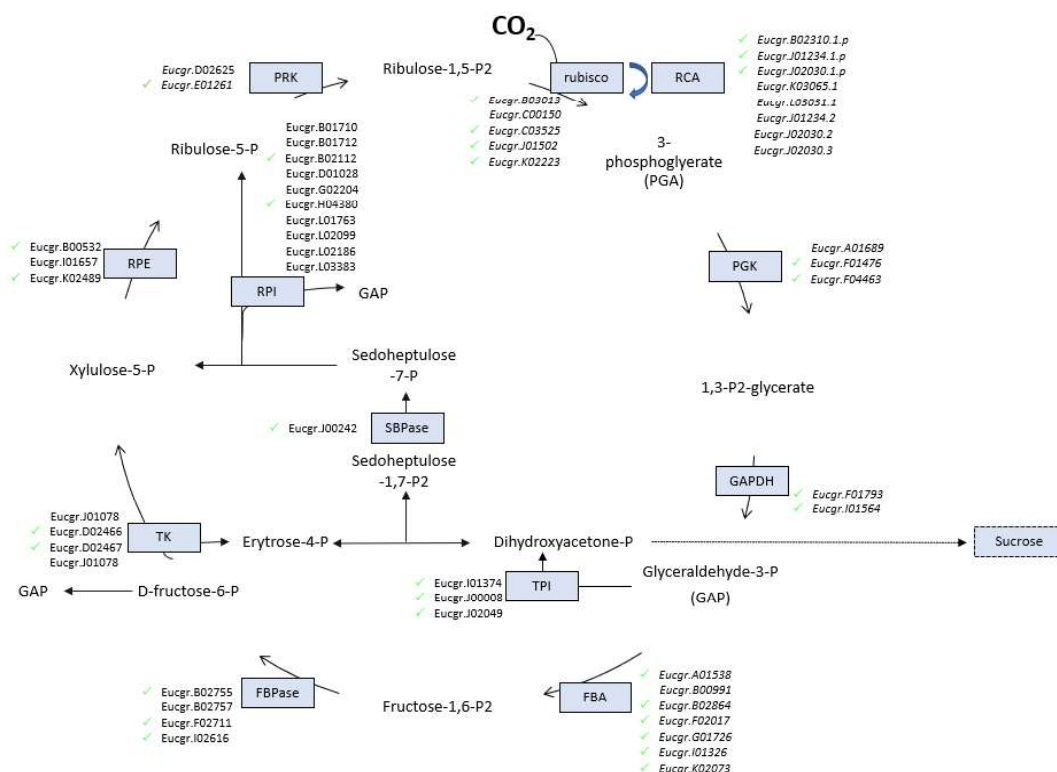


Figura 5. Proteoformas das enzimas do ciclo de Calvin identificadas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) quando cultivados em atmosfera enriquecida em CO_2 e alta temperatura. RBC: ribulose -1,5,bisphosphate carboxylase; PGK: phosphoglycerate kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TPI: triose phosphate isomerase; FBA: fructose-1,6-bisphosphate aldolase; FBPase: fructose-1,6-bisphosphatase; TK: transketolase; SBPase: sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; RPE: ribulose-5-phosphate 3-epimerase; RPI: ribose-5-phosphate isomerase; PRK: phosphoribulokinase. Símbolo “✓” indica que a proteína foi identificada por espectrometria de massas.

O perfil de abundância das proteínas (indicados na Tabela 3) quando confrontado com as abundâncias das enzimas do Ciclo de Calvin nos permite pontuar sobre alguns reguladores. A CP12, que é uma das candidatas em regular o funcionamento do ciclo, quando em ambiente de aumento CO_2 somente e combinado com o aumento da temperatura teve sua abundância reduzida em G2, G3, G4 e G6, no entanto, isso não refletiu diretamente para tornar o ciclo mais ou menos estimulado. As ferredoxin/thioredoxin (Fd/TRX) são importantes enzimas também envolvidas na regulação do Ciclo, atuando no status das reações para conversão da energia luminosa, sendo a thioredoxin abundante em nossas amostras (indicadas na Tabela 3). O mecanismo de atuação das thioredoxin, para a maioria das proteínas, é o de remover as pontes dissulfeto para convertê-las em funcional, no entanto, para um pequeno grupo, essa

remoção converte-as em não funcionais (González et al., 2014). Já a ferredoxin tanto no embrião, órgãos reprodutivos e vegetativos de *Arabidopsis* demonstram também ter o papel de detoxificação do metabolismo, e até mesmo em condições de ausência de estresse, concentrar enzimas responsáveis por inativar as ROS como prevenção de intempéries futuros (Ravet et al., 2009). Em nossos dados, as TRX foram mais abundantes entre os poliploides, mas de maneira muito particular dependendo do genótipo. Além disso, sinalizou ter efeito dominante ao CO₂ ou exclusivo, no entanto, também não demonstrou estar diretamente relacionada as respostas obtidas no ciclo.

É esperado que o enriquecimento da atmosfera em CO₂ contribua para aumento nas abundâncias das enzimas do Ciclo de Calvin, no entanto, outros fatores são essenciais para que isto ocorra, como: disponibilidade da 3PG, intensidade luminosa suficiente para gerar ATP, eficiente atividade da rubisco é mais importante que a quantidade, a fim de que a regeneração ocorra em tempo hábil e, por último, que as outras reações adjacentes ao ciclo de Calvin estejam em sincronia (Stitt et al., 2021).

Tabela 4: Somatória da abundância das enzimas do Ciclo de Calvin-Benson identificadas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) quando cultivados em atmosfera enriquecida em CO₂ e alta temperatura.

