

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

**ALTERAÇÕES NO PROTEOMA CAULINAR DE *Eucalyptus*
globulus e *Eucalyptus grandis* EM RESPOSTA A
VARIAÇÕES DE TEMPERATURA**

Marília Gabriela de Santana Costa

Engenheira Agrônoma

2017

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

**ALTERAÇÕES NO PROTEOMA CAULINAR DE *Eucalyptus*
globulus e *Eucalyptus grandis* EM RESPOSTA A
VARIAÇÕES DE TEMPERATURA**

Marília Gabriela de Santana Costa

Orientador: Dr. Tiago Santana Balbuena

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

2017

Costa, Marília Gabriela de Santana
C837a Alterações no proteoma caulinar de *Eucalyptus globulus* e
Eucalyptus grandis em resposta a variações de temperatura / Marília
Gabriela de Santana Costa. – – Jaboticabal, 2017
xix, 89 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Tiago Santana Balbuena

Banca examinadora: Daniel Guariz Pinheiro, Rogério Falleiros
Carvalho, Carlos Alberto Labate, Adriana Franco Paes Leme

Bibliografia

1. Proteômica. 2. Estresse térmico. 3. Biomassa lignocelulósica. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:582.776

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES NO PROTEOMA CAULINAR DE *Eucalyptus globulus* E *Eucalyptus grandis* EM RESPOSTA A VARIAÇÕES DE TEMPERATURA

AUTORA: MARÍLIA GABRIELA DE SANTANA COSTA

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:

Prof. Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ-PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE
Departamento de Genética / USP - Piracicaba, SP

Pesquisadora Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais / Laboratório Nacional de Biociências - Campinas, SP

Jaboticabal, 05 de abril de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marília Gabriela de Santana Costa – nascida em 03 de Abril de 1986 na cidade de Recife - PE, ingressou em 2007 no curso de Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco, durante a graduação foi monitora da disciplina de melhoramento vegetal, sob orientação do Prof. Dr. Clodoaldo José da Anunciação Filho, também participou do PET-Agronomia e desenvolveu o estágio supervisionado obrigatório na área de biotecnologia, com a orientação da Prof^a. Dra. Angélica Virgínia Valois Montarroyos, desenvolvendo o projeto intitulado “Análise da variabilidade genética de *Anthurium affine* Schott por meio da técnica de RAPD”, obtendo em 2011 o título de Engenheira Agrônoma. No mesmo ano ingressou no Mestrado em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas) pela mesma instituição e desenvolveu a dissertação intitulada “Caracterização citogenética de genótipos de *Heliconia* L. (Heliconiaceae)”, sob orientação da Prof^a. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal, na Universidade Federal de Pernambuco, obtendo em 2013 o título de mestra. No mesmo ano ingressou no doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus Jaboticabal) desenvolvendo a pesquisa desta tese sob a orientação do Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena, no Laboratório de Proteômica, localizado no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV).

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as vitórias conquistadas ao longo dessa jornada.

Ao Professor Dr. Tiago Santana Balbuena pela orientação, incentivo e o grande apoio em toda execução desse trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio, em especial a minha mãe, Juracy, sem ela nada seria possível, e à minha amada sobrinha, Laís.

Ao amado Miquéias Gomes, por todo o apoio, dedicação, encorajamento, e, principalmente, ao amor a mim dedicado.

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 de seus conhecimentos.

Aos colegas do laboratório de Proteômica Vegetal, Amanda, Bruna, Edwin, Fernanda, Filipe, Gabriela, Natália e Patrícia, por todos os momentos compartilhados.

A todos os professores, alunos e funcionários da UNESP/FCAV, especialmente aos integrantes do Departamento de Tecnologia e do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO).

Aos amigos e colegas conquistados ao longo dessa jornada em Jaboticabal, em especial a Suellen e Renato, agradeço pelo apoio, carinho e amizade.

A UNESP/FCAV pelo apoio institucional e infraestrutura oferecida para condução do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho,

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância no setor florestal	15
2.2. Qualidade da madeira de <i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i> e o estímulo térmico	16
2.3. O sistema antioxidante das plantas expostas a fatores abióticos	19
2.4. A proteômica de plantas.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Material vegetal e condições de crescimento.....	23
3.2. Extração de proteínas	23
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e digestão de proteínas	24
3.4. Análises de espectrometria de massas.....	24
3.5. Identificação e quantificação de proteínas	25
3.6. Análise global dos dados e proteínas diferencialmente reguladas.....	25
3.7. Análise das enzimas antioxidantes e relacionadas com a lignificação	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Correlação entre os dados proteômicos e a arquitetura genômica de <i>Eucalyptus grandis</i>	28
4.2. Identificação de assinaturas proteômicas por análise global dos proteomas caulinares de <i>E. grandis</i> e <i>E. globulus</i>	30
4.3. Proteínas com expressão induzida ou suprimida	32
4.4. Mapeamento de vias metabólicas	39
4.5. O subproteoma antioxidante caulinar de espécies de <i>Eucalyptus</i> e a regulação através do estímulo térmico	44
4.6. O metabolismo de lignificação de <i>Eucalyptus</i> e as modificações decorrentes ao estímulo térmico	51
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
6. REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE.....	69
Tabela 1A.....	70
Tabela 2A.....	86

MUDANÇAS NO PROTEOMA CAULINAR DE *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* EM RESPOSTA A VARIAÇÕES DE TEMPERATURA

RESUMO – A indústria de papel e celulose brasileira ocupa uma posição de destaque no mercado mundial. O *Eucalyptus grandis* é a espécie mais plantada pelo setor florestal e a principal fonte de matéria-prima para a indústria de papel e celulose. Contudo, seu crescimento em regiões de baixa temperatura é limitado. Contrariamente, a espécie *Eucalyptus globulus* apresenta melhor crescimento em baixas temperaturas, tornando-se cada vez mais interessante para a indústria nacional de papel e celulose. Tendo em vista que a temperatura é um modulador chave no metabolismo das plantas, uma análise global do proteoma foi realizada em plântulas cultivadas em temperaturas controladas, visando a identificação de proteínas diferencialmente reguladas entre as espécies e entre as diferentes condições de cultivo, detecção de vias metabólicas estimuladas pela temperatura e detecção de alterações no metabolismo antioxidante e de lignificação. A estratégia adotada permitiu a identificação de 3.111 proteínas caulinares, representando aproximadamente 9% do proteoma predito para a espécie modelo *E. grandis*. O perfil de expressão gênica, em termos de número de proteínas identificadas, corroborou com o padrão de densidade gênica para os cromossomos de *Eucalyptus*. Foram identificadas proteínas envolvidas em diversas vias metabólicas, com destaque para as vias relacionadas com o metabolismo energético, de aminoácidos e nucleotídeos, de lipídeos e carboidratos. Com relação às proteínas diferencialmente reguladas, 16 proteínas apresentaram alteração em sua abundância somente em *E. grandis*, 38 somente em *E. globulus* e 12 apresentaram alterações em ambas as espécies. Além disso, um total de 103 proteínas antioxidantes foram detectadas nos caules de ambas as espécies. O perfil de regulação frente ao estímulo térmico, revelou que as alterações nas proteínas antioxidantes são mais proeminentes quando as mudas de *Eucalyptus* foram expostas a altas temperaturas. Com relação à biossíntese de lignina, a nossa abordagem proteômica resultou na identificação de 27 das principais enzimas envolvidas neste metabolismo, corroborando com as predições de genes e o “toolbox” de lignificação proposto. A análise quantitativa revelou diferenças na abundância de isoformas específicas dependendo do estímulo térmico em que as plantas foram expostas; contudo, o tratamento a alta temperatura foi aquele que induziu mais diferenças entre os proteomas relacionados com a lignificação de *E. globulus* e de *E. grandis*. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o estímulo térmico promove alterações importantes no proteoma caulinar jovem de *Eucalyptus*, evidenciando aumento na atividade antioxidante em plantas expostas ao calor e expressão diferencial mais proeminente em plantas submetida ao frio.

Palavras chave: *Eucalyptus*, biomassa lignocelulósica, enzimas de neutralização de espécies reativas de oxigênio, estresse térmico

CHANGES IN PROTEOME STEM OF *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* IN RESPONSE TO TEMPERATURE CHANGES

ABSTRACT – The Brazilian pulp and paper industry occupies a prominent position in the world market. The *Eucalyptus grandis* is the most used species in the forest sector and the main source of raw material for Brazilian industry. However, its growth in low temperature regions is limited. In contrast, the *Eucalyptus globulus* species shows a better growth at low temperatures, for whom interest has increased within the national pulp and paper industry. Since temperature is a key modulator in plant metabolism, a global proteome analysis was performed on seedlings grown at controlled temperatures, aimed at the identification of differentially regulated proteins between the species and between the different culture conditions, detection of metabolic pathways stimulated by temperature and detection of alterations in antioxidant metabolism and lignification. The strategy used here allowed the identification of 3,111 stem proteins, representing approximately 9% of the predicted proteome of the *E. grandis* model species. The gene expression profile, in terms of the number of proteins identified, corroborated with the gene density pattern for the *Eucalyptus* chromosomes. Proteins involved in several metabolic pathways have been identified, especially the pathways related to energy metabolism, and metabolism of amino acids, nucleotides, lipids and carbohydrates. Regarding the differentially regulated proteins, 16 proteins showed alterations in their abundance only in *E. grandis*, 38 only in *E. globulus* and 12 presented alterations in both species. In addition, a total of 103 antioxidant proteins were detected in the stems of both species. The regulation profile upon thermal stimulus revealed that changes in antioxidant proteins are more prominent when *Eucalyptus* seedlings were exposed to high temperatures. Regarding the biosynthesis of lignin, our proteomic approach resulted in the identification of 27 of the main enzymes involved in this metabolism, corroborating with the gene predictions and the proposed lignin toolbox. Quantitative analysis revealed differences in the abundance of specific isoforms depending on the thermal stimulus to which the plants were exposed; however, the high temperature treatment was the one that induced more differences between the proteomes related to the lignification of *E. globulus* and *E. grandis*. The results demonstrate that thermal stimuli cause important alterations in the *Eucalyptus* stem proteome, evidenced by the increase in the antioxidant activity in plants exposed to heat and the most prominent differential expression in plants submitted to cold environments.

Key words: *Eucalyptus*, lignocellulosic biomass, temperature stress, reactive oxygen species scavenging enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS

APX - ascorbato peroxidase

EC numbers – número EC (do inglês, “enzyme commission”)

EROs - espécies reativas de oxigênio

FDR - taxa de falsas descobertas (do inglês, “false discovery rate”)

FWHM - largura à meia altura (do inglês, “full width at half maximum”)

GLX - glioxalase

GPX - glutational peroxidase

GR - glutational redutase

GRX - glutarredoxina

HCD - energia de colisão (do inglês, “higher-energy collision dissociation”)

KOs - kegg ortology

NSAF - fator de abundância espectral normalizado

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, “polyacrylamide gel electrophoresis”)

PRX - peroxirredoxina

PSM - do inglês, “peptide spectrum matches”

SDS - dodecilsulfato de sódio

SOD - superóxido dismutase

TPX - tiorredoxina peroxidase

TRX - tioredoxina

PSI - fotossistema I

PSII - fotossistema II

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese de Lignina.	18
Figura 2: Esquema de neutralização de EROs.	19
Figura 3: Correlação entre dados de proteômica e estrutura do genoma de <i>Eucalyptus grandis</i> descrito por Myburg et al. (2014).	29
Figura 4: Agrupamento hierárquico do proteoma caulinar de <i>E.globulus</i> e <i>E. grandis</i> cultivadas em baixa (LT), media (MT) e alta (HT) temperatura por 5 semanas	31
Figura 5: Classificação nível 2 por função molecular das 296 proteínas diferencialmente reguladas em caules de <i>Eucalyptus</i>	33
Figura 6: Proteínas com expressão induzida ou suprimida em caules de <i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i> sob estímulo térmico.	38
Figura 7: Rotas metabólicas em que as proteínas caulinares identificadas de <i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i> estão envolvidas	41
Figura 8: Vias metabólicas das proteínas diferencialmente reguladas em espécies de <i>Eucalyptus</i>	43
Figura 9: Abundância de proteínas de <i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i> relacionadas com o sistema antioxidante.....	45
Figura 10: Enzimas antioxidantes mitocondriais e cloroplastidiais identificadas a partir de caules de plantas de <i>E. grandis</i> e <i>E. globulus</i> cultivadas em LT (baixa temperatura), MT (média temperatura) e HT (alta temperatura) conforme descrito na seção de Material e Métodos	47
Figura 11: Abundância diferencial das variantes de superóxido dismutase (SOD) Eucgr.B03930 entre caules de <i>E. globulus</i> e <i>E. grandis</i>	49
Figura 12: Abundância relativa de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina de <i>Eucalyptus</i>	53

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, as florestas plantadas correspondem a uma área global de cerca de 264 milhões de hectares, sendo a maioria delas compostas por espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* (FAO, 2006). Dentre as plantas de *Eucalyptus* economicamente importantes, *Eucalyptus grandis* é provavelmente uma das espécies mais cultivadas devido às suas altas taxas de crescimento e adaptabilidade a diferentes condições climáticas. Recentemente, o marco do sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* foi realizado por Myburg et al. (2014), permitindo a exploração da informação genética em relação ao crescimento e respostas metabólicas em *E. grandis* e espécies relacionadas.

Devido ao seu impacto crucial sobre o metabolismo em organismos vegetais, as plantações estão mundialmente ou localmente delimitados por regiões de temperatura. No Brasil, a distribuição de plantas de *Eucalyptus* é baseada em zonas climáticas, onde a espécie *E. grandis* e seus híbridos são principalmente cultivadas em regiões tropicais; enquanto a espécie *E. globulus* é preferida em áreas temperadas (POTTS, 2004; DASGUPTA et al., 2015). Devido à tolerância de *E. globulus* ao crescimento em baixas temperaturas, as respostas moleculares induzidas nessas condições têm sido exploradas (GAMBOA et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2010, 2012). Embora esses estudos de expressão gênica tenham sido utilizados para entender as respostas de *E. globulus* ao estresse térmico, não há relatos sobre tecnologias em larga escala utilizadas para compreender esse fenômeno.

Além da característica de tolerância a baixas temperaturas, a estrutura química da parede celular de *E. globulus* difere de outras espécies de *Eucalyptus*, pois o seu polímero de lignina apresenta uma composição diferente em relação à proporção das subunidades hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Em angiospermas, as subunidades de S (duplamente metilado, nas porções de 3- e 5-hidroxila) e G (isoladamente metilado, na parte grupo 3-hidroxila) possuem grande importância na determinação do grau de condensação da lignina (BHYUIYA; LIU, 2010). Devido à maior facilidade de digestão da celulose oriunda de parede celular

contendo lignina rica em subunidades S, a alta razão S/G na lignina de *E. globulus* é uma característica atraente para a degradação da parede celular durante a produção de papel e celulose. Devido ao seu potencial de fornecer informações sobre as proteínas que foram efetivamente codificadas a partir do genoma de *Eucalyptus*, tecnologias de proteômica em larga escala foram usadas para detectar as alterações na abundância de espécies protéicas em caules jovens de *E. globulus* e *E. grandis* induzidas pelo cultivo em diferentes temperaturas. A identificação de tais alterações pode auxiliar no desenvolvimento e seleção de clones tolerantes a altas e baixas temperaturas e com maior rendimento lignocelulósico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Eucalyptus* e sua importância no setor florestal

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, é composto por 822 indivíduos (THE PLANT LIST, 2013). De acordo com a classificação proposta por Brooker (2000), o gênero está dividido em seis subgêneros monotípicos: *E. subg. Acerosa*, *E. subg. Cruciformes*, *E. subg. Alveolata*, *E. subg. Cuboidea*, *E. subg. Idiogenes* e *E. subg. Primitiva*, e sete subgêneros politípicos: *E. subg. Angophora*, *E. subg. Corymbia*, *E. subg. Blakella*, *E. subg. Eudesmia*, *E. subg. Symphyomyrtus*, *E. subg. Minutifructa* e *E. subg. Eucalyptus*.

No cenário mundial as florestas plantadas correspondem a 264 milhões de hectares (FAO, 2006), compostas em geral por espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*, em que o cultivo do último é correspondente a aproximadamente 72% das florestas plantadas do Brasil (IBÁ, 2015). Seu cultivo tem grande importância econômica para a indústria mundial da madeira, sendo a principal fonte de matéria prima para indústria de papel e celulose (IBÁ, 2015). Diversos setores industriais utilizam a matéria prima das plantações florestais, tais como o setor de papel e celulose, madeira sólida, painéis de madeira industrializada, siderurgia, carvão vegetal, entre outros (ABRAF, 2013).

Os primeiros indivíduos de eucalipto foram trazidos ao Brasil em meados do século XIX para utilização como matéria-prima na fabricação de linhas de trem. As espécies de eucalipto introduzidas no Brasil apresentaram crescimento rápido, alta produtividade, elevada produção de sementes, facilidade de propagação vegetativa, boa resposta ao manejo e alta adaptabilidade a diferentes condições ambientais (MORA; GARCIA, 2000; SILVA, 2005), adquirindo mais biomassa em menos tempo em relação a espécies nativas.

As plantações de culturas, incluindo as florestas plantadas, estão mundialmente ou localmente limitados por regiões de temperatura, isso se dá pelo impacto causado sobre o metabolismo das plantas quando expostas a temperaturas limitantes. Dessa forma, as plantas de *Eucalyptus* estão distribuídas com base em zonas climáticas. Por exemplo, a espécie *E. grandis* e seus híbridos são preferencialmente cultivadas em regiões de clima tropical; enquanto que a espécie

E. globulus é preferida em áreas de clima temperado (POTTS, 2004; DASGUPTA et al., 2015).

O setor industrial de papel e celulose ocupa posição de notoriedade no Brasil, gerando emprego e renda. Devido ao alto desempenho produtivo o país manteve em 2014 a posição como o quarto maior produtor mundial de celulose de todos os tipos e o primeiro produtor mundial de celulose de eucalipto (IBÁ, 2015). Também manteve a liderança no ranking global de produtividade florestal, com produtividade média dos plantios de 39 m³/ha.ano e 31 m³/ha.ano, para *Eucalyptus* e *Pinus*, de modo respectivo (IBÁ, 2015). O setor de florestas plantadas tem contribuindo no PIB brasileiro com aumentos constantes, representando 5,5%, no ano de 2014, do PIB industrial. Os estados brasileiros que possuem a maior concentração de plantio florestal são, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, sendo os dois primeiros com predomínio de área plantada por *Eucalyptus* (ABRAF, 2013).

2.2. Qualidade da madeira de *E. globulus* e *E. grandis* e o estímulo térmico

Os constituintes químicos da madeira estão intimamente ligados às suas propriedades. Esse material orgânico é um biopolímero tridimensional, formado principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, que são responsáveis pela formação da parede celular e suas propriedades. A composição química da madeira tem grande relevância para a indústria, uma vez que essas propriedades definem a aptidão da madeira para uma finalidade. Para a indústria de papel e celulose, a qualidade da madeira está relacionada ao tipo de lignina que a compõe, uma vez que o teor de lignina está correlacionado de maneira negativa com o rendimento da pasta.

A celulose é o polímero mais abundante da biomassa produzida na biosfera, seguidamente da lignina, que representa até 30% dessa biomassa (BOERJAN et al., 2003). A lignina exerce papel fundamental, em termos biológicos, além de apresentar relevância em mecanismos de defesa, conferir rigidez mecânica, impermeabilidade, e está relacionada a condutividade de água e resistência à biodegradação (BHUIYAN et al., 2009). O polímero de lignina apresenta três diferentes subunidades: “p-hydroxyphenyl” (H), “guaiacyl” (G) e “syringil” (S). À

medida que a razão das subunidades S (duplamente metilado, nas porções de 3- e 5- hidroxilo) para G (isoladamente metilado, na parte grupo 3-hidroxilo) determina o grau de condensação da lignina (BHYUIYA; LIU 2010), e a alta razão S/G na lignina é uma característica atraente para a degradação da parede celular durante a produção de papel e celulose. A composição e o teor de lignina oscilam entre as espécies e dentro de uma mesma espécie, nos diferentes órgãos e tecidos, e, nas várias fases do desenvolvimento e em resposta a condições externas à planta (PLOMION et al., 2001; BHUIYAN et al., 2009; CAROCHA et al., 2015) .

Respostas moleculares induzidas por baixa temperatura foram estudadas em plantas de *E. globulus*, devido a sua importância econômica e a sua tolerância ao frio. Fernández et al. (2010), por intermédio do uso da técnica de qRT-PCR, observaram uma regulação diferencial dos genes ELIP (early light-inducible protein), NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) e GS (galactinol synthase) em plantas de *E. globulus* expostas ao frio. Gamboa et al. (2007) isolaram um cDNA que codifica o fator de transcrição CBF (cold-binding factor) a partir de plantas de *E. globulus* após exposição a temperaturas ambientais baixas, enquanto, Fernández et al. (2012) observaram a regulação positiva de três genes DHN (dehydrin) na aclimação a frio.

Além da característica de tolerância à baixa temperatura, as paredes de células de plantas de *E. globulus* diferem de outras espécies de *Eucalyptus* pois o polímero de lignina apresenta uma composição diferente em relação às subunidades H, G e S, demonstrando uma alta razão S/G, característica importante para a indústria. No entanto, um profundo conhecimento de todas as etapas envolvidas na biossíntese de lignina de *Eucalyptus* (Figura 1) é essencial antes do uso de técnicas de engenharia genética para as paredes celulares de espécies plantas deste gênero. Recentemente, Carocha et al. (2015) realizaram uma análise profunda dos genes essenciais envolvidos na biossíntese de lignina em *E. grandis*, usando a expressão de alto rendimento de perfis de RNA-seq combinados com PCR em tempo real quantitativo.