Enzima	Proteoforma	25_aCO ₂						25_eCO ₂						29_aCO ₂						29_eCO ₂					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6
PGK	Eucgr.F04463.1	13.5	14.4	14.6	14.8	14.3	14.5	13.7	14.4	14.3	14.6	14.4	14.2	13.6	14.4	14.7	14.6	14.7	14.5	13.4	14.7	14.5	14.7	14.7	14.6
	Eucgr.F01476.1	14.6	13.4	13.6	13.4	13.7	13.8	14.4	13.7	13.6	13.5	13.7	13.8	14.7	13.5	13.5	13.5	13.4	13.7	14.6	13.6	13.9	13.6	13.6	13.7
	RBCS/RBCL	Eucgr.B03013.1	13.4	13.0	12.0	12.6	13.4	13.7	13.6	14.2	12.2	11.8	8.5	13.3	13.6	12.9	14.1	13.6	14.0	14.6	12.8	14.0	14.5	13.3	13.6
	Eucgr.C03525.1	19.0	19.0	19.0	19.5	19.3	19.0	18.9	19.0	19.4	18.5	19.0	18.8	18.5	19.6	19.2	18.7	18.9	19.0	19.3	18.4	18.1	18.8	19.0	19.7
	Eucgr.J01502.1	17.6	16.3	17.3	18.0	16.2	17.3	16.4	16.0	16.3	16.5	16.8	16.4	16.4	15.4	16.7	15.7	15.9	15.4	15.5	16.1	15.2	15.9	15.7	15.9
	Eucgr.K02223.1	14.2	14.0	14.1	13.9	14.6	14.4	14.5	14.7	14.4	14.3	14.1	14.2	14.9	14.5	14.8	14.9	15.0	15.1	14.6	15.1	15.5	14.9	14.8	15.6
GAPDH	Eucgr.F01793.1	15.8	15.5	15.7	15.8	15.6	15.7	15.5	15.8	15.6	15.7	15.7	15.5	15.9	15.7	15.8	15.8	15.9	15.7	15.7	15.8	15.9	15.7	15.8	15.9
	Eucgr.I01564.1	14.5	14.2	14.5	14.5	14.3	14.5	14.3	14.4	14.1	14.5	14.4	14.2	14.7	14.2	14.8	14.5	14.6	14.5	14.3	14.6	14.7	14.6	14.6	14.8
TPI	Eucgr.I01374.1	13.6	13.8	13.7	13.5	13.9	13.7	13.8	13.9	13.8	13.9	13.7	13.9	13.9	13.9	14.2	13.9	13.8	13.9	13.8	13.9	13.8	13.9	13.6	13.7
	Eucgr.J00008.1	13.8	13.8	13.9	13.7	13.8	13.8	13.8	14.0	14.0	13.8	13.9	13.8	13.5	14.4	13.6	13.6	13.6	13.7	13.5	13.7	13.6	13.6	13.4	13.7
	Eucgr.J02049.2	0.0	4.4	4.5	0.0	0.0	0.0	9.3	9.4	14.3	9.2	0.0	9.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.0	4.4	4.7	0.0	4.2
FBA	Eucgr.A01538.1	15.2	15.4	15.5	15.2	15.4	15.3	14.9	15.1	15.3	15.0	15.2	15.1	14.9	15.4	14.8	14.8	14.8	14.9	15.0	14.7	14.9	14.6	15.1	14.6
	Eucgr.B02864.2	4.9	15.1	14.5	4.8	9.9	4.7	14.8	14.6	15.0	9.6	9.9	15.1	9.9	9.7	0.0	0.0	0.0	4.8	9.9	4.8	9.9	4.8	14.7	0.0
	Eucgr.F02017.1	14.4	14.0	14.3	14.4	14.1	14.3	13.7	14.0	13.8	14.2	14.2	13.9	14.3	14.1	13.9	14.0	14.1	14.0	14.1	14.2	13.8	13.9	14.2	13.2
	Eucgr.G01726.1	15.9	15.7	16.0	16.0	15.7	15.9	15.5	15.7	15.8	15.7	15.8	15.6	15.8	16.1	15.6	15.8	15.9	15.7	15.8	15.6	15.5	15.6	15.7	15.5
	Eucgr.I01326.1	14.7	13.2	14.7	14.5	14.3	14.7	14.5	14.5	14.2	14.5	14.5	14.4	14.8	14.1	14.5	14.7	14.7	14.4	14.3	14.5	14.6	14.3	14.7	14.4
	Eucgr.K02073.1	13.5	14.4	14.5	13.9	14.2	14.3	14.5	14.1	14.9	13.4	14.1	14.5	13.7	14.7	14.1	14.2	14.0	14.0	13.6	13.6	13.5	8.8	14.4	13.3
FBPase	Eucgr.B02755.1	15.0	14.6	14.9	15.1	14.9	14.9	14.8	14.8	14.6	15.0	14.9	14.7	15.1	15.0	15.1	15.0	15.0	14.9	14.9	15.0	14.8	14.9	15.0	14.8
	Eucgr.F02711.1	13.9	14.0	14.1	14.2	14.2	14.1	13.7	13.8	13.8	14.0	14.0	13.9	14.2	13.9	13.6	14.0	14.1	14.0	14.0	14.0	13.7	13.9	14.2	13.5
	Eucgr.I02616.1	12.2	12.2	12.0	8.5	8.0	12.2	12.7	12.5	12.4	12.5	12.5	12.4	12.4	11.5	12.5	12.8	12.8	12.6	8.0	12.6	12.9	12.8	12.6	12.6
TK	Eucgr.D02466.1	0.0	0.0	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	5.7	12.0	5.8	0.0	0.0	5.8	0.0	0.0	5.8	5.9	0.0	0.0	5.7	0.0	0.0
	Eucgr.D02467.1	14.7	14.5	14.6	14.7	14.6	14.5	14.4	14.5	14.5	14.5	14.7	14.6	14.4	14.6	14.8	14.7	14.6	14.5	14.5	14.5	14.3	14.4	14.5	14.5
	SBPase	Eucgr.J00242.1	14.2	14.4	14.5	14.9	14.7	14.3	14.5	14.8	14.5	14.8	14.4	14.3	14.1	14.4	14.2	14.4	14.6	14.5	14.7	14.4	15.1	14.6	14.4
RPE	Eucgr.B00532.5	14.8	14.5	14.6	14.6	14.2	14.5	14.4	14.2	14.1	14.7	14.3	14.3	14.7	14.1	14.6	14.5	14.8	14.5	14.5	14.7	14.6	14.5	14.8	14.6
	Eucgr.K02489.2	14.7	9.7	14.4	14.6	14.1	14.4	14.4	14.3	13.8	14.5	14.2	14.2	14.6	14.0	9.6	14.4	14.4	14.3	14.4	14.5	14.5	14.5	14.6	14.5
	RPI	Eucgr.B02112.1	14.2	14.0	14.1	14.3	14.2	14.3	14.2	14.0	14.1	14.2	14.1	14.2	14.4	14.3	14.0	14.0	13.9	14.0	14.2	14.0	14.4	13.9	14.4
	Eucgr.H04380.1	14.1	9.3	14.1	13.7	13.9	14.0	14.1	13.8	13.5	13.3	13.4	13.5	14.5	14.0	13.6	13.6	13.4	13.9	13.9	13.8	13.6	13.8	13.8	13.7
	PRK	Eucgr.E01261.2	13.6	13.6	13.7	13.5	13.6	13.7	13.6	13.8	13.4	13.6	13.6	13.5	13.9	13.5	14.0	13.9	14.0	14.0	13.7	14.0	14.2	14.0	13.9
Σlog2		370.1	370.3	388.9	366.6	369.2	370.5	386.8	393.5	389.8	386.0	380.1	391.9	375.6	372.4	365.6	363.5	364.9	375.1	377.4	368.9	378.5	372.7	379.0	369.3

O Ciclo do ácido tricarboxílico é composto por oito enzimas principais responsáveis pela incorporação do carbono nas mitocôndrias. O ciclo é responsável pela respiração mitocondrial, produção energética e fonte de esqueletos carbônicos para outras rotas (Fernie et al., 2004).

Foram identificadas ao menos duas proteoformas de cada uma das enzimas do ciclo (Figura 6). Assim como para as enzimas do Ciclo de Calvin-Benson, a abundância de cada uma das enzimas do ciclo foi calculada e a somatória da contribuição da abundância de todas as suas proteoformas identificadas (Tabela 5). Os genótipos G1 e G3 se diferenciam entre si a partir da somatória de todas as enzimas do ciclo. Este resultado ressalta a diferenciação imposta pela duplicação induzida sobressaindo a imposição do aumento de temperatura e concentração de CO₂.

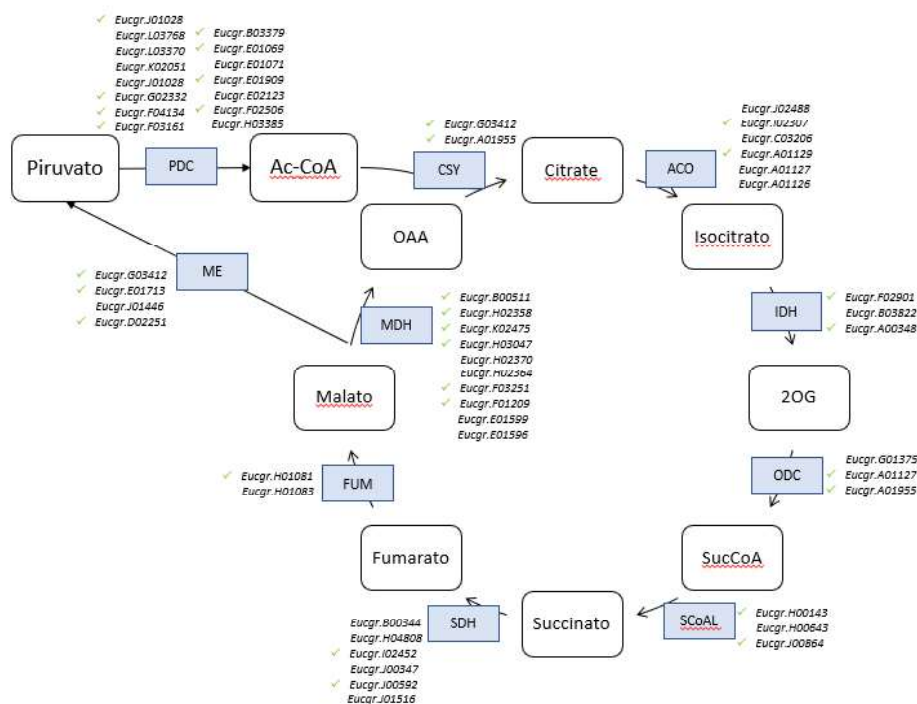


Figura 6. Proteoformas das enzimas do TCA identificadas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) quando cultivados em atmosfera enriquecida em CO₂ e alta temperatura. CSY: citrate synthase; ACO: aconitase; DH: isocitrate dehydrogenase; ODC: oxoglutarate dehydrogenase complex; SCoAL: succinyl-CoA ligase; SDH: succinate dehydrogenase; FUM: fumarate; MDH: malate dehydrogenase; ME: malic enzyme; PDC: pyruvate dehydrogenase complex. Símbolo "✓" indica a proteína identificadas por espectrometria de massas nas amostras.

Apesar da ausência de diferença significativa, os genótipos G1 e G6 apresentaram uma tendência em aumentar o acúmulo das enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico quando em aumento de temperatura, a qual é reduzida quando combinado com o CO₂. No entanto, para os outros genótipos não conseguimos identificar a mesma tendência.

Com o aumento na concentração de CO₂ é possível que tenha existido um aumento na expressão de enzimas de outras rotas biossintéticas em razão da maior oferta dos esqueletos carbônicos oriundos do CBB (Austen et al., 2019). Além disso, a maior oferta de carbono pode conferir respostas metabólicas mais rápidas frente a estresses (Wahid et al., 2012), como lançando a estratégia de sintetizar compostos antioxidantes e termotolerantes (Austen, 2019). Tamaoki et al. (2003) já sugeriram a variação genética natural em *Arabidopsis* como a responsável pela tolerância ao dano oxidativo.

Tabela 5: Somatória da abundância das enzimas do Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) identificadas em genótipos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) quando cultivados em atmosfera enriquecida em CO₂ e alta temperatura.

Eucgr.F02506.1	17.0	16.6	16.4	17.2	17.3	16.7	16.6	17.0	17.0	16.6	16.5	11.5	10.9	11.3	16.7	16.5	16.4	10.9	11.3	16.4	11.1	5.3	11.1	11.3
Eucgr.G02332.1	0.0	5.6	16.4	10.5	16.4	11.1	10.9	5.5	5.5	16.4	5.4	0.0	5.4	10.4	5.5	11.2	16.4	16.7	10.9	5.5	5.5	5.6	11.1	11.2
Eucgr.F04134.1	13.0	13.5	13.5	8.8	8.6	13.1	13.8	13.5	13.4	13.7	13.6	13.6	13.0	12.2	13.5	13.3	13.7	13.6	13.5	9.2	13.9	13.8	13.8	13.8
Eucgr.F03161.3	16.1	10.7	10.6	10.6	16.3	10.6	5.4	11.0	15.8	5.5	10.6	5.3	5.2	10.8	10.3	5.3	15.7	10.7	5.4	0.0	5.4	5.0	10.8	5.6
	242.0 ^b	289.5 ^{ab}	362.3 ^a	320.1 ^{ab}	288.3 ^{ab}	258.7 ^{ab}	319.4	314.5	307.3	273.6	273.1	298.2	263.3	269.5	273.5	286.2	307.9	315.1	325.6	252.5	352.2	286.5	345.2	286.7

Abundância normalizada (log2). Letras indicam significância estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$) apenas para a condição controle (25°C_aCO₂).