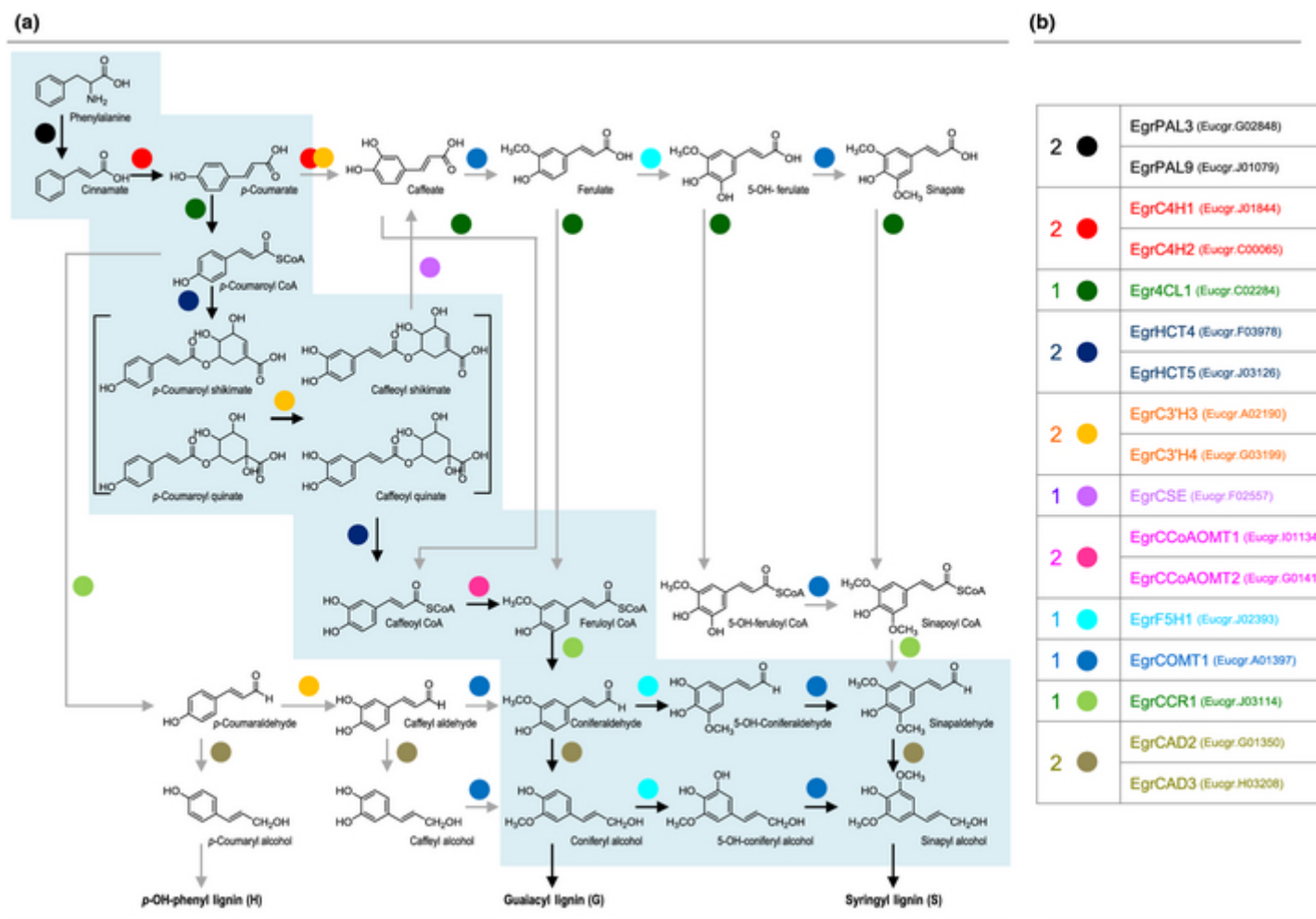


Figura 1: Biossíntese de Lignina. (b) Círculos coloridos indicam as 17 enzimas que constituem o “toolbox” de lignificação de *Eucalyptus*, descrito por Carocha et al. (2014). Setas em preto indicam as reações consideradas como fundamentais na biossíntese de lignina. **Fonte:** Carocha et al. (2014).

2.3. O sistema antioxidante das plantas expostas a fatores abióticos

Estresses causam danos às plantas e podem interferir na qualidade da madeira, influenciando a deposição de lignina na parede celular (MOURA et al., 2010). Dentre todos os fatores abióticos que os organismos vegetais estão sujeitos durante o seu ciclo de vida, variações térmicas são provavelmente os fatores climáticos mais limitantes. A geração de EROs é um fenômeno comum em plantas sob estresses abióticos e, quando ocorre em níveis elevados, pode afetar negativamente o metabolismo celular. Consequentemente, as EROs precisam ser rapidamente neutralizadas para minimizar potenciais danos nas células vegetais (Figura 2).

As enzimas catalisadoras de EROs são comuns em planta e estão bem descritas na literatura, incluindo principalmente as enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutationa peroxidase e catalase (APEL; HIRT, 2004; FOYER, 2005; HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2012; CHOUDHURY et al., 2013).

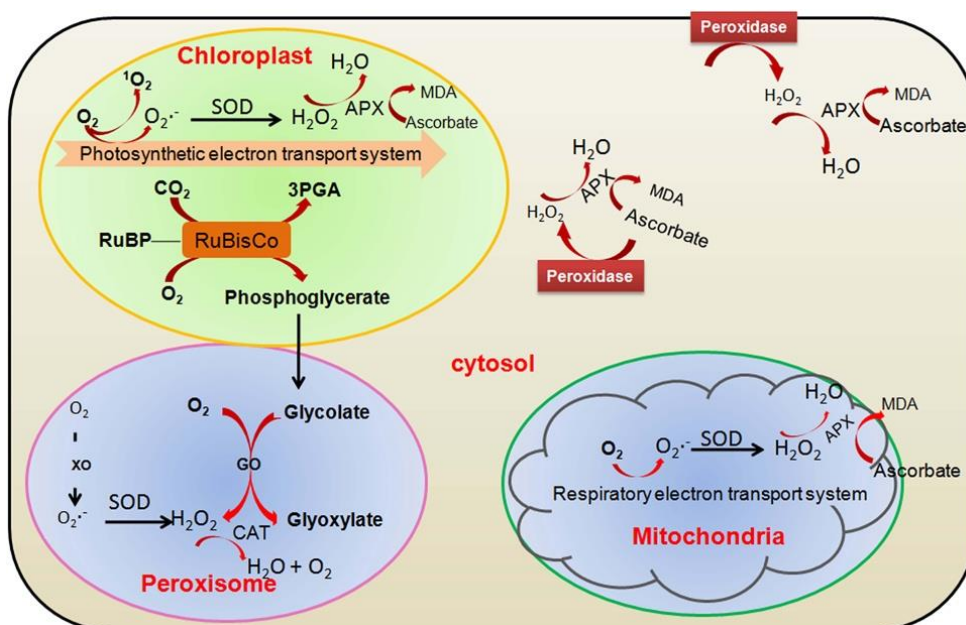


Figura 2: Esquema de neutralização de EROs. Principais sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células fotossintéticas e envolvimento das principais enzimas antioxidantes. Abreviaturas: GO, glicolato oxidase; 3PGA, 3-fosfoglicerato; RuBisCo, ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; RuBP, ribulose 1,5-bisfosfato; SOD, superóxido dismutase; APX, ascorbato peroxidase; MDA, malondialdeído.

superóxido dismutase; XO, xantina oxidase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase. **Fonte:** Das et al. (2015).

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é uma enzima antioxidante, que tem papel fundamental no processo de neutralização de EROs, atuando nos três principais compartimentos produtores dessas moléculas (Figura 2). A SOD catalisa a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade dessa enzima em plantas expostas a estímulos térmicos já foi descrita. Liu et al. (2013) observaram um aumento na atividade de SOD, CAT e peroxidases em plantas de *Avena nuda* L. cultivadas em baixas temperaturas. Wang et al. (2014) observaram um aumento na atividade de SOD em plantas de trigo de inverno (*Triticum aestivum* L.) submetidas a alta temperatura.

As peroxidases (EC 1.11.1.x), compõe uma família de enzimas antioxidantes que catalisam reações oxirredutases. São encontradas em diversos organismos, tais como, plantas, humanos e bactérias e têm como principal molécula aceitadora de elétrons, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Fazem parte desse família as enzimas: ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11), “glutathiona peroxidase” (EC 1.11.1.9), “peroxiredoxin” ou “thioredoxin peroxidase” (EC 1.11.1.15), catalase (EC 1.11.1.6), NADH peroxidase (EC 1.11.1.1), “NADPH peroxidase” (EC 1.11.1.2), “fatty-acid peroxidase” (EC 1.11.1.3), “cytochrome-c peroxidase” (EC 1.11.1.5), peroxidase (EC 1.11.1.7), “iodide peroxidase” (EC 1.11.1.8), “chloride peroxidase” (EC 1.11.1.10), “phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase” (EC 1.11.1.12), “manganese peroxidase” (EC 1.11.1.13), “lignin peroxidase” (EC 1.11.1.14), “versatile peroxidase” (EC 1.11.1.16), “glutathione amide-dependent peroxidase” (EC 1.11.1.17), “bromide peroxidase” (EC 1.11.1.18), “dye decolorizing peroxidase” (EC 1.11.1.19), “prostamide/prostaglandin F(2- α) synthase” (EC 1.11.1.20), catalase peroxidase (EC 1.11.1.21), “hydroperoxy fatty acid reductase” (EC 1.11.1.22) e “(S)-2-hydroxypropylphosphonic acid epoxidase” (EC 1.11.1.23).

Dentre estas enzimas que decompõem peróxidos, pode-se destacar as enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). A primeira usa como substrato o ascorbato, e atua no citosol, mitocôndria e cloroplasto; a segunda

neutraliza o peróxido de hidrogênio e, em plantas, atua nos peroxissomas (Figura 2). O aumento na atividade da CAT foi observado em plantas de *E. dunnii* cultivadas a 4°C, em que foi observado um aumento de 25% após três horas de exposição ao estresse (LIU et al., 2014). Clones de *Eucalyptus globulus* submetidos a aclimação ao frio a curto prazo, apresentaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidase, glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase. No entanto, apenas para SOD e GR foram observadas diferenças significativas em relação ao controle (COSTA E SILVA et al., 2009).

2.4. A proteômica de plantas

Nas últimas décadas os códigos genéticos de diversos organismos foram completamente sequenciados, representando um importante avanço na área genômica. Contudo, a obtenção da sequência de nucleotídeos do genoma de um organismo representa apenas o primeiro passo para a realização de diversos estudos a respeito do entendimento da regulação da expressão gênica. Tais avaliações em nível do transcriptoma podem fornecer informações importantes sobre a constituição genética transcrita de um organismo em um determinado momento; entretanto, ela não reflete diretamente o produto final da expressão dos genes já que podem ocorrer modificações estruturais das proteínas após a transcrição e que podem resultar em classes protéicas que desempenham diferentes funções metabólicas (GYGY et al., 1999; CHEN; HARMON, 2006). Proteômica é o estudo sistemático de um proteoma, ou conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em uma dada condição (PARK, 2004; CHEN; HARMON, 2006). Os significativos avanços obtidos nessa área são resultado do desenvolvimento, integração e automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar estas informações com aquelas obtidas por outras abordagens (SANTOS; TEIXEIRA; SA-CORREIA, 2004). Em geral, a proteômica permite estudos da expressão diferencial de proteínas, das modificações pós-traducionais, das interações proteína-proteína, e das funções desempenhadas por determinadas proteínas em um evento biológico específico (DIAS et al., 2010).

Com os avanços nas técnicas de proteômica e nas análises por espectrometria de massas, a proteômica tem se tornado uma estratégia alternativa no estabelecimento de marcadores bioquímicos e uma das mais utilizadas para análises metabólicas e de expressão gênica global (SHEORAN et al., 2005; PAWLOWSKI, 2007). As análises do proteoma de plantas são frequentemente baseadas em fracionamento protéico por eletroforese bidimensional (2-DE) e unidimensional (SDS-PAGE). O procedimento padrão para a identificação de proteínas inicia-se com a digestão enzimática, sendo tripsina a enzima mais utilizada (OLSEN et al., 2004). Posteriormente, os peptídeos são fragmentados em um espectrômetro de massas, gerando espectros do tipo MS/MS, os quais são utilizados nas buscas em bancos de dados. Os programas utilizados na busca de dados baseiam-se na comparação entre o padrão de fragmentação teórico dos peptídeos e o espectro de fragmentação obtido experimentalmente. A estratégia de identificação por MS/MS, permite a determinação precisa da sequência experimental de aminoácidos, sendo mais eficiente do que a identificação de proteínas baseada somente na comparação entre as massas dos fragmentos trípticos (CHEN; HARMON, 2006).

Um estratégia alternativa é a identificação e quantificação de proteínas realizada de forma integrada, diretamente a partir de dados obtidos pelo espectrômetro de massas (WONG et al., 2007). Essa estratégia baseia-se na premissa de que sob condições controladas, peptídeos idênticos presentes em diferentes análises podem ser diretamente comparados (WONG et al., 2007). A contagem de espectros obtidos para uma determinada proteína correlacionam-se com a abundância protéica, podendo ser utilizados em análises comparativas entre diferentes estados fisiológicos (OLD et al., 2005; ZHANG et al., 2006). A estratégia de pré-fracionamento inicial das proteínas por eletroforese unidimensional, seguido de separação dos peptídeos em coluna cromatográfica e identificação e quantificação de proteínas livre de marcação em espectrômetro de massas é conhecida como GeLC-MS/MS e tem se tornado frequente, já que permite a redução da complexidade das amostras biológicas e direta quantificação das proteínas a partir dos dados adquiridos em espectrômetro de massas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* foram obtidas a partir de um viveiro local, germinadas em mistura de areia e solo (1:1, v/v) e cultivadas em vasos de 0,5 L em casa de vegetação até a obtenção de 5-6 folhas completamente expandidas. Em seguida, foram transferidas para as câmaras com temperatura controlada e cultivadas a 10 °C, 22 °C e 32 °C por cinco semanas. No presente trabalho, esses foram nomeados como baixa temperatura (LT), média temperatura (MT) e alta temperatura (HT), respectivamente. As câmaras foram ajustadas para 10 h de luz, fornecido por um conjunto de díodos emissores de luz (LED, 250 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$). Após cinco semanas de tratamento, as folhas foram removidas e os caules foram rapidamente cortados com tesoura, congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80 °C até o processamento das amostras. Para cada tratamento e espécie, foram utilizadas cinco réplicas biológicas, sendo cada um deles constituído por caules de cinco plantas jovens.

3.2. Extração de proteínas

As proteínas caulinares foram extraídas de acordo com o protocolo original descrito por Hurkman e Tanaka (1986). Alíquotas de 1 g de material vegetal macerado em nitrogênio líquido foram transferidas para tubos novos e 4 mL de tampão de extração (500 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 700 mM sacarose, 100 mM KCl e 1% beta-mercaptoetanol) foram adicionados ao material. Após 1 h de incubação, um volume igual de solução de fenol equilibrado (Sigma-Aldrich) foi adicionado ao extrato e homogeneizado por 5 min a 4 °C. As fases orgânicas e aquosas foram separadas por 15 min de centrifugação a 3.200 g. As proteínas foram então isoladas por adição de 10 mL de 0,1 M acetato de amônio em metanol na fase aquosa anteriormente transferida. A precipitação ocorreu durante 16 h e foi realizada a -20 °C. Os precipitados foram obtidos por centrifugação a 3.200 g durante 15 min a 4 °C. Antes da ressuspensão, os *pellets* de proteína foram lavados duas vezes com 2 mL de acetona gelada, seguido por centrifugação a 3.200 g durante 15 min. Finalmente, as proteínas foram ressuspensas em 100 μL de tampão de amostra

(125 mM Tris, pH 6,8, 20% glicerol, 1% de SDS e 1% DTT) antes do ensaio de Bradford de quantificação protéica.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e digestão de proteínas

A eletroforese em gel de proteínas foi realizada em sistema descontínuo, composto por um gel de empilhamento de 4% (30% Acrilamida, 0,8 % Bis-Acrilamida) e gel de separação 12% (30% Acrilamida, 0,8 % Bis-Acrilamida). Foram utilizados aliquotas de 50 µg de proteínas caulinares em tampão de amostra, um volume igual de tampão de carregamento (125 mM Tris, pH 6.8, 20% glicerol, 1% SDS, 1% DTT) foi adicionado e a mistura aquecida por 5 min. Em seguida, as proteínas foram separadas em condições desnaturantes por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com corrente elétrica de 20 mA por gel, durante um período de 2 h. As bandas de proteína foram visualizadas por coloração de Coomassie G-250. As digestões em gel de proteínas foram efetuadas por corte das faixas do gel em cinco segmentos, e cada um digerido separadamente de acordo com o protocolo proposto por Shevchenko et al. (2006). A digestão de proteínas foi realizada durante 16h a 37 °C por adição de 2 µg de tripsina em cada tubo. Peptídeos trípticos foram eluidos da matriz de gel por 2 h usando 5% de ácido fórmico: 100% ACN (1:2, v/v) e em seguida secou-se em centrifugação a vácuo.

3.4. Análises de espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos que foram obtidos e armazenados em -30 °C foram separados por cromatografia líquida de fase reversa numa coluna C18 (15 cm, 3 µm, 120 Å) em um gradiente de noventa minutos: de 5% para 80% de ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila, a fluxo constante de 300 nL/min. As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um instrumento do tipo Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) operado no modo de positivos. Aquisição dos espectros de massa foi realizada no modo dependente de dados com ciclos de aquisição constituídos por um “full scan” (400-2000 m/z), a 70.000 FWHM, seguido por dez “data dependent scans” a 35.000 FWHM. A fragmentação dos peptídeos foi obtida por fragmentação

do tipo HCD usando uma energia de colisão igual a 35 eV ($\pm 5\%$), com exclusão dinâmica de 60 s para os íons selecionados.

3.5. Identificação e quantificação de proteínas

A identificação de proteínas foi realizada utilizando a abordagem da correlação espectral. Para isso, sequências protéicas de *Eucalyptus grandis* foram obtidas a partir do website Phytozome versão 1.1 (GOODSTEIN et al., 2012) e concatenados com sequências reversas para obter uma base de dados contendo 85,874 entradas. As buscas contra o banco de dados foram realizadas pela ferramenta Comet (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013) utilizando as seguintes modificações de massas de aminoácido: carbamidometilação da cisteína, como modificação estática, e oxidação da metionina, como modificação dinâmica. Todos os alinhamentos de espectros peptídicos sugeridos PSM (“peptide spectrum matches”) foram filtrados utilizando o software SePro (CARVALHO et al., 2012, 2016) e ajustados para uma taxa de falsas descobertas (FDR) de 1%. Proteínas que compartilham peptídeos comuns foram agrupadas de acordo com o princípio da máxima parcimônia. A abundância das proteínas foi registrada utilizando a abordagem do “normalized spectrum abundance factor” (NSAF) (PAOLETTI et al., 2006).

3.6. Análise global dos dados e proteínas diferencialmente reguladas

A análise global dos dados foi realizada por meio de: (1) correlação dos dados de proteômica com a estrutura do genoma de *Eucalyptus grandis* descrito por Myburg et al. (2014); (2) agrupamentos hierárquicos usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) com base na distância euclidiana, através do programa Genesis (STURN; QUACKENBUSH; TRAJANOSKI, 2002; STURN et al., 2003); e, (3) mapeamento das vias metabólicas utilizando o banco de dados Kegg Metabolic Pathway (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2016). Adicionalmente, foram realizadas análises das proteínas diferencialmente reguladas para os tratamentos de baixa e alta temperatura, contra o controle (média temperatura). Para tanto, utilizou-se a

ferramenta T-Fold disponível na plataforma Patternlab (CARVALHO et al., 2012, 2016), considerando apenas proteínas com “fold change” acima de 1,5 e com diferença significativa a 5% segundo o teste *t*-Student. Esse grupo de proteínas foi mapeado para as vias metabólicas do banco de dados Kegg Metabolic Pathway, através dos códigos “KOs” e “EC numbers” utilizando a ferramenta iPath (LETUNIC et al., 2008; YAMADA et al., 2011). Adicionalmente, a função molecular das proteínas diferencialmente reguladas para alta e baixa temperatura, contra a média temperatura, foi determinada separadamente, com classificação nível 2, via o Blast2Go (CONESA et al., 2005), para ambas as espécies. Posteriormente, com o intuito de restringir o número de proteínas e aumentar o nível de confiança dos dados, os NSAFs das proteínas foram transformados em índices espectrais (“spectral indexes”) (FU et al., 2008) e 1.000 permutações randômicas foram realizadas para seleção de proteínas diferencialmente reguladas a um nível de significância de 5%.

3.7. Análise das enzimas antioxidantes e relacionadas com a lignificação

As proteínas relacionadas com a neutralização de EROs que estão descritas na literatura (PERONI et al., 2007; BOGUSZEWSKA; ZAGDAŃSKA, 2012) foram identificadas em buscas por homologia. Para tanto, utilizou-se a descrição de proteínas disponível no website Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012) para os organismos *Eucalyptus grandis* e *Arabidopsis thaliana*. Também foi realizada a determinação da localização subcelular dessas proteínas, através do uso de preditores *in silico* Predotar, Wolf Psort, TargetP, PPDB, SUBAcon, Cell ploc e Phobius. Nos caso de divergência de localização entre os preditores, foi considerado o resultado obtido para a maioria dos preditores ou adotou-se a localização como compartilhada. Adicionalmente, foi realizado um agrupamento hierárquico com uso do programa PermutMatrix (CARAUX; PINLOCHE, 2005) usando os critérios de distâncias euclidianas e UPGMA para a obtenção dos grupos.