6. CONCLUSÃO

As plantas dos tetraploides somáticos apresentaram o mesmo padrão de resposta fenotípica que o parental diploide. O crescimento em atmosfera enriquecida de CO₂ foi caracterizado pela diminuição da área foliar, fenótipo esse revertido quando as plantas foram cultivadas sob estímulo combinado de alto CO₂ e alta temperatura. Vale ressaltar que essa condição de cultivo também induziu diminuição na ramificação lateral das plantas. Nas condições de cultivo aqui avaliadas não houve indução de estresse oxidativo e danos celulares nos genótipos.

A abundância das proteínas dos genótipos tetraploides não apresentou grande diferença na expressão constitutiva de genes em relação ao genótipo diploide. No entanto, o crescimento em alta temperatura induziu as maiores diferenças proteicas nos genótipos aqui avaliados, incluindo proteínas únicas, que não haviam sido induzidas quando as plantas foram individualmente estimuladas.

A proteômica de interpretação dirigida para as enzimas do Ciclo de Calvin e Ciclo do ácido tricarboxílico indicou a mesma tendência de aumento para ambos os metabolismos estudados quando os genótipos se desenvolveram em atmosfera enriquecida por CO₂ somente quando em alta temperatura ou condição combinada, as enzimas do CBB e do TCA apresentaram mesmo padrão de abundância que na condição controle.

7. REFERÊNCIAS

- Albaugh JM, Dye PJ, King JS (2013) Eucalyptus and Water Use in South Africa. **International Journal of Forestry Research** 2013:1–11.
- Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H. (2006). Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. **Genetics** 173, 1101–1113.
- Alexieva V. et al. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment** 24:1337–1344.

Aspinwall MJ, Blackman CJ, Dios VR, et al. 2018. Photosynthesis and carbon allocation are both important predictors of genotype productivity responses to elevated CO₂ in *Eucalyptus camaldulensis*. **Tree Physiology** 38: 1286-1301.

Austen N, Walker HJ, Lake JA, Phoenix GK and Cameron DD (2019) The Regulation of Plant Secondary Metabolism in Response to Abiotic Stress: Interactions Between Heat Shock and Elevated CO₂. **Front. Plant Sci.** 10:1463. doi: 10.3389/fpls.2019.01463.

Gontero B, Maberly SC (2012) An intrinsically disordered protein, CP12: jack of all trades and master of the Calvin cycle. **Biochem Soc Trans.** 40:995–999. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20120097>

Baduel P, Hunter B, Yeola S, Bomblies K (2018) Genetic basis and evolution of rapid cycling in railway populations of tetraploid *Arabidopsis arenosa*. **PLoS Genetics** 14: e1007510.

Baduel P, Quadrana L, Hunter B, Bomblies K, Colot V (2019) Relaxed purifying selection in autopolyploids drives transposable element over-accumulation which provides variants for local adaptation. **Nature Communications** 10: 1– 10.

Baldassi AC, dos Santos BM, Balbuena TS (2018) Carbon dioxide induces minor antioxidant responses in *Eucalyptus urophylla* chloroplasts. **Trees** 32:1481–1485 <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1750-8>.

Bassham, JA, Benson AA, Calvin M (1950). The path of carbon in photosynthesis. **J. Biol. Chem.** 185, 781–787.

Birchler JÁ, Riddle NC, Auger DL, Veitia RA (2005) Dosage balance in gene regulation: biological implications. **Trends Genet.** 21:219–226.

Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M e Ohlrogge JB (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 19:351-368.

Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F (2010) Ferritins and iron storage in plants. **Biochim Biophys Acta.** 1800:806-814. doi:10.1016/j.bbagen.2009.12.003

Bruderer R, Bernhardt OM et al. (2015) Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to

acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. **Mol Cell Proteomics** 14:1400–1410. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044305>.

Buggs RJA (2013) Unravelling gene expression of complex crop genomes. **Heredity** 110:97–98. Doi:10.1038/hdy.2012.61.

Cantrell A, McGarvey DJ, Truscott TG, Rancan F, Böhm F (2003) Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Arch. Biochem. Biophys.** 412:47-54. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00014-6)

Castellano GR, Camarinho RJ, Arthur Junior JC, Sixel RMDM, Silva PHM (2013) Crescimento de eucaliptos quase centenários no Horto de Rio Claro. CIRCULAR TÉCNICA IPEF, 12p (Documento, 205) <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3812/ipef-circular-tecnica-2013-agosto-n-205.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Castro CAO, Resende RT, Bhering LL (2016) Brief history of Eucalyptus breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência rural** 46:155-1593. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150645>.

Chen L, Kuai P, Ye M, Zhou S, Lu J, Lou Y (2020) Overexpression of a Cytosolic 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Gene Enhances the Resistance of Rice to *Nilaparvata lugens*. **Plants** 9:1529. <https://doi.org/10.3390/plants9111529>

Chen R, Feng Z, Zhang X, Song Z, Cai D (2021) A New Way of Rice Breeding: Polyploid Rice Breeding. **Plants**, 10:422. <https://doi.org/10.3390/plants10030422>.

Chen ZJ, Ni Z (2007) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **Bioessays**, 28:240-252.

Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. **Ann. Rev. Plant Biol**, 58:377–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103835.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004) Molecular Genetic Perspectives on Cross-Talk and Specificity in Abiotic Stress Signalling in Plants. **Journal of Experimental Botany**, 55:225-236. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh005>.

Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics** 6: 836– 846.

Comastri A, Janni M, Simmonds J, Uauy C, Pignone D, Nguyen HT, Marmiroli N (2018) Heat in wheat: exploit reverse genetic techniques to discover new alleles within the *Triticum durum* sHsp26 family. **Frontiers in Plant Science**, 9, 1337.

Coppen, JJW (2002) *Eucalyptus: the genus Eucalyptus*. (Taylor & Francis).

de Santana Costa MG, Mazzafera P, Balbuena TS (2017) Insights into temperature modulation of the *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* antioxidant and lignification subproteomes. **Phytochemistry**, 137:15-23. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.017>.

Denaeghel HER, Van Laere K, Leus L, Lootens P, Van Huylenbroeck J and Van Labeke M-C (2018) The Variable Effect of Polyploidization on the Phenotype in *Escallonia*. **Front. Plant Sci.** 9:354. doi: 10.3389/fpls.2018.00354.

Dermody O, Long SP, DeLucia EH (2006) How does elevated CO₂ or ozone affect the leaf-area index of soybean when applied independently? **New Phytologist**, 169:145-155.

Dong S, Adams KL (2011) Differential contributions to the transcriptome of duplicated genes in response to abiotic stresses in natural and synthetic polyploids. **New Phytologist**, 190: 1045-1057. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03650.x>

Dos Santos BM, Balbuena TS (2017) Carbon assimilation in *Eucalyptus urophylla* grown under high atmospheric CO₂ concentrations: A proteomics perspective. **Journal of proteomics**, 150:252-257.

Drake JE, Aspinwall MJ, Pfautsch S, Rymer PD, Reich PB, Smith RA, Crous KY, Tissue DT, Ghannoum O, Tjoelker MG (2015) The capacity to cope with climate warming declines from temperate to tropical latitudes in two widely distributed *Eucalyptus* species. **Global Change Biology** 21:459-472.

Duursma RA, Gimeno TE, Boer MM, Crous KY, Tjoelker MG, Ellsworth DS (2016). Canopy leaf area of a mature evergreen *Eucalyptus* woodland does not

respond to elevated atmospheric [CO₂] but tracks water availability. **Global change biology**, 22:1666-1676.

Ellis RH, Craufurd PQ, Summerfield RJ, Roberts EH (1995) Linear Relations between Carbon Dioxide Concentration and Rate of Development Towards Flowering in Sorghum, Cowpea and Soyabean. **Annals of Botany**, 75:193–198. <http://www.jstor.org/stable/42761682>.

Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport **Curr. Opin. Plant Biol.**, 7: 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007>.

Ferreira S, Hjernø K, et al. (2006) Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. **Ann Bot**, 98: 361-377.

Flores TB, Alvares CA, Souza VC, Stape JL (2016). *Eucalyptus no Brasil: zoneamento climático e guia para identificação*. Piracicaba: IPEF. 447 p.

Galmés J, Capó-Bauçà S, Niinemets Ü, Iñiguez C (2019) Potential improvement of photosynthetic CO₂ assimilation in crops by exploiting the natural variation in the temperature response of Rubisco catalytic traits. **Current opinion in plant biology**, 49: 60-67.

Gesch RW, Kang IH, GALLO-MEAGHER MARIA, Vu JCV, Boote KJ, ALLEN LR, BOWES G (2003) Rubisco expression in rice leaves is related to genotypic variation of photosynthesis under elevated growth CO₂ and temperature. **Plant, Cell & Environment**, 26:1941-1950. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01110.x>

Glombik M, Bačovský V, Hobza R, Kopecký D (2020) Competition of Parental Genomes in Plant Hybrids. **Front Plant Sci** 25. doi: 10.3389/fpls.2020.00200. PMID: 32158461; PMCID: PMC7052263.

Goodstein DM et al, (2012), Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, **Nucleic Acids Res.** 40:1178-1186

González A, Moenne F, Gómez M, Sáez CA, Contreras RA, Moenne A (2014) Oligo-carrageenan kappa increases NADPH, ascorbate and glutathione syntheses and TRR/TRX activities enhancing photosynthesis, basal metabolism,

and growth in Eucalyptus trees. **Front. Plant Sci.** 5:512. doi: 10.3389/fpls.2014.00512.

Gratão PL, Monteiro CC, et al. (2012) Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 56:79-96.

Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into Eucalyptus breeding. **Genetic and molecular research** 3:369-379.

Grattapaglia D (2012) Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes** 8:463–508. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0491-x>.

Grover CE, Gallagher JP, Szadkowski E, Yoo M-J, Flagel LE, Wendel JF (2012). Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploids. **New Phytologist** 196: 966–971.

Guo L, Xu W, Zhang Y, Zhang J, Wei Z (2017) Inducing triploids and tetraploids with high temperatures in Populus sect. Tacamahaca. **Plant Cell Rep.** 36 313–326. 10.1007/s00299-016-2081-0.

Hao DC, Gu XJ, Xiao PG (2015) High-throughput sequencing in medicinal plant transcriptome studies. Chemistry, **Biology and Omics: Medicinal Plants**. 49-96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00002-5>.

Hartmann H, Bahn M, Carbone M, Richardson AD (2020) Plant carbon allocation in a changing world—challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon allocation. **New Phytologist**, 227:981-988.

Hollister JD (2015) Polyploidy: adaptation to the genomic environment. **New Phytol**, 205: 1034-1039. <https://doi.org/10.1111/nph.12939>.

Hollister JD Smith LM Guo YL Ott F Weigel D Gaut BS (2011) Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between Arabidopsis thaliana and Arabidopsis lyrata. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108:2322–2327.

Hu G, Houston NL, et al. (2011) Genomically biased accumulation of seed storage proteins in allopolyploid cotton. **Genetics** 189: 1103–1115.

Hu X, Yang Y, et al. (2015) Protein sHSP26 improves chloroplast performance under heat stress by interacting with specific chloroplast proteins in maize (*Zea mays*). **J. Proteom.** 2015 81–92. 10.1016/j.jprot.2014.12.009

Huang G, Rymer PD, Duan H, Smith RA, Tissue DT (2015) Elevated temperature is more effective than elevated [CO₂] in exposing genotypic variation in *Telopea speciosissima* growth plasticity: implications for woody plant populations under climate change. **Glob Change Biol**, 21: 3800-3813. <https://doi.org/10.1111/gcb.12990>.

Huang J, Xue C, Wang H, Wang L, Schmidt W, Shen R, Lan P (2017) Genes of ACYL CARRIER PROTEIN Family Show Different Expression Profiles and Overexpression of ACYL CARRIER PROTEIN 5 Modulates Fatty Acid Composition and Enhances Salt Stress Tolerance in Arabidopsis. **Front. Plant Sci.** 8:987. doi: 10.3389/fpls.2017.00987.

IBA, 2022 (Industria Brasileira de Árvores) (2022) Relatório Anual 2022. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>.

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, Cambridge (2022), pp.3-33, doi:10.1017/9781009325844.001.

Islam N, Tsujimoto H, Hirano H (2003) Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interaction in protein expression. **Proteomics**. 3:549-557. doi:10.1002/pmic.200390068

Qingbo k, et al. (2019) "Down-regulation of lycopene ϵ -cyclase expression in transgenic sweet potato plants increases the carotenoid content and tolerance to

abiotic stress." **Plant science.** 281:52-60.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.002>

Koh J, Chen S, Zhu N, Yu F, Soltis PS, Soltis DE (2012) Comparative proteomics of the recently and recurrently formed natural allopolyploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae) and its parents. **New Phytologist**, 196: 292-305.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04251.x>.