Para a identificação de proteínas relacionadas com a via de biossíntese de lignina, foram realizados mapeamentos utilizando o banco de dados KEGG Pathway (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2016) e o organismo *Arabidopsis thaliana* como modelo. Posteriormente, as identificações foram representadas em gráficos de tendência de expressão dessas proteínas nas diferentes condições

térmicas. Para as análises das proteínas relacionadas com a lignificação e com o sistema antioxidante, somente foi considerado como proteína diferencialmente regulada se observada uma diferença significativa na sua abundância segundo o teste estatístico Kruskal-Wallis com nível de confiança de 99%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Correlação entre os dados proteômicos e a arquitetura genômica de *Eucalyptus grandis*

Os avanços no sequenciamento de nucleotídeos em larga escala aumentaram significativamente a aquisição e a exploração da informação do proteoma de plantas. Embora o sequenciamento *de novo* de peptídeos seja uma abordagem poderosa e independente de banco de dados de espectros, a estratégia de correlação espectral contra um banco de dados ainda é a mais amplamente adotada no campo da proteômica. As iniciativas do sequenciamento do genoma de *Eucalyptus* foram lançadas no início dos anos 2000 e atingiram um marco para a biotecnologia florestal: o genoma de *E. grandis*, composto por uma sequência de 640 megabases montados em 11 principais grupos de ligação cromossômica (MYBURG et al., 2014). Essa referência genômica de alta qualidade é um recurso genético valioso para estudos que envolvem expressão gênica. A proteômica se destaca de outras abordagens em larga escala devido a sua capacidade de identificar os produtos finais da informação genômica. Sendo assim, neste trabalho, primeiramente correlacionamos os perfis de expressão gênica, obtidos de proteínas codificadas por genes aqui identificados, com o padrão de densidade de genes cromossômicos proposto por Myburg et al. (2014). O perfil de expressão gênica, em termos de número de proteínas identificadas, corroborou com o padrão de densidade gênica para cada um dos 11 cromossomos de *Eucalyptus* (Figura 3).

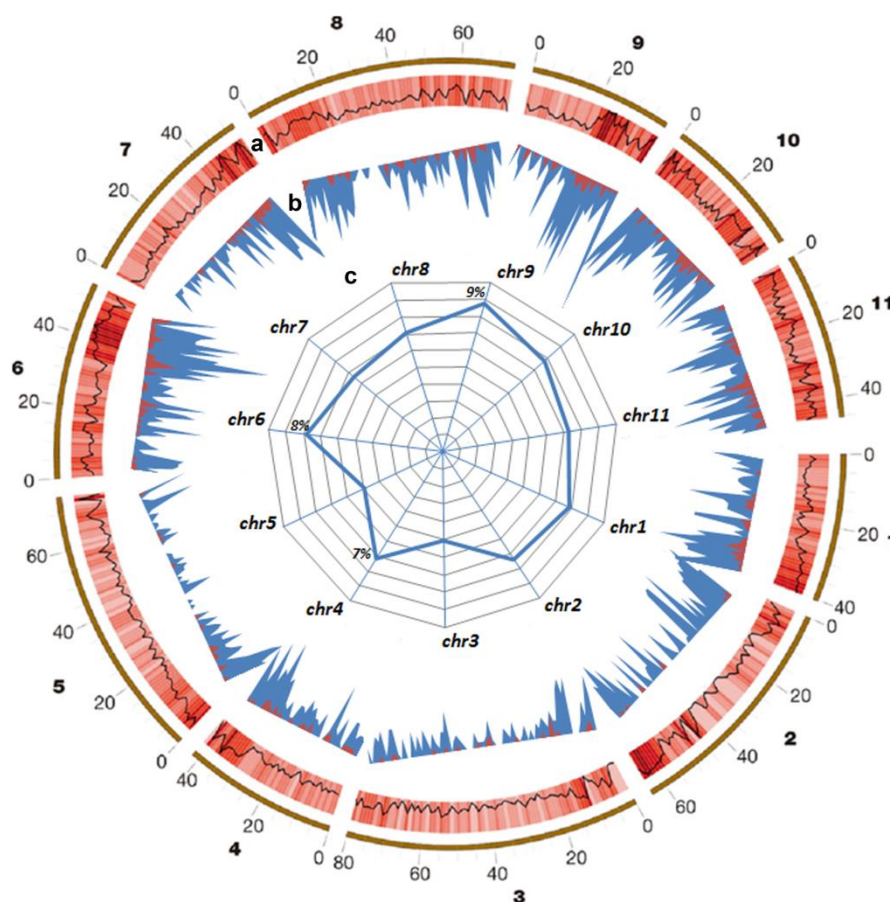


Figura 3: Correlação entre dados de proteômica e estrutura do genoma de *Eucalyptus grandis* descrito por Myburg et al. (2014). As identidades dos cromossomos estão indicadas pelos números mais externos. a, densidade de gene por intervalo de 1 megabase (Mb); b, densidade de genes expressos (número de proteínas identificadas, picos azuis) e expressão de genes variantes (número de identificações de isoformas por locus, picos vermelhos) por intervalo de 1 Mb; c, cobertura genômica baseado em proteômica para cada cromossomo proposto. **Adaptado:** Myburg et al. (2014).

O maior número de proteínas expressas, dentro de um intervalo genômico de 1 megabase (Mb), foi detectado nos cromossomos 6 e 9, corroborando a alta densidade de genes sugerida para as posições nesses cromossomos. Adicionalmente, os intervalos de 1 Mb do perfil de expressão de proteínas codificadas pelos cromossomos 3 e 5 também refletiram a distribuição de genes sugerida desses cromossomos, os quais são os maiores mas que possuem as menores densidades gênicas. A posição genômica dos genes que codificam as

isoformas de proteínas (isto é, proteínas diferentes expressas pelo mesmo *locus* gênico) também está de acordo com os padrões de densidade gênica para todos os grupos de ligação cromossômica sugeridos, onde regiões de elevada densidade gênica tendem a expressar o maior número de isoformas de proteínas. A cobertura genômica, em termos de proteínas identificadas, refletiu a distribuição gênica através de cromossomos de *Eucalyptus*. Como consequência das propriedades bioquímicas das proteínas e das estratégias analíticas utilizadas, a maior cobertura foi alcançada para os cromossomos que codificam o maior número de sequências protéicas (cromossomos 1, 9 e 10); enquanto os cromossomos 3 e 5 apresentaram o menor número de proteínas identificadas. Em geral, a análise de expressão gênica baseada em proteômica corroborou com a arquitetura genômica e a distribuição espacial dos genes sugerida por Myburg et al. (2014), proporcionando suporte adequado para as análises comparativas do proteoma entre as espécies de *Eucalyptus* aqui descritas.

4.2. Identificação de assinaturas proteômicas por análise global dos proteomas caulinares de *E. grandis* e *E. globulus*

A distribuição de espécies plantadas de *Eucalyptus* é baseada em zonas climáticas. Plantas de *E. grandis* e seus híbridos são principalmente cultivadas em regiões tropicais; enquanto que *E. globulus* é preferencialmente cultivada em áreas de clima temperado (POTTS, 2004; DASGUPTA et al., 2015).

Através da análise de agrupamento hierárquico do proteoma caulinar pode-se confirmar as indicações de cultivo para regiões de clima temperado e tropical para as espécies de *E. globulus* e *E. grandis*, respectivamente (Figura 4). Plantas de *E. globulus*, quando cultivadas em baixa temperatura, demonstraram um perfil de regulação protéica diferente do que quando cultivadas em média e alta temperatura (Figura 4). Contrariamente, observou-se que plantas de *E. grandis* cultivadas em alta temperatura demonstraram um perfil de regulação proteica mais diferenciado em relação às aquelas expostas a baixa e média temperaturas (Figura 4). As plantas de *E. globulus* e *E. grandis* quando cultivadas em alta e baixa temperatura, respectivamente, demonstraram um perfil de expressão próximo da temperatura

média para cada espécie, evidenciando que as maiores mudanças na regulação proteômica ocorre quando são cultivadas na temperatura mais próxima à zona de cultivo recomendada (Figura 4).

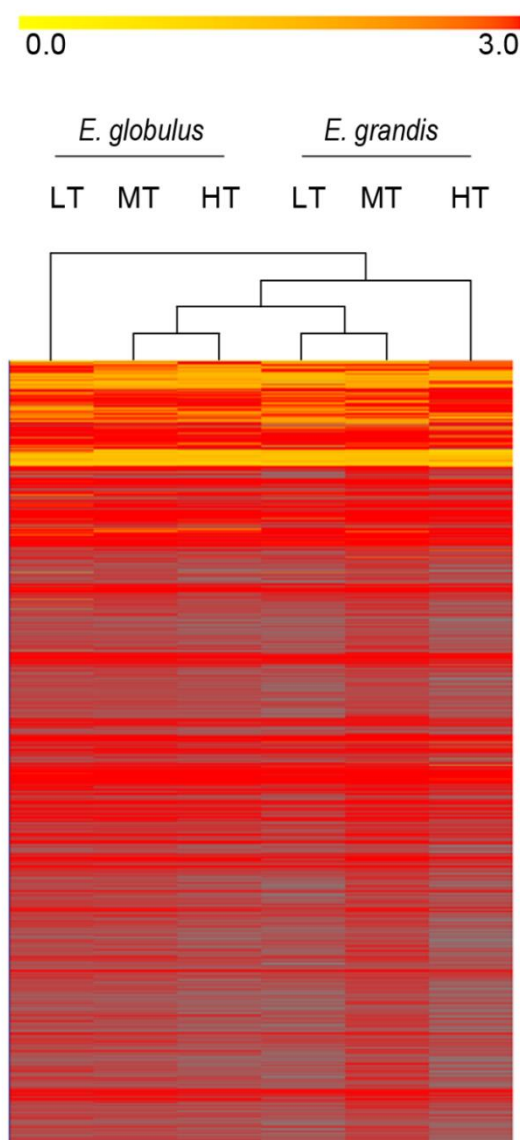


Figura 4: Agrupamento hierárquico do proteoma caulinar de *E.globulus* e *E. grandis* cultivadas em baixa (LT), media (MT) e alta (HT) temperatura por 5 semanas. As proteínas foram agrupadas de acordo com o NSAF pelo método UPGMA com base em distância euclidiana. A cor cinza indica ausência e as variações de cores do amarelo ao vermelho intenso indicam uma variação de menor para maior abundância.

4.3. Proteínas com expressão induzida ou suprimida

Foram identificadas 296 proteínas, não redundantes, diferencialmente reguladas segundo o teste T-Fold (Tabela 1A). Em *E. globulus*, o tratamento de baixa temperatura resultou na indução de 77 proteínas caulinares e supressão de 21 produtos gênicos. Paralelamente, o cultivo em alta temperatura resultou na indução de 86 proteínas e inibição da expressão de 29 proteínas caulinares. Em *E. grandis*, o cultivo em baixa temperatura estimulou o acúmulo de 65 proteínas caulinares, enquanto inibiu a expressão de 12 proteínas. Ainda nessa espécie, o tratamento de alta temperatura resultou na indução de 59 proteínas e inibição de 13 produtos gênicos. Considerando a função molecular dessas identificações (Figura 5), houve um aumento do percentual de proteínas diferencialmente reguladas que estão relacionadas com processos de oxidorreductase nos tecidos submetidos ao tratamento de alta temperatura em relação àqueles submetidos ao cultivo em baixa temperatura, tanto para *E. globulus* (Figura 5A-B) quanto para *E. grandis* (Figura 5C-D). Esse resultado favorece a hipótese de que o estímulo por alta temperatura proporciona respostas mais acentuadas no sistema antioxidante em plantas de *Eucalyptus*.

Ademais, o aumento de expressão de proteínas relacionadas ao sistema oxidativo na região cambial pode ser considerado como um importante indicador de características indesejáveis em clones de *Eucalyptus* para a indústria de papel e celulose (BRITTO et al., 2012). Avaliando o proteoma da região cambial de *Eucalyptus*, por meio de separação eletroforética de géis bidimensionais e análise de espectrometria de massas, Britto et al. (2012) identificaram a expressão diferencial de proteínas, principalmente relacionadas com o sistema antioxidante e na resposta ao estresse, em clones cuja as características da madeira é considerada inferior para indústria de papel e celulose, evidenciando que o aumento da regulação dessas proteínas está relacionado a perdas nas propriedades da madeira.

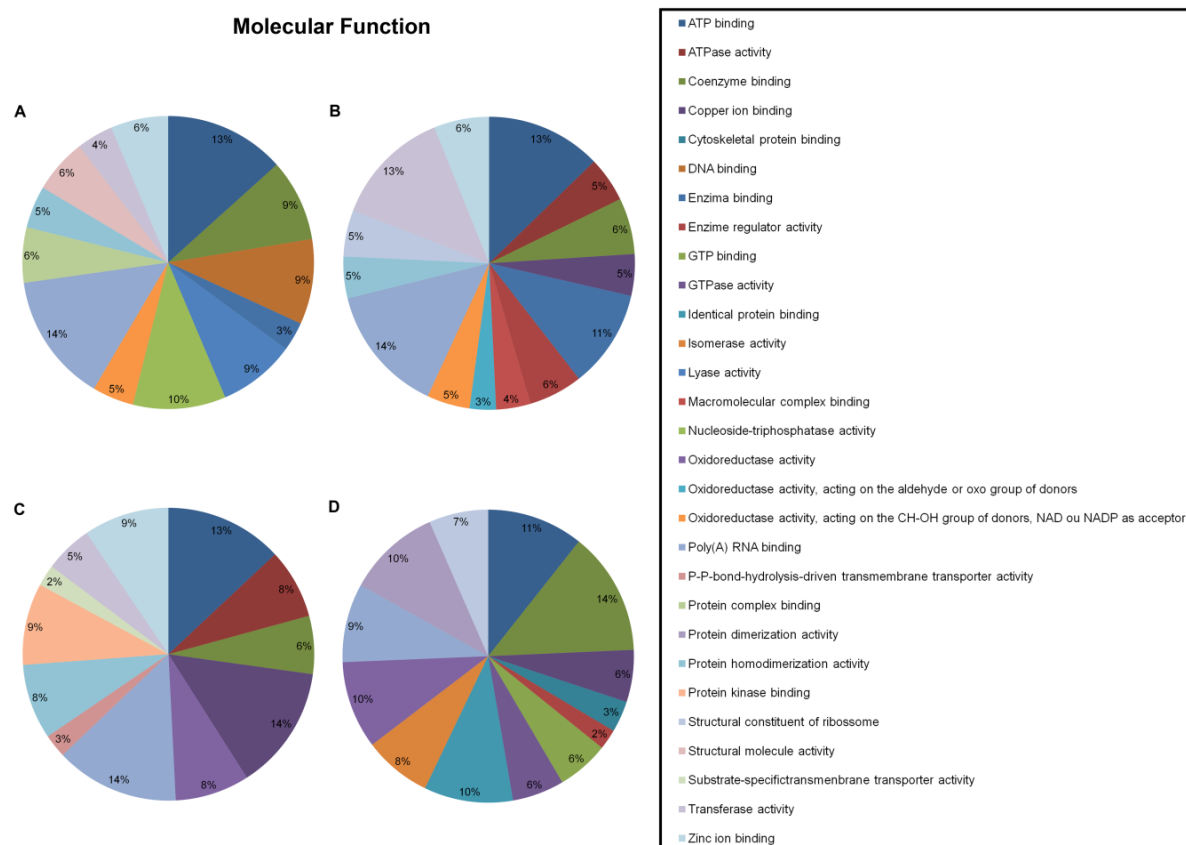


Figura 5: Classificação nível 2 por função molecular das 296 proteínas diferencialmente reguladas em caules de *Eucalyptus*. **A e B:** proteínas diferencialmente reguladas em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa e alta temperatura, respectivamente; **C e D:** proteínas diferencialmente reguladas em *E. grandis* cultivadas em baixa e alta temperatura, respectivamente.

Visando uma avaliação mais restrigente dos resultados contendo as 296 proteínas diferencialmente expressas, segundo o critério T-Fold, uma segunda seleção foi realizada somente para essa população de identificações. Para tal, foi calculado o índice espectral (“spectral index”) para todas as identidades e 1000 permutações randômicas foram realizadas visando a determinação das proteínas mais diferencialmente reguladas (a 5% de significância) após os tratamentos térmicos descritos na seção anterior. Mediante essa estratégia, foram identificadas 16 e 38 proteínas com alteração em sua abundância exclusivamente em *E. grandis* e *E. globulus*, respectivamente, e 12 proteínas em ambas as espécies. Dentre

essas, destacam-se proteínas relacionadas aos processos biológicos de resposta ao estresse, envolvidas em processos de oxidorreductase, relativas aos fotossistemas e relacionadas com a lignificação.

A exposição de plantas a temperaturas extremas interfere em diversos processos biológicos que podem levar a alterações acentuadas no proteoma, tais como fotossíntese, remoção de EROs, metabolismo energético e do carbono, mecanismo de defesa, entre outros (JOHNOVÁ et al., 2016). Dentre todos os processos afetados por altas temperaturas, a fotossíntese é a mais sensível. De maneira semelhante, plantas submetidas ao frio sofrem interferência na atividade fotossintética, e também na fotorrespiração (JOHNOVÁ et al., 2016).

Embora, em tecidos caulinares, a resposta fotossintética diferencial não seja esperada, caules jovens são fotossinteticamente ativos. Nesse estudo, proteínas relacionadas com os fotossistemas e com a fotorrespiração, foram identificadas como diferencialmente acumuladas apenas em plantas de *E. globulus*. Em comparação com a média temperatura, uma proteína identificada como do fotossistema II, a “Photosystem II protein – PSII” (Eucgr.A00264.1), teve a indução de expressão em baixa e alta temperatura, em aproximadamente 2,5 e 2,3 vezes, de modo respectivo. Contrariamente, uma proteína do fotossistema I, a “Photosystem I reaction centre subunit IV/PsaE” (Eucgr.B02162.1), teve a expressão suprimida em -3,4 vezes nas plantas mantidas em baixa temperatura. De modo semelhante, uma enzima que possui função molecular redox na via da glicólise, a “NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” (Eucgr.C02594.1), foi identificada com regulação inibida de -2,5 vezes em plantas de *E. globulus* submetidas a alta temperatura. Corroborando com os dados obtidos, a supressão da expressão das enzimas “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” (ČERNÝ et al., 2014) e “PSI reaction center subunit II-2” (ROCCO et al., 2013), já foi observada em plantas de *Arabidopsis* expostas a baixa temperatura. Demonstrando, que a supressão dessas enzimas é evidenciada em plantas submetidas a temperaturas extremas.

A maioria dos fatores abióticos provocam diversos danos as células, e o estresse oxidativo é uma das principais causas resultantes desses estresses (JOHNOVÁ et al., 2016). A produção excessiva de EROs é um fenômeno comum

em plantas sob estresses abióticos e, quando ocorre em níveis elevados, pode afetar negativamente o metabolismo celular, havendo a necessidade de neutralização através de moléculas antioxidantes. Proteínas relacionadas com a eliminação de EROs foram identificadas como diferencialmente acumuladas em caules de *E. grandis*. A enzima “Peroxiredoxin” (Eucgr.C03812.1) foi identificada com indução de expressão de 1,7 vezes, em caules expostos a alta temperatura. Essa proteína, por sua vez, pertence a uma família de enzimas antioxidantes que catalisam reações oxirredutases, conhecidas como peroxidases (EC 1.11.1.x). A indução da regulação de enzimas dessa família também foi observada em plantas de arroz submetidas a alta temperatura (LIAO et al., 2014). Contrariamente, a proteína “Glutathione S-transferase” (Eucgr.K01232.1) foi identificada em caules de *E. grandis* cultivados em baixa temperatura com expressão suprimida de -3,2 vezes. A família de genes “glutathione S-transferase” (GST) é composta por enzimas de desintoxicação envolvidas na tolerância ao estresse, e que podem desempenhar um papel importante na tolerância ao frio (JOHNOVÁ et al., 2016). Esses resultados reforçam a hipótese de que o estímulo térmico por altas temperaturas leva a uma maior expressão de enzimas relacionadas com a eliminação de EROs em plantas de *Eucalyptus*, sendo mais ressaltado em plantas de *E. grandis*. Além do mais, o conhecimento sobre a regulação dessas proteínas em plantas de *Eucalyptus* expostas a alta e baixa temperatura, pode constituir de base para o desenvolvimento de variedades tolerantes frente a esses fatores limitantes.

Proteínas de resposta a estresse, tais como, “Heat shock protein”, “Chaperonin”, “Annexin”, “Cold shock domain containing proteins”, “GDSL-like Lipase/Acylhydrolase” e “DEAD/DEAH box RNA helicase 15”, foram identificadas com alteração de abundância em plantas de *E. globulus*. As proteínas “Heat shock protein” (HSP) e outras chaperonas são comumente encontradas em resposta ao estresse por temperatura, essas por sua vez atuam impedindo a desnaturação e protegendo as proteínas da agregação (BRITTO et al., 2012; JOHNOVÁ et al., 2016). As HSP são abundantes no proteoma de *Eucalyptus* (GONÇALVES et al., 2011) e sob condição de estresse, facilitam a dobragem de proteínas e ajudam na estabilização de proteínas e membranas (BRITTO et al., 2012). Duas proteínas “Heat shock protein 70KDa” foram identificadas com regulação diferencial, as

proteínas Eucgr.J02987.1 e Eucgr.J02991.1, ambas com indução de expressão em baixa temperatura de 3,7 e 3,1 vezes, de modo respectivo. Também foi identificada com acumulação diferencial, uma chaperona envolvida no processamento de proteínas, a “Chaperonin ATPase/Chaperonin” (Eucgr.K02244.1), que teve a expressão induzida em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa e alta temperatura, com variação de abundância de 5,9 e 3,5 vezes, respectivamente. Apesar de chaperonas e proteínas HSP apresentarem alterações mais proeminentes frente ao estresse de alta temperatura (JOHNOVÁ et al., 2016), identificou-se a regulação diferencial dessas proteínas frente ao estímulo de baixa temperatura, evidenciando o papel fundamental dessas proteínas na resposta a esse estímulo térmico.