Kumar R, Joshi R, Kumari M, Thakur R, Kumar D, Kumar S (2020) Elevated CO₂ and temperature influence key proteins and metabolites associated with photosynthesis, antioxidant and carbon metabolism in *Picrorhiza kurroa*. **Journal of proteomics**, 219. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103755>.

Marri L, Thieulin-Pardo G, Lebrun R, Puppo R, Zaffagnini R, Trost P, Sparla F (2014) CP12-mediated protection of Calvin–Benson cycle enzymes from oxidative stress. **Biochimie.** 97:228-237.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.018>

Marri L, Zaffagnini M, et al. (2009) Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. **Mol. Plant.** 2:259–269. doi: 10.1093/mp/ssn061

Yin L, Liu JX, Tao JP, Xing GM, Tan GF, Li S, Xiong AS (2020) The gene encoding lycopene epsilon cyclase of celery enhanced lutein and β -carotene contents and confers increased salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 157:339-347.

Lee DG, Ahsan N, Lee SH et al. (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. **Proteomics**, 7: 3369-3383.

Leitch AR, Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, 320:481-483. DOI: 10.1126/science.1153585.

Li J, Wang Y, Wei H, Kang X (2021) Comparative proteomic analysis provides insight into the molecular mechanism of vegetative growth advantage in allotriploid *Populus*. **Genomics**, 113:1180-1192.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.002>.

Maher T, Mirzaei M, Pascovici D, Wright IJ, Haynes PA, Gallagher RV (2019) Evidence from the proteome for local adaptation to extreme heat in a widespread tree species. **Functional Ecology**, 33:436-446. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13260>.

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends Plant Sci.** 11:15-19. doi:10.1016/j.tplants.2005.11.002.

Mittler R, Blumwald E (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annu Rev Plant Biol.** 61:443-462. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112116.

Morison JIL, Lawlor DW (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. **Plant, Cell & Environment**, 22: 659-682. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x>.

Nessaty VJ, Suter MJF (2008) Analysis of environmental stress response on the proteome level. **Mass Spectrometry Reviews** 27:556-574.

Ng, DK, Zhang C, et al. (2012) Proteomic divergence in Arabidopsis autopolyploids and allopolyploids and their progenitors. **Heredity** 108:419–430. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.92>.

NOAA. National Centers for Environmental information, Climate at a Glance: Global Time Series, published December 2022, retrieved on January 10, (2023) from <https://www.ncei.noaa.gov/access/monitoring/climate-at-a-glance/global/time>.

Paludzyszyn Filho E, Santos PET (2011) Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas. **Embrapa Florestas**, v. Documentos, n. ISSN 1980-3958, p. 68.

Pandey P, Ramegowda V and Senthil-Kumar M (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. **Front. Plant Sci.** 6:723. doi: 10.3389/fpls.2015.00723

- Parcerisa IL, Rosano GL, Ceccarelli EA (2020) Biochemical characterization of ClpB3, a chloroplastic disaggregase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol** 104:451–465. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01050-7>
- Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B and Gechev TS (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Front. Plant Sci.** 6:69. doi: 10.3389/fpls.2015.00069.
- Pinto SS, Martins AO, Fontes LF (2022) Elevated [CO₂] mitigates the impacts of heat stress in eucalyptus seedlings. **Theoretical and Experimental Plant Physiology** 34: 447-462. <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00257-x>.
- Pogson BJ, Rissler HM (2000) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. **Philos T Roy Soc B.** 355:1395–403.
- Rao S, Tian Y, et al. (2020) Chromosome doubling mediates superior drought tolerance in *Lycium ruthenicum* via abscisic acid signaling. **Hortic Res**, 40. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0260-1>.
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 57:400-412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x>
- Riley R e Chapman V (1958) Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. **Nature**, 182:713-715.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiol.** 130:1143-1151. doi:10.1104/pp.006858.
- Rogers A, Allen DJ, Davey PA, et al. (2004). Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under Free-Air Carbon dioxide Enrichment. **Plant, Cell & Environment** 27: 449 – 458.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, CR Pounds JA. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. **Nature** 421: 57– 60.
- Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H, Marcus K (2021). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. In: Marcus, K.,

Eisenacher, M., Sitek, B. (eds) Quantitative Methods in Proteomics. Methods in **Molecular Biology**, vol 2228. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8.

Ruiz M, Oustric J, Santini J, Morillon R (2020) Synthetic polyploidy in grafted crops. **Frontiers in Plant Science**, 11-1586. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.540894>.

Sajic T, Liu Y, Aebersold R (2015) Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: perspectives and clinical applications. **Proteomics Clin Appl** 9:307–321. <https://doi.org/10.1002/prca.201400117>.

Salvato FC, Carvalho MCGC (2010) Methods and strategies in proteomics and their applications in plants. **Cienc Rural** 40:727-734.

Schmickl R. e Yant L (2021), Adaptive introgression: how polyploidy reshapes gene flow landscapes. **New Phytol**, 230: 457-461. <https://doi.org/10.1111/nph.17204>.

Shi X, Zhang C, et al. (2015) Genome-Wide Dosage-Dependent and -Independent Regulation Contributes to Gene Expression and Evolutionary Novelty in Plant Polyploids, **Molecular Biology and Evolution**, 32:2351–2366, <https://doi.org/10.1093/molbev/msv116>.

Silva AJ, Carvalho CR, Clarindo WR (2019) Chromosome set doubling and ploidy stability in synthetic auto- and allotetraploid of Eucalyptus: from in vitro condition to the field. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 138:387–394 <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01627-1>.

Skylas DJ, Cordwell SJ, Hains PG et al. (2002) Heat shock of wheat during grain filling: proteins associated with heat-tolerance. **J Cereal Sci**, 35:175-188.

Soltis DE, Misra BB, Shan S, Chen S, Soltis PS (2016) Polyploidy and the proteome. **Biochim Biophys Acta** 1864:896-907. [doi:10.1016/j.bbapap.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.03.010).

Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. **Proc Natl Acad Sci USA** 92:7719–7723. doi: 10.1073/pnas.92.17.7719.

Song MJ, Potter BI, Doyle JJ, Coate JE (2020). Gene Balance Predicts Transcriptional Responses Immediately Following Ploidy Change in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell** 32:1434-1448. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.19.00832.

Song X, Diao, et al. (2016) Overexpression of lycopene ϵ -cyclase gene from *lyceum chinense* confers tolerance to chilling stress in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**. 576:395-403. doi:10.1016/j.gene.2015.10.051

Sork VL, Aitken SN, Dyer RJ, Eckert AJ, Legendre P, Neale DB (2013) Putting the landscape into the genomics of trees: Approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. **Tree Genetics and Genomes** 9:901–911. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0596-x>.

Stebbins GL (1947) Types of polyploids: their classification and significance. **Adv Genet** 1:403–429.

Stitt M, Borghi GL, et al. (2021) Targeted metabolite profiling as a top-down approach to uncover interspecies diversity and identify key conserved operational features in the Calvin–Benson cycle, **Journal of Experimental Botany** 72: 5961–5986, <https://doi.org/10.1093/jxb/erab291>

Sterck L, Rombauts S, Vandepoele K, Rouzé P, Van de Peer Y (2007) How many genes are there in plants (... and why are they there)? **Curr Opin Plant Biol.** 10:199-203. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.01.004>

Syngelaki E, Paetzold C, Hörandl E (2021) Gene Expression Profiles Suggest a Better Cold Acclimation of Polyploids in the Alpine Species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). **Genes**. 12:1818. <https://doi.org/10.3390/genes12111818>.

Tamaoki M, Matsuyama T, et al. (2003) Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. **Planta**. 216:552-560. doi:10.1007/s00425-002-0894-2.

Tambarussi EV, Pereira FB, da Silva PHM et al. (2018) Are tree breeders properly predicting genetic gain? A case study involving *Corymbia* species. **Euphytica** 214:150-161. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2229-9>.

Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S (2005) The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. **The Plant Journal**, 42: 504-513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02391.x>.

Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, **Nat Protocols** 11:2301–2319.

Vu LD, Xu X, Gevaert K, De Smet I (2019) Developmental Plasticity at High Temperature, **Plant Physiology**, 181:399–411. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00652>.

Wahid A, Farooq M, Hussain I, Rasheed R, Galani S (2012). Responses and management of heat stress in plants, in *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Eds. Ahmad, P., Prasad, M. N. V. (New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer). doi: 10.1007/978-1-4614-0815-4_6.

Wang J, Li Y, Wei H, Kang X (2021) Comparative proteomic analysis provides insight into the molecular mechanism of vegetative growth advantage in allotriploid *Populus*. **Genomics**, 113:1180-1192. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.002>.

Wang P, Grimm B (2021) Connecting Chlorophyll Metabolism with Accumulation of the Photosynthetic Apparatus. **Trends in Plant Science** 26:484–495. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.005>.

Wang Y, Wang X, Paterson AH (2012) Genome and gene duplications and gene expression divergence: a view from plants. **Annals of the New York Academy of Science** 1256: 1–14. doi/10.1111/j.1749-6632.2011.06384.x.

Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany** 47:325-338.

Way DA, Oren R (2010) Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. **Tree Physiology** 30:669–688.

Wujeska-Klaue A, Crous KY, Ghannoum O, Ellsworth DA. 2019. Lower photorespiration in elevated CO₂ reduces leaf N concentrations in mature Eucalyptus trees in the field. **Global Change Biology** 20: 1282-1295.

Fu X, Guan X, Garlock R, Nikolau BJ (2020) Mitochondrial fatty acid synthase utilizes multiple acyl carrier protein isoforms. **Plant Physiology**, 183:547–557. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01468>

Xi L, Xu K, Qiao Y, Qu S, Zhang Z, Dai W (2011) Differential expression of ferritin genes in response to abiotic stresses and hormones in pear (*Pyrus pyrifolia*). **Mol. Biol. Rep.**, 38: 4405-4413. doi:10.1007/s11033-010-0568-2

Shi X et al. (2015) Genome-Wide Dosage-Dependent and Independent Regulation Contributes to Gene Expression and Evolutionary Novelty in Plant Polyploids **Molecular Biology and Evolution** 32:2351–2366, <https://doi.org/10.1093/molbev/msv116>.

Yibo J, Yongjuan Z, Shukang A, Xiujiac C, Xiaomin L, Hongying W, Yunqi H, Fengwang M, Chao L (2022) Induction of polyploid *Malus prunifolia* and analysis of its salt tolerance, **Tree Physiology** 42:2100–2115, <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac053>.

Yoo MJ, Liu X, Pires JC, Soltis PS, Soltis DE (2014) Nonadditive gene expression in polyploids. **Annual Review of Genetics** 48:485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092159>.

Zhang Y, Wang B, et al. (2019) Ploidy and hybridity effects on leaf size, cell size and related genes expression in triploids, diploids and their parents in *Populus*. **Planta**, 249:635–646. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3029-0>.

Zhou J, Tan C, Cui C, Ge X, Li Z (2016) Distinct Subgenome Stabilities in Synthesized Brassica Allohexaploids. **Theor. Appl. Genet.** 129:1257–1271. doi: 10.1007/s00122-016-2701-7.

Zhu ZT, Kang XY, Zhang ZY (1998). Study on natural triploid selection of *Populus tomentosa*. **Sci. Silvae Sin.** 34 22–31.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Combinar o desenvolvimento de novos genótipos já em condição climática futura é estratégia de grande importância. Para tetraploides de *Eucalyptus*, o enriquecimento por CO₂ associado a amenas ou altas temperaturas acarretam respostas opostas na arquitetura das mudas.

A proteômica nos mostrou que a expressão de genes de poliploides é mais complexa e menos previsível em relação a uma simples duplicação cromossômica e aumento de dosagem alélica. Além disso, a hibridização dos parentais contribuiu para maior diversidade alélica, tanto do parental diploide como dos tetraploides, refletindo em indivíduos mais flexíveis as oscilações do ambiente.