Outras proteínas de resposta ao estresse também foram identificadas em caules de *E. globulus*. As anexinas são proteínas responsivas ao estresse, mas que também podem atuar no estresse oxidativo de plantas, assim como as peroxidases. A expressão diferencial de proteínas anexinas foi anteriormente identificada em caules de *Eucalyptus* (BRITTO et al., 2012). No presente trabalho, observou-se a indução de expressão de duas isoformas de proteínas “Annexin” em caules de plantas expostas a alta temperatura, a isoforma Eucgr.H04787.2, com indução de regulação de 2,7 vezes e a isoforma Eucgr.H04787.5, com indução de 2,5 vezes. As proteínas “Cold shock domain” desempenham funções importantes no desenvolvimento e adaptação ao estresse, principalmente, no que diz respeito a aclimação ao frio (SASAKI; IMAI, 2012). Em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa temperatura houve a indução de expressão em 3,9 vezes da proteína “Cold shock domain containing proteins” (Eucgr.I01395.1). Semelhantemente, houve a indução de expressão de 4,5 vezes de uma proteína reguladora de transcrição, a “DEAD/DEAH box RNA helicase 15” (Eucgr.C01749.2), em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa temperatura. Embora a função de proteínas “DEAH box” não esteja totalmente elucidada, essas são candidatas como chaperonas de RNA (JOHNOVÁ et al., 2016). Contrariamente, a expressão de uma proteína que desempenha papel de destaque em resposta ao estresse abiótico (TAN et al., 2014), a lipase “GDSL-like Lipase/Acylhydrolase” (Eucgr.K03589.2), foi suprimida em -2,8 vezes em caules de *E. globulus* expostos a baixa temperatura.

A resposta diferencial em caules de *Eucalyptus* sugere diferenças importantes entre as espécies estudadas. Plantas de *E. grandis* apresentaram indução de expressão de enzimas antioxidantes no cultivo em alta temperatura e a supressão em exposição a baixas temperatura. Esses resultados podem estar ligados à características indesejáveis, no que diz respeito a composição química da madeira (BRITTO et al., 2012) em plantas de *E. grandis* quando comparadas com *E. globulus*. No entanto, foi identificada regulação diferencial em plantas de *E. globulus* de diversas proteínas responsivas ao estresse no estímulo por baixas temperatura, e essas proteínas podem estar ligadas com a melhor composição química da madeira de plantas de *E. globulus*, atuando mais eficientemente na manutenção da homeostase celular. Tais proteínas podem ser posteriormente estudadas quanto a interferência na composição química da madeira para direcionamento dos programas de melhoramento, com o intuito de produzir cultivares com melhor qualidade de madeira e mais adaptadas a condições adversas.

Os estresses causam danos às plantas e podem vir a interferir na composição química da madeira, afetando a deposição de lignina na parede celular (MOURA et al., 2010). No que concerne ao processo de lignificação, somente uma proteína foi identificada como diferencialmente acumulada em caules de *E. grandis*: a proteína “4-coumarate--CoA ligase 3” (Eucgr.K00087.1, 4CL), que apresentou indução de expressão de 4 vezes mais em baixa temperatura do que na condição de média temperatura. Contrariamente, em caules de *E. globulus*, a expressão da proteína 4CL foi suprimida em plantas cultivadas em temperaturas elevadas. Embora o último resultado não apresente expressão diferencial, pode-se indicar que há uma modulação positiva da expressão dessa proteína em plantas de *Eucalyptus* submetidas a baixa temperatura e essa modulação pode determinar diferenças importantes no processo de lignificação da madeira.

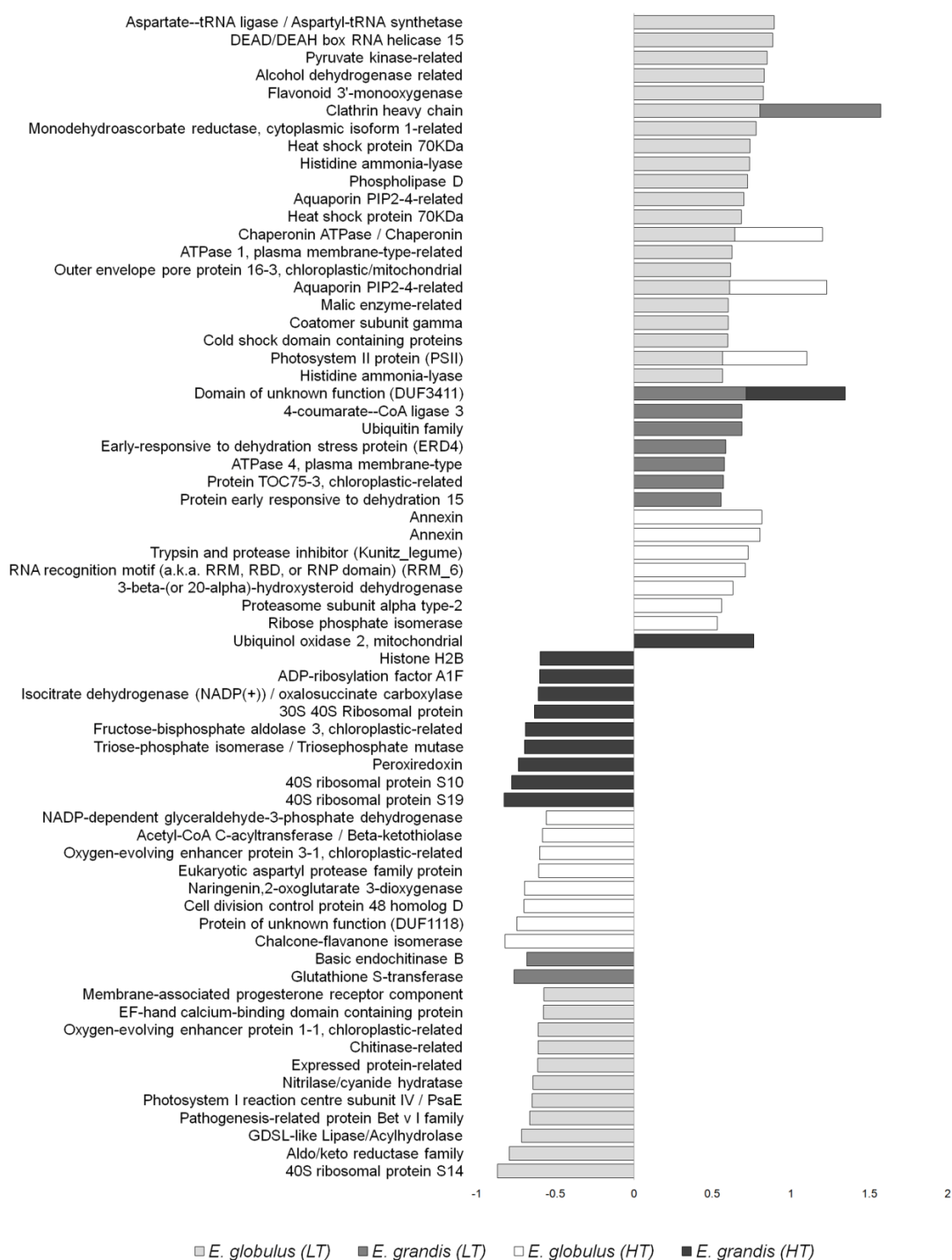


Figura 6: Proteínas com expressão induzida ou suprimida em caules de *E. globulus* e *E. grandis* sob estímulo térmico. Barras destacadas em cinza claro e branco, são proteínas diferencialmente reguladas em *E. globulus*, nas condições de baixa e alta temperatura, respectivamente; Barras em cinza e cinza escuro, correspondem a proteínas com regulação diferencial em *E. grandis*, nas condições de baixa e alta temperatura, respectivamente.

4.4. Mapeamento de vias metabólicas

Em virtude das flutuações climáticas globais, as plantas estão expostas a condições ambientais adversas com maior frequência. Ao passo que a temperatura diverge da faixa ótima de cultivo, modificações celulares e moleculares diversificadas ocorrem no interior da planta com a finalidade de conservar a homeostase celular (JOHNOVÁ et al., 2016). Os estresses causados por temperaturas extremas tem efeitos diversos nas plantas e podem vir a afetar negativamente o seu crescimento e desenvolvimento, interferindo em uma ampla variedade de processos fisiológicos (JOHNOVÁ et al., 2016).

Com o intuito de identificar as vias metabólicas relacionadas com o proteoma caulinar das espécies de *Eucalyptus* em estudo, realizou-se o mapeamento do proteoma global, das vias metabólicas do Kegg Metabolic Pathway e por predição de homologia com *Arabidopsis thaliana* (Figura 7). Adicionalmente, foi efetuado o mapeamento das vias metabólicas apenas das proteínas suprimidas e induzidas em caules de *E. globulus* e *E. grandis*, através da ferramenta iPath utilizando códigos KOs e números EC (Figura 8).

Dentre as proteínas identificadas em caules de *E. grandis* e *E. globulus*, 17,06% foram mapeadas e, estão principalmente relacionadas ao metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos e o metabolismo de lipídeos e carboidratos (Figura 7). Em relação ao metabolismo energético, houve a identificação de proteínas envolvidas no processo de fixação de carbono e do metabolismo do enxofre (Figura 7).

Para o metabolismo de lipídeos e carboidratos, obteve-se o mapeamento de proteínas relacionadas ao metabolismo central dos carboidratos; metabolismo de outros carboidratos envolvidos no ciclo do glicoxalato, fotorrespiração, via do malonato-semi-aldeído, biossíntese da trealose, degradação de pectina e biossíntese de açúcares nucleotídicos (glucose e galactose); metabolismo de ácidos graxos, mapeando as fases de iniciação e alongamento, síntese de ácido jasmônico, beta-oxidação e biossíntese de corpos cetônicos; biossíntese de isopropanóides em plantas e da via do mevalonato (Figura 7).

No que diz respeito ao metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo das purinas, pirimidinas, serina e treonina, cisteína e metionina, aminoácidos de cadeia ramificada e prolina e arginina; no metabolismo da lisina; na via de biossíntese de ornitina e ciclo da uréia; e no metabolismo de aminoácidos aromáticos, com destaque para biossíntese de fenilalanina, triptofano, tirosina, capsaicina e a via do chiquimato (Figura 7).

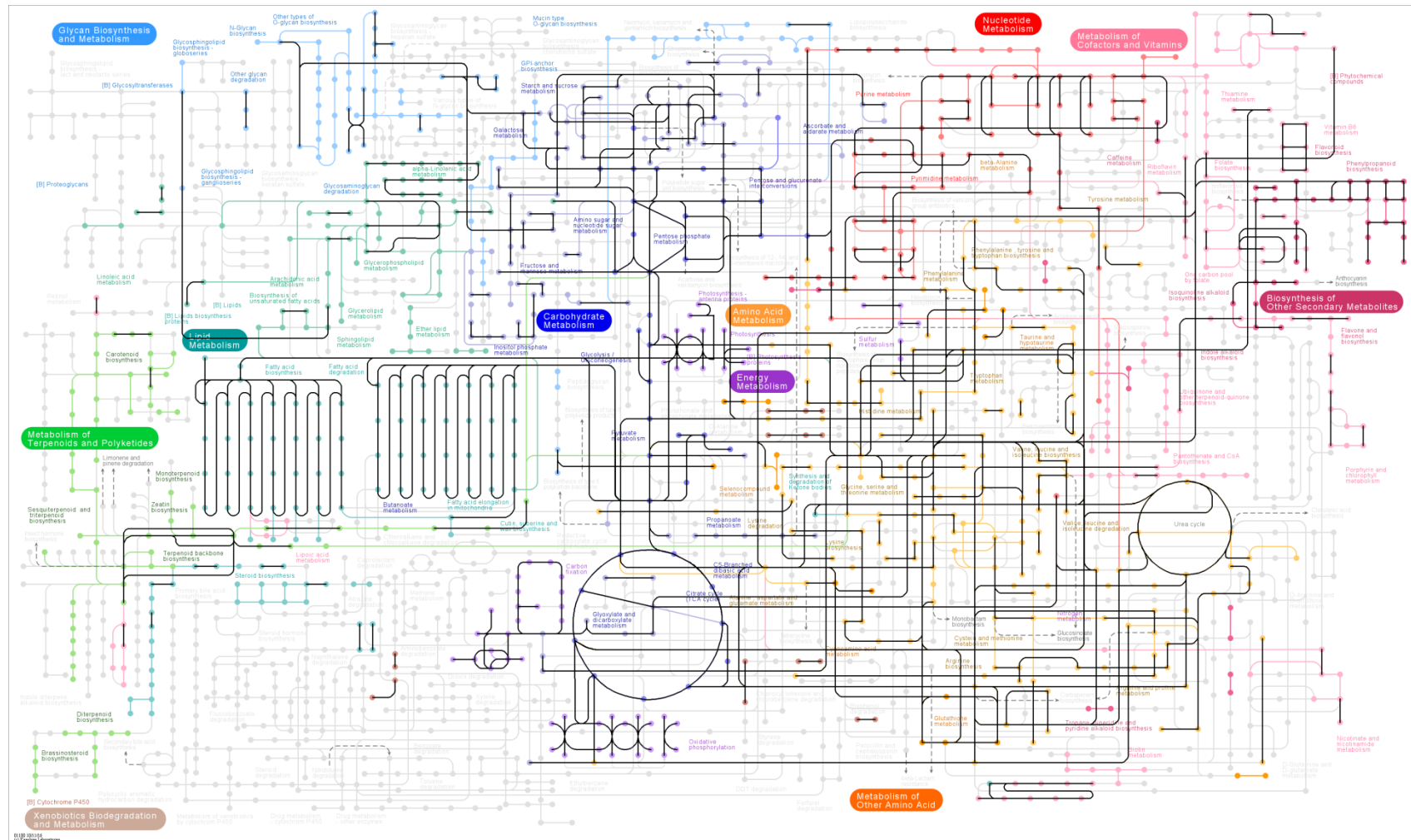


Figura 7: Rotas metabólicas em que as proteínas caulinares identificadas de *E. globulus* e *E. grandis* estão envolvidas. As proteínas identificadas estão destacadas em preto, e o mapeamento foi realizado por homologia entre as proteínas identificadas a partir do genoma de *E. grandis* com o organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, utilizando códigos AT, disponíveis no Phytozome, como entrada no banco de dados on-line Kegg Pathway.

Para as proteínas com regulação suprimida e induzida, obteve-se uma cobertura metabólica similar para *E. globulus* e *E. grandis* para as identificações relacionadas com o metabolismo energético, em que as espécies compartilham a maior parte das proteínas envolvidas na fixação de carbono (Figura 8). Em relação a síntese de fenilpropanóides as enzimas “trans-cinnamate 4-monooxygenase” (EC 1.14.13.11) e “4-coumarate-CoA ligase” (EC 6.2.1.12) foram identificadas para *E. globulus* e *E. grandis*, de modo respectivo. Algumas diferenças no metabolismo das espécies foram observadas, em plantas de *E. globulus* obteve-se uma cobertura mais abrangente com relação ao metabolismo de carboidratos e lipídeos do que em *E. grandis*, mapeando a via da pentose fosfato, o metabolismo de biossíntese de ácidos graxos relacionado com a fase de alongamento na mitocôndria, síntese de ácido jasmônico, beta-oxidação e biossíntese de corpos cetônicos; e, também, o metabolismo de lipídeos através da expressão diferencial de fosfolipases. Vale destacar que apenas em *E. grandis* houve a expressão diferencial da enzima do metabolismo de aminoácido e nucleotídeos a “Argininosuccinate synthase” (EC 6.3.4.5) que direciona para o ciclo da uréia (Figura 8).

Os resultados obtidos através do mapeamento de vias metabólicas das proteínas suprimidas e induzidas, correspondem com as respostas metabólicas esperadas em resposta ao estímulo térmico e que estão descritas na literatura. As principais modificações no proteoma de plantas após estresse por temperatura, incluem, principalmente, os processos metabólicos do metabolismo de carboidratos e proteínas, e a fotossíntese (JOHNOVÁ et al., 2016). Em relação ao metabolismo de carboidratos, a regulação diferencial de algumas enzimas chave do ciclo do TCA e do ciclo de glicoxilato foram descritas em plantas submetidas ao frio (JOHNOVÁ et al., 2016). Bem como, a indução de expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de UDP-glicose, glicólise e via pentose fosfato em plantas submetidas a alta temperatura, já foram observadas (JOHNOVÁ et al., 2016).

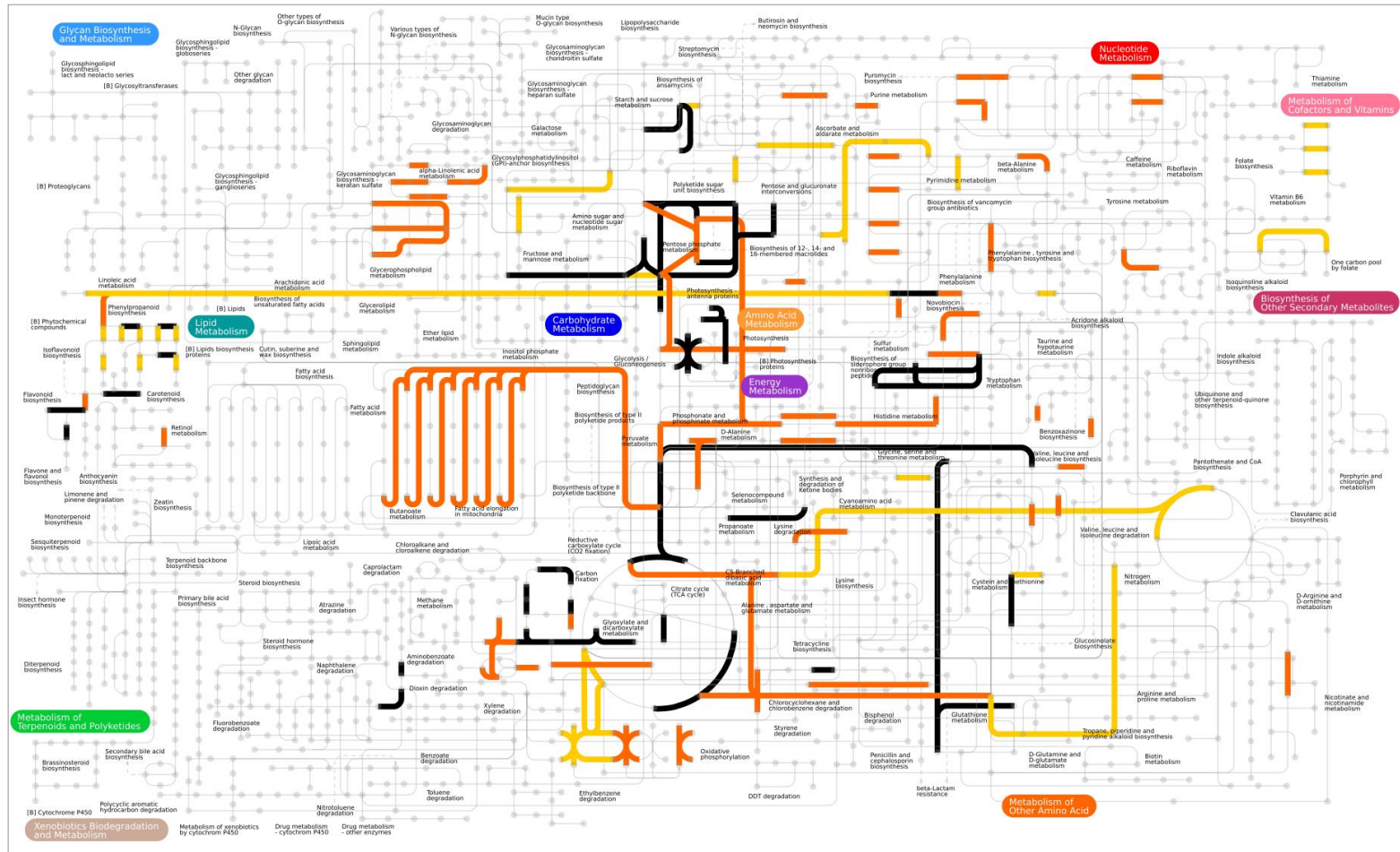


Figura 8: Vias metabólicas das proteínas diferencialmente reguladas em espécies de *Eucalyptus*. As proteínas foram identificadas a partir do teste Tfold, disponível na plataforma PatternLab. As proteínas diferencialmente reguladas (“up” e “down”) em *E. globulus* e *E. grandis* estão destacadas em laranja e amarelo, respectivamente, e, as proteínas diferencialmente expressas em ambas as espécies estão destacadas em preto. O mapeamento foi realizado através da ferramenta iPath, com códigos de entrada do tipo KOs e número EC.

4.5. O subproteoma antioxidante caulinar de espécies de *Eucalyptus* e a regulação através do estímulo térmico

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são elementos chave nas respostas ao estresse das plantas. Ascorbato peroxidase (APX), glioxalase (GLX), glutational peroxidase (GPX), peroxirredoxina (PRX), superóxido dismutase (SOD), tiorredoxina (TRX) e catalase (CAT) são as enzimas antioxidantes mais comuns em células vegetais (APEL; HIRT, 2004; FOYER, 2005; HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2012; CHOUDHURY et al., 2013). Em espécies de *Eucalyptus*, plantas de *E. dunnii* cultivadas a 4 °C apresentaram um aumento de 25% na atividade da CAT após três horas de exposição ao estresse (LIU et al., 2014). O aumento de expressão de catalase foi confirmado através de análise de transcriptômica em larga escala, onde os autores detectaram um aumento de duas vezes em transcritos relacionados com a CAT após 24 h de tratamento.