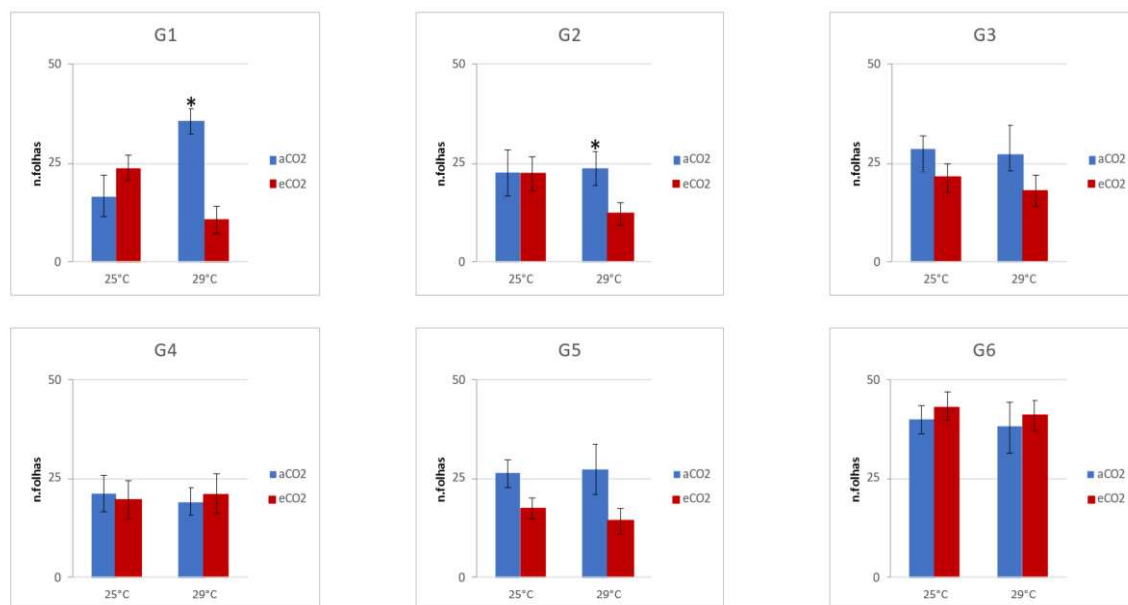
Explorar as rotas alvos dos estímulos mais uma vez reforçou que o incremento por CO₂ tende a incentivar maior atividade, enquanto maiores temperaturas inibem essa capacidade do CO₂.

Esta abordagem exploratória contribuiu para o entendimento do metabolismo de mudas tetraploides no enfrentamento a condições futuras de enriquecimento de CO₂ e altas temperaturas. Assim, abre uma gama de janelas para aprofundar os conhecimentos durante maiores períodos de desenvolvimento e associação com outros cenários climáticos.

APÊNDICES

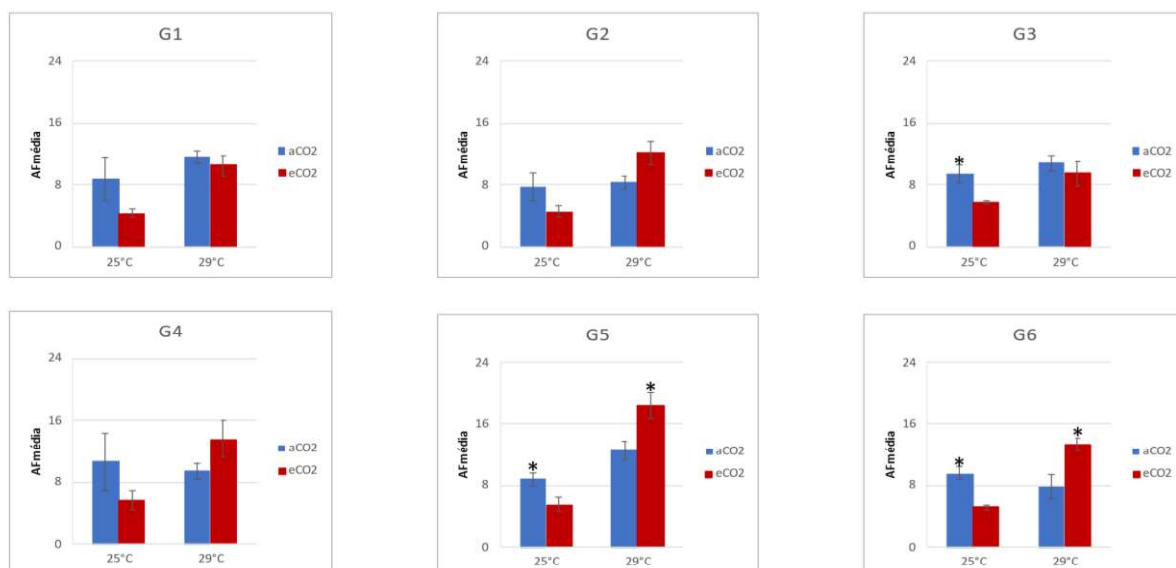
Apêndice 1A. Número de folhas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C.

*Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$).

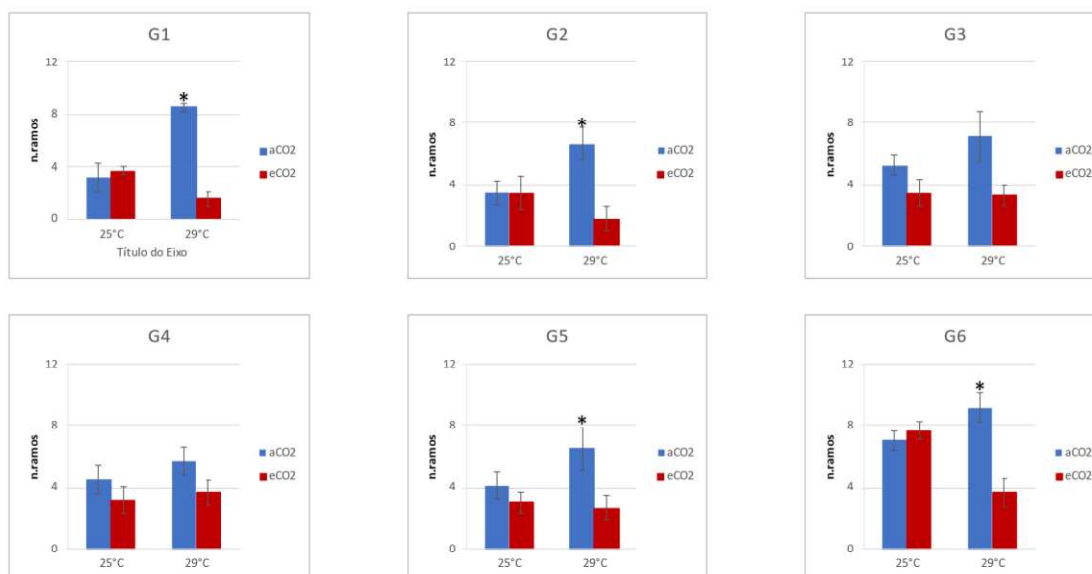


Apêndice 2A. Área foliar média de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C.

*Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$).



Apêndice 3A. Número de ramos foiaves de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C. *Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$).



Apêndice 4A. Incremento em altura de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em genótipos diploide (G6) e tetraploides (G1 a G5) após 30 dias de cultivo sob condições controladas. aCO₂= 410 ppm; eCO₂= 680 ppm; CT= 25°C; HT= 29°C. *Diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p<0.05$).