Usando a estratégia de proteômica do tipo GeLC-MS/MS juntamente com a busca restrigente do banco de dados das proteínas codificadas a partir do genoma de *E. grandis*, identificou-se 103 proteínas relacionadas com EROs em caules de *E. globulus* e *E. grandis* (Tabela 2A). Embora não seja estatisticamente significativa, uma análise combinada da expressão de todas as proteínas identificadas relacionadas ao sistema antioxidante em caules de plântulas de *E. globulus* indica um maior metabolismo anti-oxidativo em plantas cultivadas em HT do que em relação às cultivadas em LT (Figura 9). Contrariamente, uma pequena diferença foi encontrada em plantas de *E. grandis* cultivadas a diferentes temperaturas, sugerindo que as espécies de *E. globulus* podem ser mais sensíveis a essas mudanças de temperatura do que a espécie próxima *E. grandis*. O aumento de expressão das enzimas antioxidantes detectadas em caules de *E. globulus* cultivadas em HT corrobora com o estudo realizado por Macfarlane; Adams e Hansen (2002) a partir do qual foi detectado uma taxa de crescimento máximo em mudas de *E. globulus* cultivadas a 25 °C, nessa temperatura o aumento das taxas de respiração é contrabalançado pela diminuição da eficiência de conversão de carbono.

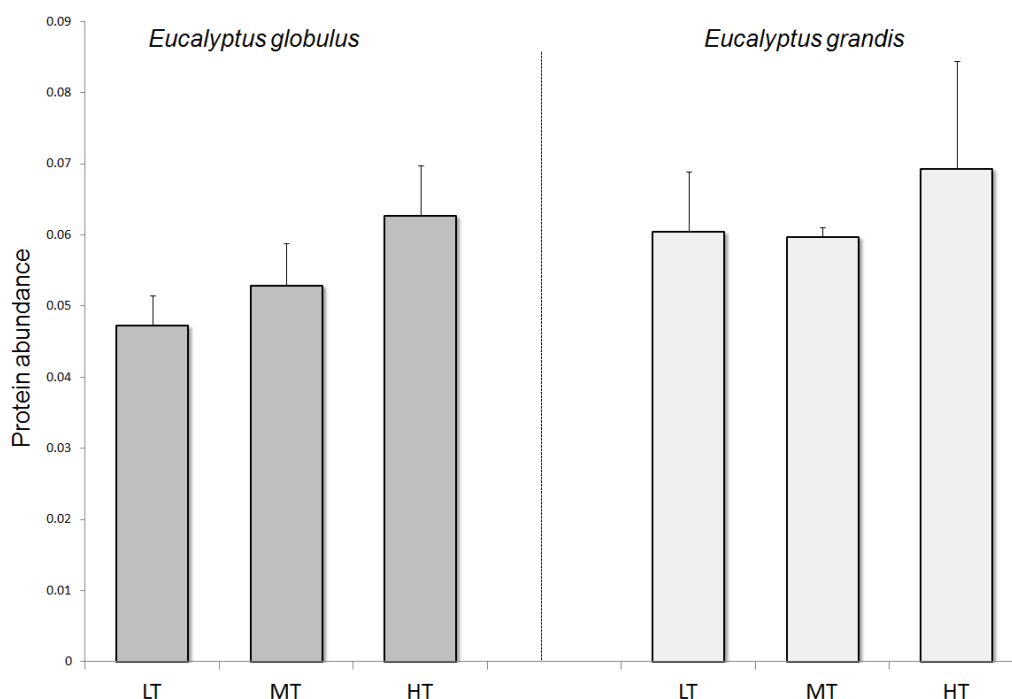


Figura 9: Abundância de proteínas de *E. globulus* e *E. grandis* relacionadas com o sistema antioxidante. Foram consideradas a soma do NSAF de todas as enzimas identificadas para cada condição ambiental estudada, em LT, baixa temperatura; MT, média temperatura e HT, alta temperatura.

Dentre as proteínas antioxidantes identificadas a tioredoxina foi a enzima com o maior número de cópias expressas, totalizando 38 proteínas do sub-proteoma antioxidante caulinar de *Eucalyptus* (Tabela 2A). De todas as 38 proteínas TRX, 16 foram identificadas como isoformas de sequências de apenas seis genes: Eucgr.B02223, Eucgr.F02962, Eucgr.K02606, Eucgr.K03198, Eucgr.H02332, Eucgr.K03531. Para os *loci* genéticos Eucgr.H02332 e Eucgr.K03531 foram identificadas quatro isoformas protéicas, sendo o último detectado em todas as amostras de *Eucalyptus*, e com localização subcelular prevista para o compartimento do retículo endoplasmático, o que sugere um papel constitutivo dessas proteínas no mecanismo de dobramento de proteínas. Outras proteínas envolvidas no sistema redox também foram identificadas em um grande número de cópias. Por exemplo, a enzima superóxido dismutase, envolvida na redução de radicais superóxidos, que representou 18 isoformas de proteínas codificadas por 7

genes diferentes. O maior número de isoformas de proteínas foi identificado para o gene Eucgr.K00110, do qual as proteínas codificadas foram altamente abundantes em ambas as espécies de *Eucalyptus* e estão preditas com localização subcelular exclusiva dos cloroplastos.

Os preditores *in silico* de localização subcelular (*i.e.* Predotar, WofPsort, PPDB, SUBA) indicaram que 53 proteínas caulinares são de localização cloroplastidial, uma importante fonte de produção de EROs em plantas (Figura 10). O agrupamento hierárquico de proteínas antioxidantes cloroplastidiais e mitocondriais sugere um perfil de regulação proteômica mais próximo entre as plantas de *E. globulus* cultivadas em LT e MT em relação ao perfil de regulação do subproteoma de plantas expostas a HT. Embora o perfil de regulação do proteoma antioxidante mitocondrial em caules de *E. grandis* sugira uma estreita relação entre todos os tratamentos de temperatura, as plantas de *E. grandis* cultivadas em LT e HT apresentaram um perfil de expressão de subproteoma mais próximo entre essas temperaturas em relação ao subproteoma cloroplastidial. Essas respostas diferenciais do perfil de expressão das proteínas antioxidantes entre as espécies de *Eucalyptus* estão de acordo com o uso distinto das espécies em regiões de plantio de clima tropical ou temperado, sugerindo uma característica de maior produção das enzimas antioxidantes quando as plantas de *E. globulus* são cultivadas em temperaturas mais elevadas. Consolidando os resultados obtidos na análise do proteoma global, através do agrupamento hierárquico, que evidenciam a indicação de localização de cultivo para as espécies em estudo. Além disso, confirma os dados obtidos para as proteínas diferencialmente reguladas, em que houve a identificação da indução de proteínas oxidoredutase frente ao estímulo térmico por alta temperatura.

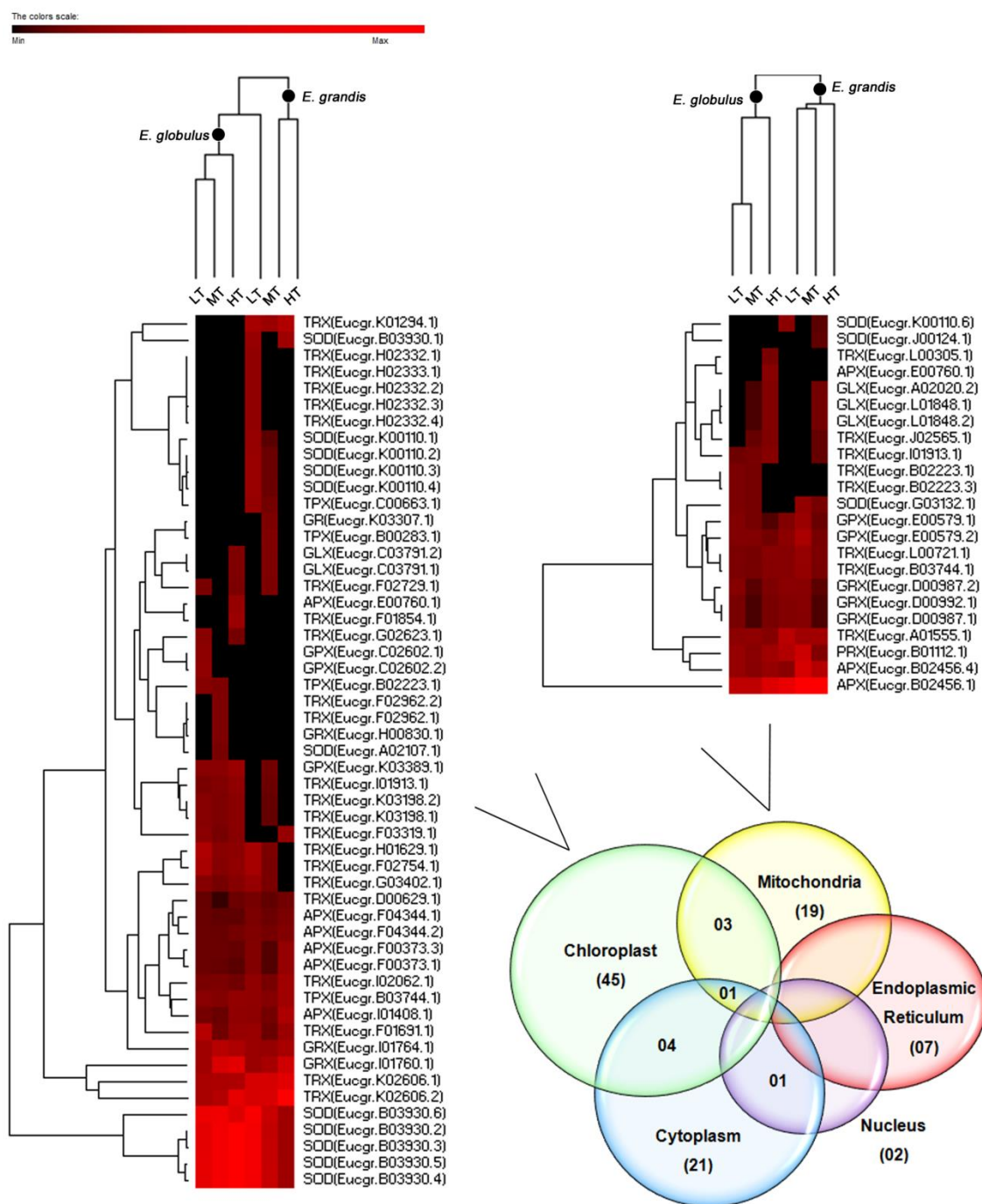


Figura 10: Enzimas antioxidantes mitocondriais e cloroplastidiais identificadas a partir de caules de plantas de *E. grandis* e *E. globulus* cultivadas em LT (baixa temperatura), MT (média temperatura) e HT (alta temperatura) conforme descrito na seção de Material e Métodos. As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com sua expressão relativa e localização subcelular predita, a partir do programa Permutmatrix. Preditores *in silico* foram utilizados para determinar a localização subcelular das proteínas identificadas.

Os genes que codificam as proteínas cloroplastidiais, SOD Eucgr.B03930, TRX Eucgr.K02606 e as GRXs Eucgr.I01764 e Eucgr.I01760, foram aqueles que apresentaram uma maior expressão e foram constitutivamente expressos em todos os tratamentos em ambas as espécies de *Eucalyptus* (Figura 10). De forma semelhante, os genes que codificam proteínas mitocondriais APX Eucgr.B02456, PRX Eucgr.B01112 e TRX Eucgr.A01555, também foram identificados como altamente expressos em *Eucalyptus* mediante a exposição aos tratamentos térmicos. De maneira geral, as isoformas de proteínas do sistema antioxidante mitocondrial e cloroplastidial apresentaram o mesmo perfil de regulação em todos os tratamentos. Todavia, a proteína SOD Eucgr.B03930.1 apresentou uma tendência de abundância específica, sendo hierarquicamente agrupada de forma distinta das outras isoformas do gene Eucgr.B03930. Enquanto que cinco isoformas cloroplastidiais derivadas do gene Eucgr.B03930 foram identificadas com alta expressão em todos os tratamentos térmicos em ambas as espécies de *Eucalyptus*, a isoforma Eucgr.B03930.1 foi identificada apenas em caules de *E. grandis* cultivados em LT e HT. Esse perfil de regulação único sugere o recrutamento específico desta isoforma para contrabalançar os danos do radical superóxido em cloroplastos de *E. grandis* cultivados sob estímulos térmicos extremos. Devido à sua alta abundância em ambas as espécies de *Eucalyptus*, foi realizada uma análise comparativa dedicada das isoformas do gene Eucgr.B03930. Foi encontrado um perfil de resposta muito similar para todas as isoformas dessa proteína, conforme indicado pelo agrupamento, e uma diferença significativa na abundância das isoformas Eucgr.B03930.2, Eucgr.B03930.3, Eucgr.B03930.4 e Eucgr.B03930.5 entre *E. grandis* e *E. globulus* cultivados em tratamento com HT (Figura 11), corroborando com a hipótese de que *E. globulus* é mais sensível a um estímulo de alta temperatura do que *E. grandis* e que os produtos de genes que codificam a enzima SOD desempenham um papel importante na resposta antioxidante.

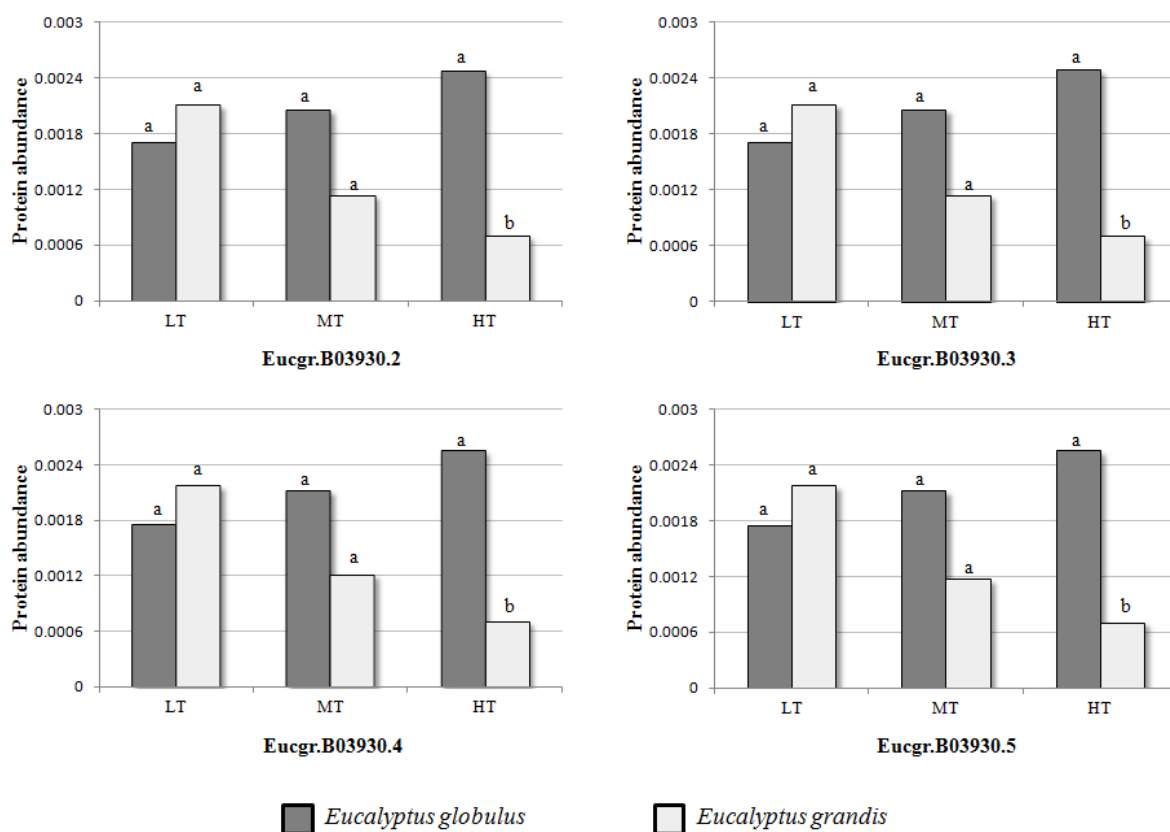


Figura 11: Abundância diferencial das variantes de superóxido dismutase (SOD) Eucgr.B03930 entre caules de *E. globulus* e *E. grandis*. As diferenças significativas foram determinadas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis com nível de confiança de 99%. Tratamentos: LT, baixa temperatura; MT média temperatura; HT, alta temperatura.

As peroxidases também são conhecidas por desempenhar um papel importante no metabolismo antioxidante. Foram identificadas 30 isoformas de peroxidase nos caules de *Eucalyptus*: 14 APXs, 09 GPXs e 07 TPXs/PRXs. A importância do metabolismo antioxidante em caules de *E. grandis* e *E. globulus* podem ser exemplificadas pela redundância da expressão de 14 isoformas de APX que são codificadas por apenas 7 genes (Eucgr.A01180, Eucgr.B02456, Eucgr.E00760, Eucgr.F00373, Eucgr.F04344, Eucgr.I01408 e Eucgr.J00965). Embora a maioria das isoformas de APX tenha sido identificada em ambas as espécies após todos os tratamentos térmicos, a isoforma Eucgr.E00760.1 foi detectada apenas em plantas de *E. globulus* cultivada em alta temperatura. A

isoforma Eucgr.I01408.2 também mostrou uma expressão preferencial em hastes de *E. globulus*, mas somente em plantas cultivadas em baixa temperatura. Do mesmo modo, duas isoformas GPX do gene Eucgr.C02602 foram identificadas apenas em hastes de *E. globulus* após tratamento em baixa temperatura.

Tiorredoxinas são proteínas de tamanho pequeno com a capacidade de reduzir outras espécies de proteínas devido à presença de dois resíduos de cisteína no sítio ativo canônico (MEYER; REICHHELD; VIGNOLS, 2005; MARTÍ et al., 2009; PFALZ et al., 2012; MARCHAL et al., 2014). É interessante notar, que as proteínas Eucgr.C00774.1 e Eucgr.H00536.1 foram identificadas nas hastes das plantas de *E. grandis* e *E. globulus* e estão preditas como TRX nucleares. Embora a primeira não tenha mostrado diferenças de expressão entre os ensaios dos tratamentos térmicos e entre as espécies de *Eucalyptus*, a última foi sobre-induzida em caules de *E. grandis* cultivados em LT e HT em relação aos cultivados em MT (Tabela 2A). A localização de tiorredoxinas nucleares já foi observada em outras espécies de plantas (SERRATO et al., 2001; MARTÍ et al., 2009; PULIDO; CAZALIS; CEJUDO, 2009). Entretanto, o papel exato desta família de proteínas dentro dos núcleos das plantas permanece desconhecido. As TRX nucleares podem estar diretamente envolvidas na regulação da expressão gênica ou indiretamente envolvidas na expressão de genes específicos controlando os níveis de EROs dentro dos núcleos das plantas. Serrato e Cejudo (2003), observaram uma localização subcelular predominante de tiorredoxinas nucleares em sementes de trigo estimuladas pelo estresse oxidativo; Enquanto Pulido, Cazalis e Cejudo (2009) identificaram o envolvimento da TRX na regulação dos fatores de transcrição no estresse oxidativo. Marchal et al. (2014) identificaram um novo sistema para as TRX nucleares, que estariam envolvidas na fertilidade do pólen em plantas de *Arabidopsis*. A indução de TRX nucleares em plantas de *E. grandis* pode estar relacionada à sua maior adaptação a diferentes condições climáticas em comparação com a espécie próxima *E. globulus*. No entanto, a cascata de sinalização no núcleo, induzida pelo estímulo de temperatura e os genes-alvo que podem ser regulados por este estresse abiótico ainda merecem mais estudos em espécies de *Eucalyptus*.

4.6. O metabolismo de lignificação de *Eucalyptus* e as modificações decorrentes ao estímulo térmico

Depois da celulose, a lignina é o composto orgânico mais abundante na Terra (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). A lignina é sintetizada pela polimerização oxidativa de três precursores: álcool cumarílico, coniferílico e sinapílicos, que também são denominados como monômeros de lignina ou monolignóis; os quais, uma vez liberados na parede celular, são oxidados por lacases e peroxidases e depois submetidos a acoplamento combinatório oxidativo (CESARINO et al., 2012). Por incorporação no esqueleto de lignina, estes precursores são então designados por unidades de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Os monómeros de lignina diferem no grau de metoxilação no seu anel aromático (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003) e assim, dependendo da composição da lignina, a recuperação da celulose pode ser afetada pela sua composição nativa.

Usando a estratégia de proteômica descrita neste manuscrito, identificamos e quantificamos 27 isoformas de proteínas potencialmente envolvidas na biossíntese de lignina nas espécies estudadas. Recentemente, Carocha et al. (2015) realizou um levantamento do genoma dos genes envolvidos na biossíntese dos monolignóis e identificou 38 genes de *E. grandis* pertencentes ao clado *bona fide* da lignina. Adicionalmente, utilizou diferentes tratamentos com o objetivo de induzir a lignificação e estudar as mudanças na expressão desses genes e sugeriram que 17 produtos gênicos estão diretamente envolvidos na lignificação do xilema de *Eucalyptus*. Esse conjunto foi chamado pelos autores de “toolbox” da lignificação. Nossa abordagem de proteômica resultou na identificação de 13 dos 17 genes diretamente relacionados com a lignificação (Figura 12). As únicas proteínas não identificadas neste trabalho foram as codificadas pelos genes *EgrC4H2*, *EgrC3`H4*, *EgrCAD3* e *EgrCCR1*, o único representante do clado Cinamoil CoA redutase (CCR). A falta dessas identificações pode ser atribuída aos desafios técnicos enfrentados pela comunidade proteômica para extrair, solubilizar e adquirir com sucesso dados de espectrometria de massas a partir de organismos não-modelo com o objetivo de conseguir uma cobertura profunda do proteoma celular em uma única leitura. Adicionalmente, é necessário enfatizar a existência potencial de isoformas não

descritas anteriormente para as espécies estudadas, contendo polimorfismos de aminoácidos não previstos no genoma utilizado para pesquisa de banco de dados.

Das nove isoformas de fenilalanina-amônia-liase (PALs) sugeridas nos 38 genes de “bona fide”, foram identificados oito na análise do proteoma em estudo, incluindo as isoformas PAL3 e PAL9 sugeridas como diretamente relacionadas com à biossíntese de lignina (Figura 12). A abundância de proteínas de ambas as isoformas foi aumentada nos tratamentos de alta e baixa temperatura para espécies de *E. globulus* e *E. grandis*, sendo essas diferenças mais proeminentes para as hastes de *E. globulus* cultivadas no ambiente LT. Como a enzima PAL desempenha um papel duplo na biossíntese de lignina e outros fenilpropanóides, mudanças na abundância de isoformas PAL, como mostrado aqui (Figura 12), não podem ser categoricamente determinadas como envolvidas no processo de lignificação. No entanto, é possível afirmar que essas isoformas podem estar envolvidas em respostas de temperatura em caules de *E. globulus* e *E. grandis*. De acordo com os dados de regulação obtidos para as isoformas PAL, os dados quantitativos da enzima ácido cinâmico-4-hidroxilase (C4H) indicam uma estimulação do percurso biossintético lignina/fenilpropanóide quando as plantas são cultivadas a 10 ou 32 °C.

As primeiras diferenças na abundância das enzimas relacionadas à lignificação entre *E. globulus* e *E. grandis* foram detectadas para as enzimas 4-cumarato:CoA ligase (4CL) e *p*-cumarato-3-hidroxilase (C3H). Nos caules de *E. globulus*, a regulação da 4CL1 foi inibida em plantas expostas a temperaturas elevadas. Do mesmo modo, verificou-se que a isoforma C3H3 teve a expressão suprimida quando as plantas de *E. globulus* foram expostas ao tratamento de alta temperatura. Em contraposição, a regulação da 4CL1 foi induzida em caules de *E. grandis* cultivados nas mesmas condições, e, para a isoforma de C3H não se obteve dados de espectrometria de massas (Figura 12). É importante salientar que a ausência de identificação não é uma evidência da falta de expressão gênica, mas uma sugestão de que este produto gênico estava presente em tão baixo número de cópias que impediu uma identificação confiante pela técnica analítica utilizada neste estudo.



Figura 12: Abundância relativa de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina de *Eucalyptus*. A abundância das proteínas são mostrados em termos de NSAF. Tratamentos: LT, baixa temperatura; MT: média temperatura; HT: alta

temperatura. Abreviatura das enzimas: PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, ácido cinâmico-4-hidroxilase, 4CL, 4-cumarato:CoA-ligase, HCT, Hidroxicinamoil-CoA:chiquimato/quinato hidroxicinamoil-transferase; C3H, *p-cumarato*-3-hidroxilase; CSE, cafeoil chiquimato esterase; CCoAOMT, Cafeoil-CoA-*o*-metiltransferase; CAD, álcool cinâmico-desidrogenase; COMT, ácido caféico/ácido 5-hidroxiferúlico-*o*-metiltransferase; F5H, ácido ferúlico-5-hidroxilase. As isoformas de proteínas sublinhadas, denotam os produtos gênicos indicados por Carocha et al. (2015) como aqueles diretamente envolvidos na biossíntese de lignina de *Eucalyptus*. Quadrados em vermelho e verde representam diferença significativa da regulação “up” e “down”, respectivamente, de acordo com o teste Kruskal-Wallis ($p < 0.01$). Quadrados em cinza indicam a ausência de diferença significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.01$).

Uma das primeiras enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, um dos ramos da via geral de fenilpropanóides, é a enzima hidroxicinamoil-CoA:chiquimato/quinato hidroxicinamoil-transferase (HCT). No presente trabalho, identificamos as duas isoformas de HCT diretamente envolvidas no processo de lignificação. A abundância da isoforma HCT5 foi aumentada quando ambas as espécies de plantas foram cultivadas em alta temperatura. Embora a isoforma HCT4 não tenha sido identificada nas hastes de *E. grandis*, esta isoforma mostrou um perfil oposto, em relação à outra isoforma de proteína, uma vez que se observou uma regulação positiva em hastes de *E. globulus* apenas quando as plantas foram cultivadas em baixa temperatura. A metilação na via de lignificação dos *Eucalyptus* é catalisada pelas enzimas CCoAOMT1, CCoAOMT2 e COMT1. A partir dos dados proteômicos, foram observados perfis de regulação similares para essas isoformas em plantas de *E. globulus* e *E. grandis* após crescimento em diferentes condições térmicas, e, portanto, a partir desses dados, nenhuma importância biológica pode ser atribuída com base na abundância destas enzimas.

Historicamente, a cafeoil chiquimato esterase (CSE) é a enzima descrita mais recentemente como envolvida na biossíntese de lignina (VANHOLME et al., 2013). A importância da CSE foi recentemente ressaltada para a lignificação das espécies vegetais, uma vez que a perda de função dessa enzima em mutantes de *Medicago truncatula* afetou profundamente o seu crescimento, enquanto nenhum ortólogo CSE foi encontrado nas gramíneas *Brachypodium distachyon* e *Zea mays* (HA et al., 2016). A CSE catalisa a síntese do ácido cafeoil chiquímico para ácido caféico, que é então convertido em cafeoil-CoA pelo 4CL depois de passar pela atividade da enzima HCT. A enzima CSE foi inicialmente encontrada em mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficiente em CSE e foi sugerido como uma via alternativa para a cafeoil CoA. Nossos dados confirmam a expressão do CSE em organismos do gênero *Eucalyptus* e indicam maior abundância na espécie *E. globulus* em relação a *E. grandis*.

Devido às suas estruturas semelhantes, a biossíntese do monolignol depende principalmente da atividade do mesmo conjunto de enzimas. Entretanto, a ácido ferúlico-5-hidroxilase (F5H) é uma enzima chave na catalisação da síntese de álcool sinapílico e, conseqüentemente nas porções de lignina S. Em virtude da sua posição

específica na via de biossíntese de lignina, as alterações na abundância ou atividade desta enzima podem resultar numa maior biossíntese dos monolignóis S ou G. Os dados do proteoma obtido mostram uma distinção nítida na abundância da isoforma F5H1 entre as hastes de *E. globulus* e *E. grandis*. As plantas de *E. globulus* cultivadas em condição controle (MT) mostram uma maior abundância constitutiva de F5H1 em relação às hastes de *E. grandis*. Tal diferença corrobora com a alta relação S/G relatada em *E. globulus* em relação à matriz de lignina de *E. grandis*. É interessante notar que as mudanças na abundância desta isoforma são pronunciadas nos caules de *E. grandis* dependendo do estímulo térmico aplicado, por exemplo, o tratamento de alta temperatura resultou em um aumento expressivo na abundância desta isoforma (Figura 12). Embora a regulação positiva de uma única enzima possa não ser suficiente para resultar numa alteração fenotípica, a F5H1 pode ser considerada um alvo chave para a engenharia genética com o objetivo de aumentar a recuperação da celulose de *E. grandis* a partir da matriz de lignocelulose.

Finalmente, a álcool cinamílico-desidrogenase (CAD), que é uma enzima envolvida na redução de aldeídos hidroxicinamoil em seus alcoóis correspondentes, sendo a última enzima conhecida na biossíntese de monolignóis, mostrou um perfil de regulação contrastante entre as espécies estudadas. Enquanto a biossíntese de CAD2 foi reprimida nos caules de plantas de *E. globulus* cultivadas em alta temperatura. A abundância desta isoforma de proteína foi aumentada em caules de plantas de *E. grandis* cultivadas em alta temperatura. A razão exata pela qual CAD2 mostrou este perfil de regulação contrastante não pode ser concluída com base apenas nos dados de proteômica. No entanto, devido ao papel obrigatório e ubíquo na biossíntese de monolignóis, sugere um maior acúmulo de lignina em plantas de *E. globulus* cultivadas a baixa temperatura do que em plantas cultivadas em alta temperatura. Ao contrário, as plantas de *E. grandis* devem potencialmente acumular mais lignina nas hastes quando cultivadas em climas de alta temperatura. Embora não tenhamos realizado um ensaio de lignina para medir a abundância deste metabólito nas espécies avaliadas e nas condições propostas no presente trabalho, o uso preferencial de uma dessas espécies em regiões tropicais ou temperadas, corrobora com nossos achados quanto ao perfil de abundância de CAD2.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Para nosso conhecimento, este é o estudo proteômico mais abrangente realizado no gênero *Eucalyptus*. Os resultados aqui apresentados sugerem mecanismos diferenciais de resposta entre as espécies de *E. globulus* e *E. grandis* e que essas diferenças são mais proeminentes quando as plantas são expostas a estímulos térmicos extremos. Evidenciando, que a exposição a altas temperaturas promove uma maior expressão de proteínas relacionadas com o sistema oxidativo, o que pode ser um indicativo de madeira com características inferiores.

O estresse por temperatura acarreta em maior expressão de proteínas relacionadas com o sistema antioxidante e com a resposta ao estresse. A expressão diferencial de proteínas relacionadas com o sistema redox em plantas de *E. grandis*, sugere uma relação direta com as diferenças na composição química da madeira entre as espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas. Plantas de *E. globulus* são mais adaptadas a regiões de clima ameno. No entanto, foram identificadas diversas proteínas responsivas ao estresse em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa temperatura. Essas respostas diferenciais podem estar relacionadas com uma maior eficiência de manutenção da homeostase celular e com a melhor composição química da madeira dessas plantas em comparação com plantas de *E. grandis*.

Os mapeamentos de vias metabólicas corresponderam as rotas descritas como de resposta ao estímulo térmico e as identificações do proteoma das espécies de *Eucalyptus* estudadas, estão envolvidas, principalmente, na via do metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos e no metabolismo de lipídeos e carboidratos. As principais modificações no proteoma diferencial de plantas de *Eucalyptus* frente ao estresse por temperatura, incluíram, principalmente, o metabolismo de carboidratos e a síntese de fenilpropanóides.

A identificação e quantificação da maior parte do “toolbox” de lignificação permitiu identificar as alterações induzidas pelo estresse abiótico aqui avaliado. Considerando todos os dados de quantificação das proteínas descritas no conjunto de dados proteicos, pode-se inferir que a rota biossintética de lignina é estimulada em plantas de *E. globulus* cultivadas em baixa temperatura; enquanto a rota

biossintética da lignina de *E. grandis* é induzida durante o crescimento em ambientes de alta temperatura.

A relação entre a interferência frente a estímulos térmicos, das proteínas responsivas ao estresse e relacionadas com a atividade antioxidante, com a composição química da madeira merecem ser investigadas mais profundamente. Um estudo sobre a relação entre a atividade enzimática e expressão dessas proteínas antioxidantes também devem ser propostos, com o intuito de direcionar os programas de melhoramento para obtenção de cultivares mais adaptadas a condições climáticas adversas. Finalmente, é importante mencionar que as identidades protéicas aqui descritas, podem ser utilizadas na engenharia genética de plantas visando um rendimento lignocelulósico mais elevado.

6. REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico ABRAF 2013, ano base 2012**. Brasília, 2013.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BHUIYA, M. W.; LIU, C-J. Engineering monolignol 4-O-Methyltransferases to modulate lignin biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 277–285, 2010.
- BHUIYAN, N. H.; SELVARAJ, G.; WEI, Y.; KING, J. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, p. 158–159, 2009.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519–546, 2003.
- BOGUSZEWSKA, D.; ZAGDAŃSKA, B. ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. In: LUSHCHAK, V.; SEMCHYSHYN, H. M. (Eds.). **Oxidative stress—molecular mechanisms and biological effects**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012, p. 341-362.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITTO, D. S.; PIROVANI, C. P.; GONZALEZ, E. R.; SILVA, J. F.; GESTEIRA, A. S.; CASCARDO, J. C. M. Oxidative stress proteins as an indicator of a low quality of eucalyptus clones for the pulp and paper industry. **Genet Mol Res**, v. 11, p. 3798-3813, 2012.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.
- CARAUX, G.; PINLOCHE, S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. **Bioinformatics**, v. 21(7), p. 1280-1281, 2005.

CAROCHA, V.; HEFER, C.; CASSAN-WANG H.; FEVEREIRO, P.; ALEXANDER, A.; PAIVA, J. A. P.; GRIMA-PETTENATI, J. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. **New Phytol.**, v. 4, p. 1297–1313, 2015.

CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S.; XU, T.; YATES, J. R.; BARBOSA, V. C. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, v. 13, p. 13-19, 2012.

CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F.V.; SANTOS, M.D.; FISCHER, J. S.; AQUINO, P.F.; MORESCO J. J; YATES J. R; BARBOSA, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature protocols**, 2016.

ČERNÝ, M.; JEDELSKÝ, P. L.; NOVÁK, J. A. N.; SCHLOSSER, A.; BRZOBOHATÝ, B. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. **Plant, cell & environment**, v. 37(7), p. 1641-1655, 2014.

CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; DOMINGUES JÚNIOR, A. P.; MAZZAFERA, P. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Braz. J. Bot.**, v. 35, p. 303–311, 2012.

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

CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signal. Behav.**, v 8, p. e23681, 2013.

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

COSTA E SILVA, F.; SHVALEVA, A.; BROETTO, F.; ORTUÑO, M. F.; RODRIGUES, M. L.; ALMEIDA, M. H.; CHAVES, M.M.; PEREIRA, J. S. Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. **Tree physiology**, v. 29(1), p. 77-86, 2009.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Front. Environ. Sci.**, v. 2, p. 53, 2014.

DAS, P.; NUTAN, K. K.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 70, 2015.

DASGUPTA, M. G.; DHARANISHANTHI, V.; AGARWAL, I.; KRUTOVSKY, K. V. Development of genetic markers in *Eucalyptus* species by target enrichment and exome sequencing. **PLoS One**, v. 10, p. e0116528, 2015.

DIAS, L. L. C.; BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 23-33, 2010.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, p. 22–24, 2013.

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

FERNÁNDEZ, M.; VALENZUELA, S.; BARRAZA, H.; LATORRE, J.; NEIRA, V. Photoperiod, temperature and water deficit differentially regulate the expression of four dehydrin genes from *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 26, p. 1483–1493, 2012.

FERNÁNDEZ, M.; VILLARROEL, C.; BALBONTÍN, C.; VALENZUELA, S. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 1109–1116, 2010.

FOYER, C. H. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell Online**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FU, X.; GHARIB, S. A.; GREEN, P. S.; AITKEN, M. L.; FRAZER, D. A.; PARK, D. R.; VAISAR, T.; HEINECKE, J. W. Spectral index for assessment of differential protein expression in shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 7(3), p. 845-854, 2008.

GAMBOA, M. C.; RASMUSSEN-POBLETE, S.; VALENZUELA, P. D. T.; KRAUSKOPF, E. Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *Eucalyptus globulus*. **Plant Physiol. Biochem**, v. 45, p. 1-5, 2007.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomic. **Nucleic Acids Res**, v. 40, p. D1178–D1186, 2012.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HA, C. M.; ESCAMILLA-TREVINO, L.; SERRANI YARCE, J. C.; KIM, H.; RALPH, J.; CHEN, F.; DIXON, R. A. An essential role of caffeoyl shikimate esterase in monolignol biosynthesis in *Medicago truncatula*. **Plant J.**, v. 86, p. 363-375, 2016.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. INTECH Open Access Publisher, 2012, p. 169–205.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiol.**, v. 81, p. 802–806, 1986.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas referentes ao ano de 2015. Disponível em <http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em 28 de Outubro de 2016.

JOHNOVÁ, P.; SKALÁK, J.; SAIZ-FERNÁNDEZ, I.; BRZOBOHATÝ, B. Plant responses to ambient temperature fluctuations and water-limiting conditions: A proteome-wide perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1864(8), p. 916-931, 2016.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 27-30, 2000.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, p. D457-D462, 2016.

LETUNIC, I.; YAMADA, T.; KANEHISA, M.; BORK, P. iPath: interactive exploration of biochemical pathways and networks. **Trends in biochemical sciences**, v. 33(3), p. 101-103, 2008.

LIAO, J. L.; ZHOU, H. W.; ZHANG, H. Y.; ZHONG, P. A.; HUANG, Y. J. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress. **Journal of experimental botany**, v. 65(2), p. 655-671, 2014.

LIU, W.; YU, K.; HE, T.; LI, F.; ZHANG, D.; LIU, J. The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. **The Scientific World Journal**, 2013.

LIU, Y.; JIANG, Y.; LAN, J.; ZOU, Y.; GAO, J. Comparative transcriptomic analysis of the response to cold acclimation in *Eucalyptus dunnii*. **PLoS One**, v. 9, p. e113091, 2014.

MACFARLANE, C.; ADAMS, M. A.; HANSEN, L. D. Application of an enthalpy balance model of the relation between growth and respiration to temperature acclimation of *Eucalyptus globulus* seedlings, **Proc. Biol. Sci.**, v. 269, p. 1499–1507, 2002.

MARCHAL, C.; DELORME-HINOUX, V.; BARIAT, L.; SIALA, W.; BELIN, C.; SAEZ-VASQUEZ, J.; RIONDET, C.; REICHHELD, J-P. NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. **Mol. Plant.**, v. 7, p. 30–44, 2014.

MARTÍ, M. C.; OLMOS, E.; CALVETE, J. J.; DÍAZ, I.; BARRANCO-MEDINA, S.; WHELAN, J.; LÁZARO, J. J.; SEVILLA, F.; JIMÉNEZ, A. Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. **Plant Physiol.**, v. 150, p. 646–657, 2009.

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

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

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA, J.; DORNELAS, M. C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 360-376, 2010.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; MERWE, K.; SINGH, P.; JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T. J.; YE, C-Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M. M.; CLEMENTE, H. S.; SAIDI, N.; CASSAN-WANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C. A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A. R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSE, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; LHEIM, C.K.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.;

BARRY, K.; PAPPAS JR, JG. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMAPETTENATI, J.; SALSE, J. J.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.

OLD, W. M.; MEYER-ARENDT, K.; AVELINE-WOLF, L.; PIERCE, K. G.; MENDOZA, A.; SEVINSKY, J. R.; RESING, K. A.; AHN, N. G. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1487-1502, 2005.

OLSEN, J. V.; ONG, S. E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, p. 608-614, 2004.

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

PARK, O. K. Proteomics studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 133-138, 2004.

PAWLOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and gibberellic acids. **Proteomics**, v. 7, p. 2246-2257, 2007.

PERONI, L. A.; FERREIRA, R. R.; FIGUEIRA, A.; MACHADO, M. A.; STACH-MACHADO, D. R. Expression profile of oxidative and antioxidative stress enzymes based on ESTs approach of *citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30(3), p. 872-880, 2007.

PFALZ, J.; LIEBERS, M.; HIRTH, M.; GRÜBLER, B.; HOLTZEGEL, U.; SCHRÖTER, Y.; DIETZEL, L.; PFANNSCHMIDT, T. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. **Front. Plant Sci.**, v. 3, p. 1–9, 2012.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1513–1523, 2001.

POTTS, B. M. Genetic improvement of eucalypts. In: BURLEY, J.; EVANS, J.; YOUNGQUIST, J.A. (Eds.). **Encyclopedia of Forest Science**. Elsevier Science: Oxford, 2004, p. 1480–1490.

PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F. J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **Plant J.**, v. 57, p. 132–145, 2009.

ROCCO, M.; ARENA, S.; RENZONE, G.; SCIPPA, G. S.; LOMAGLIO, T.; VERRILLO, F.; SCALONI, A; MARRA, M. Proteomic analysis of temperature stress-responsive proteins in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. **Molecular BioSystems**, v. 9(6), p. 1257-1267, 2013.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SA-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 7-17, 2004.

SASAKI, K.; IMAI, R. Pleiotropic roles of cold shock domain proteins in plants. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 116, 2012.

SERRATO, A. J.; CEJUDO, F. J. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. **Planta**, v. 217, p. 392-399, 2003.

SERRATO, A. J.; CRESPO, J. L.; FLORENCIO, F. J.; CEJUDO, F. J. Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. **Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 361–371, 2001.

SHEORAN, I. S.; OLSON, D. J. H.; ROSS, A. R. S.; SAWHNEY, V. K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v. 5, p. 3752-3764, 2005.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 2856–2860, 2006.

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

STURN, A.; MLECNIK, B.; PIELER, R.; RAINER, J.; TRUSKALLER, T.; TRAJANOSKI, Z. Client-Server environment for high-performance gene expression data analysis. **Bioinformatics**, v. 19, p. 772-773, 2003.

STURN, A.; QUACKENBUSH, J.; TRAJANOSKI, Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. **Bioinformatics**, v. 18, p. 207-208, 2002.

TAN, X.; YAN, S.; TAN, R.; ZHANG, Z.; WANG, Z.; CHEN, J. Characterization and expression of a GDSL-like lipase gene from *Brassica napus* in *Nicotiana benthamiana*. **The protein journal**, v. 33(1), p. 18-23, 2014.

THE PLANT LIST, **Version 1.1** (2013). Disponível em <<http://www.theplantlist.org>> Acessado 1 de Janeiro de 2016.

VANHOLME, R.; CESARINO, I.; RATAJ, K.; XIAO, Y.; SUNDIN, L.; GOEMINNE, G.; KIM, H.; CROSS, J.; MORREEL, K.; ARAUJO, P.; WELSH, L.; HAUSTRAETE, J.; MCCLELLAN, C.; VANHOLME, B.; RALPH, J.; SIMPSON, G. G.; HALPIN, C.; BOERJAN, W. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Science**, v. 341, p. 1103-1106, 2013.

WANG, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; WOLLENWEBER, B.; JIANG, D. Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 185-192, 2014.

WONG, J. W. H.; SULLIVAN, M. J.; CAGNEY, G. Computational methods for the comparative quantification of proteins in label-free LCⁿ-MS experiments. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 156-165, 2007.

YAMADA, T.; LETUNIC, I.; OKUDA, S.; KANEHISA, M.; BORK, P. iPath 2.0: interactive pathway explorer. **Nucleic acids research**, v. 39(suppl 2), p. W412-W415, 2011.

ZHANG, B.; VERBERKMOES, N. C.; LANGSTON, M. A.; UBERBACHER, E.; HETTICH, R. L.; SAMATOVA, N. F. Detecting differential and correlate protein expression in label-free shotgun proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 2909-2918, 2006.

APÊNDICE

Tabela 1A – Proteínas caulinares diferencialmente reguladas nas espécies de *Eucalyptus* expostas a baixa temperatura (LT), e alta temperatura (HT), contra a média temperatura (MT), conforme descrito no Material e Métodos. Foram consideradas apenas proteínas com “fold change” acima de 1,5 e diferença significativa de 5%, de acordo com o teste T-Fold, disponível na plataforma Pattern Lab for Proteomics (CARVALHO et al., 2016). Valores positivos indicam indução e valores negativos indicam supressão.

Identificação ^a	Descrição funcional ^b	<i>E. globulus</i> ^c		<i>E. grandis</i> ^c	
		LT	HT	LT	HT
Eucgr.A00172.1	Pathogenesis-related protein Bet v I family (Bet_v_1)	-	2,2129	-	-
Eucgr.A00264.1*	Photosystem II protein (PSII)	2,4870	2,2763	3,4128	4,5593
Eucgr.A00474.2	30S ribosomal protein S9, chloroplastic	-	-	3,1722	-
Eucgr.A00868.1	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate	-	1,7850	-	-
Eucgr.A00868.2	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate	-	1,9491	-	-
Eucgr.A01018.1	Non-specific serine/threonine protein kinase / Threonine-specific protein kinase	-	-	-2,3807	-
Eucgr.A01047.1	Chlorophyll A/B binding protein	-	1,5847	-	-
Eucgr.A01135.1	Isocitrate dehydrogenase (NAD(+)) / Nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase	2,4305	-	-	-
Eucgr.A01238.1	Inorganic pyrophosphatase-like protein	-	-	-2,2179	-
Eucgr.A01802.1	Alpha/beta hydrolase fold-containing protein	-	-	2,3604	-
Eucgr.A01929.2	60S ribosomal protein l11-related	-	1,9727	-	-
Eucgr.A02039.1	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic-related	-	1,5909	-	-

Eucgr.A02126.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	-	-	2,3437	-
Eucgr.A02126.2	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	1,7614	-	-	-
Eucgr.A02291.1*	Protein early responsive to dehydration 15	-	-	2,6473	-
Eucgr.A02439.1*	Outer envelope pore protein 16-3, chloroplastic/mitochondrial	2,8149	-	-	-
Eucgr.A02641.1*	40S ribosomal protein S14	-4,0768	-	-	-
Eucgr.A02717.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 KD-B subunit	-	-	2,2102	-
Eucgr.A02734.2	Heat shock protein 90.1	-	1,8100	-	-
Eucgr.A02874.1	ATP-dependent clp protease	2,6426	-	-	-
Eucgr.A02910.1	Alcohol dehydrogenase related	-	4,1472	-	2,2864
Eucgr.A02974.1*	RNA recognition motif (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain) (RRM_6)	-	2,7104	-	-
Eucgr.B00034.1	14-3-3 protein	-	1,7043	-	-
Eucgr.B00131.1	Nucleotide kinase	-2,2279	-	-	-
Eucgr.B00144.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	1,9717	1,8549	-2,2203	-
Eucgr.B00357.1	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, mitochondrial	-	1,7975	-	-
Eucgr.B00425.1*	Protein of unknown function (DUF1118)	-	-1,8621	-	-
Eucgr.B00582.1*	Flavonoid 3'-monooxygenase	7,3344	-	4,3105	-
Eucgr.B00589.1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	3,2548	-	-	-
Eucgr.B01003.1*	Aldo/keto reductase family	-2,2997	-	-	-
Eucgr.B01088.1	Photosystem I reaction center subunit II-1, chloroplastic-related	-	-	-	2,4930

Eucgr.B01112.1	Peroxiredoxin-2F, mitochondrial	-	-	-	3,2302
Eucgr.B01498.1	3-beta-(or 20-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase	-	-	-	2,4734
Eucgr.B01600.2	60S ribosomal protein L22	-	-	-	1,9452
Eucgr.B01724.1	Beta-pyrazolylalanine synthase / Pyrazolylalaninase	-	2,0347	-	2,0234
Eucgr.B01908.1	60S ribosomal protein L18	-	2,3262	-	-
Eucgr.B01908.2	60S ribosomal protein L18	-	2,2126	-	-
Eucgr.B02118.2	GDP-mannose 3,5-epimerase	-	-	-	1,5130
Eucgr.B02162.1*	Photosystem I reaction centre subunit IV / PsaE	-3,4091	-	-	-
Eucgr.B02294.1	Universal stress protein family (Usp)	1,9899	-	-	-
Eucgr.B02312.1*	Protein TOC75-3, chloroplastic-related	-	-	3,9013	-
Eucgr.B02462.1	Tetraspanin-16-related	-	-	2,0929	-
Eucgr.B02473.1	Translation factor	1,8559	-	-	-
Eucgr.B02532.2	Chaperonin 60 subunit alpha 1, chloroplastic	-	1,8283	-	2,2804
Eucgr.B02546.1	MLP-like protein 423-related	-	-	-	2,1021
Eucgr.B02711.1*	3-beta-(or 20-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase	-	3,1863	-	-
Eucgr.B02864.1*	Fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic-related	2,2785	-	-	-2,5598
Eucgr.B03031.1	Serine/threonine-protein phosphatase pp2a 65 kda regulatory subunit	1,9200	-	-	-
Eucgr.B03309.1	Ribosomal protein S27a (Ribosomal_S27)	-	-	2,2760	-
Eucgr.B03379.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit bacterial and organellar	-	-1,7019	-	-

Eucgr.B03442.1	60S ribosomal protein L34	-	2,4482	-	-
Eucgr.B03593.2	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic-related	-	2,1357	-	-
Eucgr.B03771.2	Proteasome subunit alpha/beta	-	1,9167	-	-
Eucgr.B03802.1	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein-related	2,0156	-	-	-
Eucgr.B04032.3	Proteasome ATPase / RP triple-A protein	-	-1,6683	-	-
Eucgr.C00154.1	NADPH--hemoprotein reductase / TPNH-cytochrome c reductase	-	-	3,1401	-
Eucgr.C00345.1	Leucyl aminopeptidase / Peptidase S	-	1,7691	-	1,7234
Eucgr.C00615.1	Profilin-1-related	-	-	-	2,5292
Eucgr.C00706.1*	Nitrilase/cyanide hydratase	-3,2093	-	-	-
Eucgr.C00769.1	Sucrose synthase/Uridine diphosphoglucose-fructose glucosyltransferase	-	-	2,4874	-
Eucgr.C00902.1	Cytidine deaminase / Cytosine nucleoside deaminase	-	-	2,7462	-
Eucgr.C00990.1	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	-	-	2,2856	2,3035
Eucgr.C01003.2	Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP(+))	2,1227	-	-	-
Eucgr.C01261.1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2,6151	-	-	-
Eucgr.C01749.2*	DEAD/DEAH box RNA helicase 15	4,5523	-	-	-
Eucgr.C01792.2	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 KD protein	2,1938	-	-	-
Eucgr.C02133.1	Proteasome subunit beta type	-3,5081	-	-	-
Eucgr.C02594.1*	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-2,4810	-	-
Eucgr.C02594.2	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-2,0073	-	-
Eucgr.C02720.1	Aspartate aminotransferase, chloroplastic	-	2,0848	-	-

Eucgr.C02784.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	2,2477	-	-	-
Eucgr.C03525.1	Ribosomal protein S15, bacterial and organellar	-	-	-	1,9814
Eucgr.C03557.1	Stress responsive A/B Barrel Domain (Dabb)	-	1,8606	-	-
Eucgr.C03812.1*	Peroxiredoxin	-	-	-	-1,7353
Eucgr.C04037.1*	Membrane-associated progesterone receptor component	-2,1327	-	-	-
Eucgr.D00261.1*	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)	-	-	2,9102	-
Eucgr.D00281.1	Adenosylhomocysteinase / SAHase	-	-	2,4208	-
Eucgr.D00295.1	Calcyclin-binding protein CacyBP	-	-	-	5,5634
Eucgr.D00321.1	Chlorophyll A-B binding protein 1, chloroplastic-related	-	1,7608	-	-
Eucgr.D00322.1	Chlorophyll A-B binding protein 1, chloroplastic-related	2,2761	2,1618	-	-
Eucgr.D00854.1*	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic-related	-	-1,7385	-	1,8620
Eucgr.D01135.1	Glutathione S-transferase, superfamily, GST domain containing	-	-	2,4276	-
Eucgr.D01335.1	Glyoxalase I homolog	-2,1516	-	-	-
Eucgr.D01612.1	Tubulin beta-4 chain-related	-	-1,5244	-	1,7306
Eucgr.D01807.1	CS domain (CS) // TPR repeat (TPR_11)	-	-	-	2,0366
Eucgr.D01820.1*	40S ribosomal protein S10	-	-	-	-2,1953
Eucgr.D01888.1	Osmotin-like protein OSM34	-	-	-	1,9544
Eucgr.D02018.1	F23N19.14-related	-	-	2,8099	-
Eucgr.D02466.1	Transketolase/Glycoaldehyde transferase	2,1710	-	-	-
Eucgr.D02467.1	Transketolase/Glycoaldehyde transferase // Transaldolase/Glycerone transferase	-	-	2,0105	-

Eucgr.D02588.1	60S ribosomal protein L13	-	1,9278	-	-
Eucgr.E00279.1	Abscisic acid receptor PYL1-related	-	-	2,1967	-
Eucgr.E00336.1	NAD dependent epimerase/dehydratase	2,2136	-	-	-
Eucgr.E00579.1	Glutathione peroxidase	-	-1,8227	-	2,2479
Eucgr.E00653.1	Heat shock protein 90.1	-	-	2,3907	-
Eucgr.E01024.1	Heat shock protein 70 KDA	-	-1,5215	-	-
Eucgr.E01119.1	Alcohol dehydrogenase related	-	-	-2,9737	-
Eucgr.E01748.1	Tubulin-specific chaperone A	-	2,6487	-	-
Eucgr.E01779.1*	EF-hand calcium-binding domain containing protein	-2,1959	-2,0866	-	-
Eucgr.E02362.1	Zeta-coat protein	3,2160	-	-	-
Eucgr.E02381.1	Chlorophyll A-B binding protein 1, chloroplastic-related	2,2367	2,3383	-	-
Eucgr.E02747.1	14-3-3 protein	-	2,0219	-	-
Eucgr.F00366.2	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, 2	-	-2,7716	-	-
Eucgr.F00368.1	40S ribosomal protein S6	-	-2,1804	-	-
Eucgr.F00411.1	Aspartyl protease-like protein	-	-	-	2,0828
Eucgr.F00627.1	40S ribosomal protein S8	-	1,7832	-	-
Eucgr.F01226.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 36	2,6170	-	-	-
Eucgr.F01413.2	S-2-hydroxy-acid oxidase-related	-	1,9876	-	1,6050
Eucgr.F01462.1	Translation factor	2,3630	-	1,9952	-
Eucgr.F01584.2	NAD dependent epimerase/dehydratase	-	1,8085	-	-
Eucgr.F01586.1	ARS5,ATPSM30,PAF1 proteasome alpha subunit F1	-	-	2,0018	-

Eucgr.F01691.1	Thioredoxin superfamily protein	2,5543	-	-	-
Eucgr.F01793.1	GAPBglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit	-	1,5468	-	-
Eucgr.F02130.2	14-3-3lambda,AFT1,GRF6G-box regulating factor 6	-	-	-	2,0341
Eucgr.F02183.1	TUA6Tubulin/FtsZ family protein	-	-	-	1,8776
Eucgr.F02479.1	AOC4allene oxide cyclase 4	-	1,6984	-	-
Eucgr.F02537.1	Alba DNA/RNA-binding protein	2,1676	-	-	-
Eucgr.F02710.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	1,9761	-	-	-
Eucgr.F02744.2*	Alcohol dehydrogenase related	2,9256	3,4382	-	-
Eucgr.F02818.1	ATSOS4,SOS4 pfkB-like carbohydrate kinase family protein	-	-	3,2383	-
Eucgr.F02901.2*	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) / oxalosuccinate carboxylase	-	-	-	-1,8892
Eucgr.F02905.3	AtUGP2,UGP2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2	-	1,8622	-	1,9341
Eucgr.F03036.1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein	-2,9204	-	-	-
Eucgr.F03085.1	Insulinase (Peptidase family M16) protein	2,8331	-	-	-
Eucgr.F03162.1	ATTIM23-1,TIM23-1 translocase of inner mitochondrial membrane 23	-	-	2,5443	-
Eucgr.F03288.1	AtRABA1f,RABA1f RAB GTPase homolog A1F	-	-	-	1,9375
Eucgr.F03722.1	EMB2719,HAP15 PAM domain (PCI/PINT associated module) protein	-	1,8036	2,5735	-
Eucgr.F03856.2	ATUSP,USP UDP-sugar pyrophosphorylase	-	-	-	2,0975
Eucgr.F03862.1*	Phospholipase D	6,1935	-	-	-
Eucgr.F03933.1	ATIMD2,IMD2 isopropylmalate dehydrogenase 2	-	2,4569	-	-

Eucgr.F04030.1	VHA-A vacuolar ATP synthase subunit A	-	-1,7957	-	-
Eucgr.F04099.1	LHCB5 light harvesting complex of photosystem II 5	-	1,7723	-	-
Eucgr.F04120.2*	Proteasome subunit alpha type-2	-	2,0496	-	-
Eucgr.F04345.2	ATPDI5,ATPDIL1-1,PDIL5,PDIL1-1 PDI-like 1-1	-	-	2,3044	-
Eucgr.F04417.1	ATGER3,GER3,GLP3,GLP3A,GLP3Bgermin 3	-	-	-	3,6882
Eucgr.F04448.1*	Ubiquitin family	-	-	2,6858	-
Eucgr.G00235.1	cpHsc70-2,CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2,HSC70-7 chloroplast heat shock protein 70-2	-	-	-	2,2833
Eucgr.G00444.1	coatomer gamma-2 subunit, putative / gamma-2 coat protein, putative / gamma-2 COP, putative	5,7252	-	-	-
Eucgr.G01193.1	xylose isomerase family protein	-	-	-	2,4523
Eucgr.G01359.1	EDA9D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2,7864	-	-	-
Eucgr.G01375.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	2,9797	-	2,3411	-
Eucgr.G01561.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	-2,2862	-1,6381	-	-
Eucgr.G01690.1*	Eukaryotic aspartyl protease family protein	-	-2,6537	-	-
Eucgr.G01726.5	FBA2fructose-bisphosphate aldolase 2	-	1,7921	-	1,8512
Eucgr.G01788.2	ATPase, V1 complex, subunit B protein	-	-1,8548	-	-
Eucgr.G01975.2	glycyl-tRNA synthetase / glycine--tRNA ligase	-	-	-	2,1325
Eucgr.G01978.1	Aldolase-type TIM barrel family protein	2,8966	2,1977	-	-
Eucgr.G02110.1	Caleosin-related family protein	3,1980	-	-	-
Eucgr.G02807.1	GTP binding Elongation factor Tu family protein	1,9255	1,7827	-	-

Eucgr.G02848.2	ATPAL2,PAL2 phenylalanine ammonia-lyase 2	2,6997	-	-	-
Eucgr.G03035.1	AE3,ATHMOV34,RPN8ARP non-ATPase subunit 8A	2,0260	-	-	-
Eucgr.G03042.1	Ribosomal protein L10 family protein	-	-	-1,9640	-
Eucgr.G03060.1	LHCB4.3 light harvesting complex photosystem II	-	1,6943	-	2,9568
Eucgr.G03075.1*	Clathrin heavy chain	6,4388	-	5,8516	-
Eucgr.G03088.2	ATFER4,FER4 ferritin 4	-	2,5268	-	-
Eucgr.G03138.2*	Chalcone-flavanone isomerase	-	-2,6999	-	-
Eucgr.G03242.1	uridine 5\'-monophosphate synthase / UMP synthase (PYRE-F) (UMPS)	-	-	2,7594	-
Eucgr.G03331.1*	Protein of unknown function (DUF3411)	-	-	4,7011	8,2911
Eucgr.G03401.1	Ribosomal protein L6 family protein	-	-	-	2,6894
Eucgr.H00026.1	GR-RBP4,GRP4glycine-rich RNA-binding protein 4	2,9729	-	-	-
Eucgr.H00132.1*	Monodehydroascorbate reductase, cytoplasmic isoform 1-related	3,7247	2,8174	-	-
Eucgr.H00144.2	FIB4Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	-	-	-	2,8027
Eucgr.H00750.1	Ribosomal protein S8e family protein	-	2,3518	-	-
Eucgr.H01051.1	ASAR1,ATSAR2,ATSARA1C,SAR2secretion-associated RAS super family 2	-	-	-	-2,5964
Eucgr.H01094.1	ATSUS3,SUS3 sucrose synthase 3	2,1257	-	-	-
Eucgr.H01151.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	2,1298	-	-	-
Eucgr.H01629.1	ATF2,TRXF2thioredoxin F2	-	-	2,3252	-
Eucgr.H02605.2	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	-	2,2718	-	-

Eucgr.H02643.1	IAGLU indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase	-2,1575	-	-	-
Eucgr.H02678.2	ATSAHH1,EMB1395,HOG1,MEE58,SAHH1S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	-	-	2,6577	-
Eucgr.H02737.1	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein	-	-	-	-1,8689
Eucgr.H02989.1	CYN cyanase	-	-	2,6360	-
Eucgr.H03983.1*	Pathogenesis-related protein Bet v I family	-3,5325	-2,1378	-	-
Eucgr.H04013.3	MLP423MLP-like protein 423	-	-2,3421	-	-
Eucgr.H04045.1	ACLB-2ATP citrate lyase subunit B 2	3,1325	-	-	-
Eucgr.H04065.3	GAL1,GALK Mevalonate/galactokinase family protein	-	2,4390	-	-
Eucgr.H04086.1	mtLPD1mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1	-	-	-	1,5613
Eucgr.H04426.4	CSD1copper/zinc superoxide dismutase 1	-	2,0192	-	6,2910
Eucgr.H04427.1	EMB3004,MEE32 dehydroquinase dehydratase, putative / shikimate dehydrogenase, putative	3,4301	-	-	-
Eucgr.H04433.1	G-H2AX,GAMMA-H2AX,H2AXB,HTA3gamma histone variant H2AX	-	-2,5300	-	-
Eucgr.H04456.1	TLP18.3 thylakoid lumen 18.3 kDa protein	-	2,9198	-	-
Eucgr.H04606.1	ATCYP20-2,CYP20-2 cyclophilin 20-2	-	-	2,8167	-
Eucgr.H04640.1	Rubber elongation factor protein (REF)	-	-	-	3,2001
Eucgr.H04647.1	Ribosomal protein L22p/L17e family protein	3,6649	-	-	-
Eucgr.H04673.1	GAPC-2,GAPC2glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	-	-	-2,6000	-
Eucgr.H04787.2*	Annexin	-	2,6962	-	-

Eucgr.H04787.5*	Annexin	-	2,5304	-	-
Eucgr.I00055.1	ACLB-1ATP-citrate lyase B-1	2,1713	-	2,5120	-
Eucgr.I00240.1	ACT7actin 7	-	-	-	1,6957
Eucgr.I00424.1*	Expressed protein-related	-1,8703	-	-	-
Eucgr.I00709.1	Translation protein SH3-like family protein	-	-	-	3,4649
Eucgr.I01025.1*	Oxygen-evolving enhancer protein 1-1, chloroplastic-related	-2,9260	-	-	1,9423
Eucgr.I01263.1*	Coatomer subunit gamma	2,8115	-	-	4,7918
Eucgr.I01332.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	-	2,0429	-	-
Eucgr.I01395.1*	Cold shock domain containing proteins	3,9478	-	-	-
Eucgr.I01418.1	ATFP6,FP6,HIPP26farnesylated protein 6	-	1,7608	-	-
Eucgr.I01495.1*	Basic endochitinase B	-	1,5464	-3,4960	-
Eucgr.I01626.2	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	-	2,4199	-	-
Eucgr.I01647.1	TOM20-3 translocase of outer membrane 20 kDa subunit 3	-	-	2,2981	-
Eucgr.I01709.1		2,3726	-	2,7492	-
Eucgr.I01714.1		2,2633	-	2,5164	-
Eucgr.I01715.1		2,7194	-	-	2,8992
Eucgr.I01779.1*	ADP-ribosylation factor A1F	-	-	-	-2,5267
Eucgr.I01911.2*	ATPase 4, plasma membrane-type	-	-	2,8297	-
Eucgr.I01938.1*	30S 40S Ribosomal protein	-	-	-	-3,1968
Eucgr.I01982.1	APG6,CLPB-P,CLPB3 casein lytic proteinase B3	-	-	3,2714	-
Eucgr.I01987.1	ATP5delta subunit of Mt ATP synthase	-	1,9680	-	-

Eucgr.I02171.1*	ATPase 1, plasma membrane-type-related	3,0143	-	2,4628	-
Eucgr.I02334.1	PAD2proteasome alpha subunit D2	2,2506	-	-	-
Eucgr.I02340.2	ATLFNR1,FNR1ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	-	2,0998	-	-
Eucgr.I02340.4	ATLFNR1,FNR1ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	-	-	-	1,8934
Eucgr.I02418.1	AtPPa1,PPa1 pyrophosphorylase 1	-	-	-2,0362	-
Eucgr.I02452.1	SDH1-1succinate dehydrogenase 1-1	-	-	-	3,8934
Eucgr.I02663.1*	Ubiquinol oxidase 2, mitochondrial	-	-	3,2438	3,4284
Eucgr.I02726.1	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	-	2,2001	-	-
Eucgr.J00008.1*	Triose-phosphate isomerase / Triosephosphate mutase	-	-	-	-2,6026
Eucgr.J00193.3	Clathrin, heavy chain	4,7747	-	-	-
Eucgr.J00327.4*	Pyruvate kinase-related	5,6815	-	-	-
Eucgr.J00330.1		-	-	7,1382	-
Eucgr.J00455.1	cytochrome-c oxidases;electron carriers	2,9814	-	-	-
Eucgr.J00584.1	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	-	-	3,6114	-
Eucgr.J00682.1	PYD2pyrimidine 2	-	2,6390	-	-
Eucgr.J00907.1*	Histidine ammonia-lyase	6,6217	-	-	-
Eucgr.J00930.1*	Aquaporin PIP2-4-related	4,7117	4,8627	-	-
Eucgr.J01000.1	ATATX1,ATX1 homolog of anti-oxidant 1	-	-	4,4100	-
Eucgr.J01079.1*	Histidine ammonia-lyase	3,5522	-	2,7404	-
Eucgr.J01178.1	NQR NADPH:quinone oxidoreductase	-	-	-	2,4231
Eucgr.J01234.1	RCA rubisco activase	-	-	-2,5166	1,9365

Eucgr.J01372.2	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	-	-	2,2431	-
Eucgr.J01477.1	GF14 NU,GRF7general regulatory factor 7	-2,0343	-	-	1,9928
Eucgr.J01502.1	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-1,7245	-	-
Eucgr.J01502.2	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	-	-	-	2,1626
Eucgr.J01599.3	HMGAhhigh mobility group A	-	-	-	2,3619
Eucgr.J01697.1	U2A\ U2 small nuclear ribonucleoprotein A	-	-2,0841	-	-
Eucgr.J01844.1	ATC4H,C4H,CYP73A5,REF3cinnamate-4-hydroxylase	3,3613	-	-	-
Eucgr.J01957.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	-	1,9862	-2,1339	-
Eucgr.J02068.2	ARA-3,ARA3,ATRAB8A,ATRABE1C,RAB8A RAB GTPase homolog 8A	-	-	2,4725	2,1476
Eucgr.J02083.1	RmlC-like cupins superfamily protein	-	-	-	2,4431
Eucgr.J02207.3	FDH formate dehydrogenase	-	-1,5715	-	-
Eucgr.J02249.4	ATEIF3B-1,ATTIF3B1,EIF3B,EIF3B-1,TIF3B1 translation initiation factor 3B1	-	-	3,6496	4,8344
Eucgr.J02430.1*	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase	-	-5,5785	-	-
Eucgr.J02495.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	-	-	2,2752	-
Eucgr.J02738.1	ATP synthase subunit beta	-	-	-	2,2580
Eucgr.J02842.1	EIF4A1,RH4,TIF4A1 eukaryotic translation initiation factor 4A1	-	1,6364	-	-
Eucgr.J02987.1*	Heat shock protein 70KDa	3,7506	3,1303	-	-
Eucgr.J02991.1*	Heat shock protein 70KDa	3,0763	-	-	-
Eucgr.J03061.1	Embryo-specific protein 3, (ATS3)	-	-	2,5474	-

Eucgr.K00070.1	GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein	-	1,6490	-	-
Eucgr.K00087.1*	4-coumarate--CoA ligase 3	-	-	4,1719	-
Eucgr.K00099.1	ENH1rubredoxin family protein	-	-	2,0450	-
Eucgr.K00264.1	TUB8tubulin beta 8	-	-1,5027	-	1,8173
Eucgr.K00288.1	ATFIB2,FIB2 fibrillarlin 2	-	1,9848	-	-
Eucgr.K00732.1	ATPDI10,ATPDIL2-2,PDIL10,PDIL2-2 PDI-like 2-2	-	1,8025	-	1,9456
Eucgr.K00785.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-	-2,3183	-	-
Eucgr.K00785.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-	-	1,9637	3,2326
Eucgr.K00795.1	Zinc-binding dehydrogenase family protein	-	1,7174	-	-
Eucgr.K00951.1	ATOMT1,OMT1 O-methyltransferase 1	-2,3744	-	-	5,3567
Eucgr.K01045.1	AAC3,ATAAC3 ADP/ATP carrier 3	-	1,8137	-	-
Eucgr.K01053.1	ATRPN1A,RPN1A 26S proteasome regulatory subunit S2 1A	2,5948	-	-	-
Eucgr.K01105.1	ketol-acid reductoisomerase	-	1,9601	-	-
Eucgr.K01232.1*	Glutathione S-transferase	-2,0915	-	-3,1784	-
Eucgr.K01256.1*	Cell division control protein 48 homolog D	1,6687	-3,9637	-	-
Eucgr.K01258.1	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	-	-2,2732	-	-
Eucgr.K01341.1	GABA-T,HER1,POP2Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	-	2,0241	-	-
Eucgr.K01508.1	ATCIMS,ATMETS,ATMS1 Cobalamin-independent synthase family protein	1,8357	-	2,5727	-
Eucgr.K02019.1	ATSFGH,SFGH S-formylglutathione hydrolase	-2,6589	-	-	-

Eucgr.K02027.1*	Aspartate--tRNA ligase / Aspartyl-tRNA synthetase	8,6322	-	-	-
Eucgr.K02066.1	Family of unknown function (DUF662)	-	2,1804	-	-
Eucgr.K02074.1	Pyruvate kinase family protein	2,2659	-	-	-
Eucgr.K02074.2	Pyruvate kinase family protein	-	2,3489	-	-
Eucgr.K02185.1	AtTudor1,TSN1,Tudor1TUDOR-SN protein 1	3,0010	-	3,1180	-
Eucgr.K02244.1*	Chaperonin ATPase / Chaperonin	5,9428	3,5349	-	-
Eucgr.K02283.2	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1glutamine synthase clone R1	-	-	-2,3004	-
Eucgr.K02326.1*	Trypsin and protease inhibitor (Kunitz_legume)	-	4,5763	-	-
Eucgr.K02450.4	ATHIR1,HIR1 SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family	-	3,8865	-	-
Eucgr.K02508.1*	40S ribosomal protein S19	-	-	-	-2,8843
Eucgr.K02521.1	ATHSP101,HOT1,HSP101heat shock protein 101	3,2770	1,8202	-	1,8499
Eucgr.K02606.2	Thioredoxin superfamily protein	-	1,9027	-	-
Eucgr.K02738.1	arginosuccinate synthase family	-	-	-	2,8485
Eucgr.K02753.2	ATNDPK2,NDPK IA,NDPK IA IA,NDPK1A,NDPK2 nucleoside diphosphate kinase 2	-	2,2750	-	-
Eucgr.K02786.2	ATRAB8D,ATRAE1B,RAB1b RAB GTPase homolog E1B	-	2,8959	-	-
Eucgr.K02962.1	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein	-	-	-	-2,9877
Eucgr.K02983.1	LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II	-	1,8276	-	2,9052
Eucgr.K03211.1	Ribosomal protein S12/S23 family protein	2,2288	-	-	-
Eucgr.K03244.1*	Aquaporin PIP2-4-related	5,4351	-	-	-

Eucgr.K03244.2	PIP2;4,PIP2Fplasma membrane intrinsic protein 2;4	-	-	4,4674	-
Eucgr.K03379.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	3,0737	2,1167	-	-
Eucgr.K03471.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	1,8369	2,7067	-	-
Eucgr.K03589.2*	GDSSL-like Lipase/Acylhydrolase	-2,8299	-	-	-
Eucgr.K03601.4*	Acetyl-CoA C-acyltransferase / Beta-ketothiolase	-	-1,7452	-	-
Eucgr.L00937.1*	Chitinase-related	-2,7345	-	-	-
Eucgr.L01763.1*	Ribose phosphate isomerase	-	3,1341	-	2,2740
Eucgr.L01765.1*	Malic enzyme-related	2,5597	-	-	-
Eucgr.L01943.1	ATCXXS1,CXXS1 C-terminal cysteine residue is changed to a serine 1	-	-	-	2,5164
Eucgr.L02773.1	Glycine cleavage T-protein family	-	-	-2,1480	-
Eucgr.L03005.1*	Histone H2B	-	-	-	-2,8369

a: Identificador do transcrito e isoforma protéica

b: Descrição funcional da predição por ortólogo em *Arabidopsis thaliana*

c: Variação de abundância de proteínas em termos de “fold change”

*: Proteínas diferencialmente reguladas de acordo com a abordagem do “spectral index”

Tabela 2A – Proteínas antioxidantes identificadas em caules de plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus* cultivadas em LT (baixa temperatura), MT (média temperatura) e HT (alta temperatura), conforme descrito no material e métodos. As localizações subcelulares foram preditas pelos programas Predotar, Wolf Psort, TargetP, PPDB, SUBAcon, Cell ploc e Phobius. As descrições das proteínas estão abreviadas de acordo com as seguintes siglas: APX- ascorbato peroxidase; GLX- glioxalase; GPX- glutathiona peroxidase; GR- glutathiona redutase; GRX- glutarredoxina; PRX- peroxirredoxina; SOD- superóxido dismutase; TPX- tioredoxina peroxidase; and TRX- tioredoxina.

Compartimento subcelular ^a	<i>Eucalyptus globulus</i> ^b			<i>Eucalyptus grandis</i> ^b		
	LT	MT	HT	LT	MT	HT
Cloroplasto						
APX (Eucgr.E00760.1)	0	0	3,2128	0	0	0
APX (Eucgr.F00373.1)	3,4974	3,5194	3,6200	3,3254	3,6916	3,2044
APX (Eucgr.F00373.3)	3,4936	3,4886	3,5360	3,3191	3,6767	3,2016
APX (Eucgr.F04344.1)	3,5025	3,5802	3,5696	3,3692	3,4824	3,3514
APX (Eucgr.F04344.2)	3,4895	3,5096	3,4091	3,3286	3,4042	3,3197
APX (Eucgr.I01408.1)	3,4039	3,4870	3,2274	3,2458	3,4084	3,0666
GLX (Eucgr.C03791.1)	0	0	3,3394	0	3,3443	0
GLX (Eucgr.C03791.2)	0	0	3,3359	0	3,3429	0
GPX (Eucgr.C02602.1)	3,2490	0	0	0	0	0
GPX (Eucgr.C02602.2)	3,2410	0	0	0	0	0
GPX (Eucgr.K03389.1)	3,2798	3,2664	3,1802	0	3,4366	0
GR (Eucgr.K03307.1)	0	0	0	0	3,3620	0
GRX (Eucgr.H00830.1)	0	3,3460	0	0	0	0
GRX (Eucgr.I01760.1)	3,1438	2,8387	2,7654	3,1787	3,0948	2,8750
GRX (Eucgr.I01764.1)	3,1438	3,0039	3,0642	3,1787	3,1956	3,0925
SOD (Eucgr.A02107.1)	0	3,3902	0	0	0	0
SOD (Eucgr.B03930.1)	0	0	0	3,1982	0	3,1539
SOD (Eucgr.B03930.2)	2,7697	2,6871	2,6066	2,6760	2,9454	3,1538

SOD (Eucgr.B03930.3)	2,7679	2,6852	2,6046	2,6741	2,9436	3,1537
SOD (Eucgr.B03930.4)	2,7569	2,6733	2,5928	2,6623	2,9176	3,1533
SOD (Eucgr.B03930.5)	2,7569	2,6733	2,5928	2,6623	2,9329	3,1533
SOD (Eucgr.B03930.6)	2,7043	2,6987	2,8178	2,6377	2,9180	3,1527
SOD (Eucgr.K00110.1)	0	0	0	3,1996	3,6270	0
SOD (Eucgr.K00110.2)	0	0	0	3,1903	3,4929	0
SOD (Eucgr.K00110.3)	0	0	0	3,1897	3,4916	0
SOD (Eucgr.K00110.4)	0	0	0	3,1891	3,4902	0
TPX (Eucgr.B00283.1)	0	0	0	0	3,3284	0
TPX (Eucgr.B02223.1)	3,2964	3,3391	0	0	0	0
TPX (Eucgr.B03744.1)	3,2868	3,3261	3,2194	3,2295	3,3040	3,1352
TPX (Eucgr.C00663.1)	0	0	0	3,2072	3,4131	0
TRX (Eucgr.D00629.1)	3,5452	4,0007	3,4800	3,3948	3,5612	3,4204
TRX (Eucgr.F01691.1)	3,0213	3,4320	3,2027	3,1901	3,4812	3,1656
TRX (Eucgr.F01854.1)	0	0	3,1782	0	0	0
TRX (Eucgr.F02729.1)	3,3743	0	3,3582	0	3,3524	0
TRX (Eucgr.F02754.1)	3,0955	3,3015	3,2318	3,1049	3,3918	0
TRX (Eucgr.F02962.1)	0	3,3428	0	0	0	0
TRX (Eucgr.F02962.2)	0	3,3398	0	0	0	0
TRX (Eucgr.F03319.1)	3,2687	3,3866	3,2848	0	0	3,1913
TRX (Eucgr.G02623.1)	3,2836	0	3,4026	0	0	0
TRX (Eucgr.G03402.1)	3,3003	3,3994	3,2961	3,1941	3,3794	0
TRX (Eucgr.H01629.1)	3,0532	3,2849	3,2557	3,1037	3,3621	0
TRX (Eucgr.H02332.1)	0	0	0	3,2309	0	0
TRX (Eucgr.H02332.2)	0	0	0	3,2291	0	0
TRX (Eucgr.H02332.3)	0	0	0	3,2288	0	0
TRX (Eucgr.H02332.4)	0	0	0	3,2265	0	0
TRX (Eucgr.H02333.1)	0	0	0	3,2298	0	0
TRX (Eucgr.I01913.1)	3,3786	3,3172	3,2232	0	3,4725	0

TRX (Eucgr.I02062.1)	3,3710	3,3517	3,4251	3,2354	3,3895	3,1413
TRX (Eucgr.K01294.1)	0	0	0	3,0986	3,1741	3,0387
TRX (Eucgr.K02606.1)	3,0920	3,0754	3,0689	2,8569	2,8420	2,7839
TRX (Eucgr.K02606.2)	3,0905	3,0341	2,7600	2,8554	2,8405	2,5549
TRX (Eucgr.K03198.1)	3,3016	3,3435	3,2682	0	3,5323	0
TRX (Eucgr.K03198.2)	3,3004	3,3427	3,2674	0	3,5255	0

Mitochondria						
APX (Eucgr.B02456.1)	2,8969	2,9043	2,7369	2,6556	2,4810	2,5159
APX (Eucgr.B02456.4)	3,1233	3,1987	3,1227	3,1956	2,9447	2,7761
APX (Eucgr.E00760.1)	0	0	3,2128	0	0	0
GLX (Eucgr.A02020.2)	0	3,7081	3,2388	0	3,3394	0
GLX (Eucgr.L01848.1)	0	3,7049	3,2381	0	3,3389	0
GLX (Eucgr.L01848.2)	0	3,6982	3,2366	0	3,3378	0
GPX (Eucgr.E00579.1)	3,2373	3,3326	3,6183	3,2471	3,4224	3,0976
GPX (Eucgr.E00579.2)	3,2447	3,2507	3,3510	3,1843	3,3164	3,0136
GRX (Eucgr.D00987.1)	3,2986	3,6918	3,3031	3,2400	3,6776	3,2299
GRX (Eucgr.D00987.2)	3,2231	3,5583	3,2710	3,1970	3,5441	3,2086
GRX (Eucgr.D00992.1)	3,2986	3,6918	3,3031	3,2400	3,6776	3,2299
PRX (Eucgr.B01112.1)	3,1300	3,2076	3,0561	2,9680	3,2473	2,8258
SOD (Eucgr.G03132.1)	3,2912	3,3364	0	0	3,3117	3,1394
SOD (Eucgr.J00124.1)	0	0	0	0	3,5020	0
SOD (Eucgr.K00110.6)	0	0	0	3,1782	3,5463	0
TRX (Eucgr.A01555.1)	3,1856	3,1702	3,2180	2,9195	3,0549	3,0690
TRX (Eucgr.B02223.1)	3,2964	3,3391	0	0	0	0
TRX (Eucgr.B02223.3)	3,2866	3,3320	0	0	0	0
TRX (Eucgr.B03744.1)	3,2868	3,3261	3,2194	3,2295	3,3040	3,1352
TRX (Eucgr.I01913.1)	3,3786	3,3172	3,2232	0	3,4725	0
TRX (Eucgr.J02565.1)	0	3,4471	3,2628	0	3,4628	0
TRX (Eucgr.L00305.1)	0	0	3,3128	0	0	0

TRX (Eucgr.L00721.1)	3,2824	3,3222	3,2120	3,2254	3,2962	3,1309
Citoplasma						
APX (Eucgr.A01180.1)	0	0	3,3501	0	3,4752	3,1553
APX (Eucgr.B02456.3)	2,8899	2,8972	2,7299	2,6485	2,4740	2,5089
APX (Eucgr.I01408.1)	3,4039	3,4870	3,2274	3,2458	3,4084	3,0666
APX (Eucgr.I01408.2)	3,3541	0	0	0	0	0
APX (Eucgr.J00965.1)	2,9987	2,7012	2,6213	2,7825	2,6052	2,5995
APX (Eucgr.J00965.3)	2,9901	2,7748	2,6213	2,8301	2,9252	2,4738
FLX (Eucgr.L01448.1)	3,2828	3,1949	2,8804	3,1955	3,0443	2,9141
GLX (Eucgr.D01335.1)	3,3748	3,0533	2,9838	3,1082	2,9690	3,1123
GLX (Eucgr.D01335.2)	3,3610	3,0394	2,9699	3,0943	2,9552	3,0985
GLX (Eucgr.D01335.3)	3,2732	0	0	0	0	0
GLX (Eucgr.D01336.1)	0	3,2330	0	3,2301	0	3,1668
GLX (Eucgr.F00747.1)	0	3,3238	3,2658	0	0	0
GLX (Eucgr.H00726.1)	3,2503	3,3259	3,2386	2,9752	3,0584	3,0567
GLX (Eucgr.H03460.1)	0	3,2838	0	0	3,3098	0
GPX (Eucgr.D01856.1)	3,2434	3,4377	3,2030	3,2086	3,4137	3,1487
GPX (Eucgr.D01856.2)	0	3,3919	0	3,1946	3,3223	3,1430
GRX (Eucgr.I01764.1)	3,1438	3,0039	3,0642	3,1787	3,1956	3,0925
SOD (Eucgr.A02107.1)	0	3,3902	0	0	0	0
SOD (Eucgr.B01760.1)	3,2736	3,4197	3,3029	0	3,2187	0
SOD (Eucgr.H04426.1)	3,1262	2,8923	2,6853	3,0298	2,9368	2,3334
SOD (Eucgr.H04426.2)	3,0943	2,8463	2,6420	2,9837	2,8908	2,2889
SOD (Eucgr.H04426.4)	3,0840	2,8318	2,6098	2,9692	2,8378	2,1159
TRX (Eucgr.B02223.1)	3,2964	3,3391	0	0	0	0
PRX (Eucgr.C03812.1)	2,9068	3,0478	3,0944	2,8194	2,7890	3,0517
PRX (Eucgr.C03812.2)	2,8434	2,9015	2,8017	2,7615	2,8527	3,0399
TRX (Eucgr.G03402.1)	3,3003	3,3994	3,2961	3,1941	3,3794	0
TRX (Eucgr.L03049.1)	3,2382	3,2776	3,2239	0	0	3,0981

Retículo endoplasmático						
GPX (Eucgr.A00055.1)	3,2277	3,3333	0	3,1903	3,3037	0
GPX (Eucgr.A00257.2)	3,2725	3,3331	0	0	0	0
TRX (Eucgr.F03719.1)	0	3,3222	0	0	0	0
TRX (Eucgr.K03531.1)	3,3014	3,3040	3,3294	3,1737	3,3194	3,1639
TRX (Eucgr.K03531.2)	3,2304	3,2330	3,2770	3,1162	3,2484	3,1111
TRX (Eucgr.K03531.3)	3,2525	3,1730	0	3,1716	3,2722	3,1041
TRX (Eucgr.K03531.4)	0	3,2298	0	3,1689	3,2667	0
Núcleo						
GPX (Eucgr.D01856.2)	0	3,3919	0	3,1946	3,3223	3,1430
TRX (Eucgr.C00774.1)	3,1641	3,0317	3,0160	3,0643	3,1278	3,0774
TRX (Eucgr.H00536.1)	0	0	3,2693	3,2448	3,5421	3,1416

a: Sigla da proteína, de acordo com a descrição funcional por homologia com *Arabidopsis thaliana* (identificador do transcrito do Phytozome para *Eucalyptus grandis* v 1.1)

b: Abundância da proteína em $-\text{LOG}_{10}$ NSAF (PAOLETTI et al., 2006)