

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

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR FATORES
AMBIENTAIS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE EUCALYPTUS:
UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Amanda Cristina Baldassi

Bióloga

2022

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

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR FATORES
AMBIENTAIS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE EUCALYPTUS:
UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Amanda Cristina Baldassi

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 Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2022

B175a Baldassi, Amanda Cristina
Alterações metabólicas induzidas por fatores ambientais em
folhas de espécies de Eucalyptus: uma abordagem proteômica
/ Amanda Cristina Baldassi. -- Jaboticabal, 2022
104 p. : il., tabs., fotos

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

1. Proteômica. 2. Eucalyptus. 3. Mudanças climáticas. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR FATORES AMBIENTAIS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE *Eucalyptus*: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

AUTORA: AMANDA CRISTINA BALDASSI
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:

Pesquisador Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisadora Dra. ANGELA MEHTA DOS REIS (Participação Virtual)
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN-EMBRAPA) / Brasília/DF

Angela Mehta dos Reis

Digitalizado por Angela Mehta dos Reis
CNPJ 07.000.000/0001-90
Rua dos Trabalhadores, 100
Cidade de Brasília - DF
CEP: 70000-000

Prof. Dr. TERCILIO CALSA JUNIOR (Participação Virtual)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) / Recife/PE

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Professor Associado - Departamento de Genética
Coordenador - Lab. de Genética e Evolução de Plantas
Centro de Biotecnologia - Universidade Federal de Pernambuco

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

Hugo Pacheco de Freitas Fraga
Professor Adjunto UFPR
Mat: 205501

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO (Participação Virtual)
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 21 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amanda Cristina Baldassi – nascida em 11 de setembro de 1991 em Araraquara-SP, é bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade de Araraquara – UNIARA (2010 - 2013). Entre 2011 e 2012 foi estagiária do laboratório de pureza genética na empresa Syngenta Seeds, localizada em Matão. No período entre 2012 e 2015 desempenhou a função de Analista de Laboratório na mesma empresa, trabalhando no setor de Controle de Documentos e no Laboratório de Análise de Sementes. Em 2018 obteve o título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Proteômica Vegetal sob orientação do Dr. Tiago Santana Balbuena, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ingressou no doutorado em 2018 pela mesma instituição, também sob orientação do Dr. Tiago Santana Balbuena, como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). cursou um período de 4 meses de doutorado sanduíche na Universidade de Washington (Seattle) entre 2021 e 2022, como bolsista PDSE da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Tiago Santana Balbuena, pela oportunidade, confiança e apoio no decorrer de todos esses anos de trabalho.

Ao meu marido, Rubens, por todo incentivo, apoio, carinho, compreensão e amor dedicados a mim nesse período. A nossa filhinha, Wanda, que deixou nossa vida muito mais feliz.

A minha família, principalmente aos meus pais, por todo apoio, confiança e amor incondicionais. Também aos meus sogros, cunhados e ao meu afilhado Marcos por toda a alegria e leveza que trouxe aos meus dias.

Aos colegas do laboratório de proteômica vegetal, Naiara, Gabriel, Felipe, Letícia, Patrícia e Marília, por todos os ensinamentos e momentos compartilhados. Aos amigos e colegas que tiver o prazer de conhecer nesse período. Principalmente, Nestor, Samanta, Paula, Edicleide, Marina, Geovana e Ana Paula por todo o companheirismo.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental e ao CREBIO.

Ao Dr. Michael MacCoss e toda sua equipe por me receberem pelo período de doutorado sanduíche em seu laboratório.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos (140777/2018-0) e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos no exterior (88881.622760/2021-01).

A FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e auxílio para pesquisa (Processo 2019/12580-8 e 2018/15035-8)

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> e o setor florestal	2
2.2. Mudanças climáticas e aumento da concentração atmosférica de CO ₂	5
2.3. Efeito do aumento do CO ₂ nos organismos vegetais	6
2.4. A proteômica e suas diferentes abordagens	9
2.5. A dinâmica do proteoma cloroplastidial.....	12
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 - The <i>Eucalyptus grandis</i> chloroplast proteome: seasonal variations in leaf development.....	24
1. INTRODUCTION.....	24
2. MATERIALS AND METHODS.....	26
2.1. Plant cultivation and sampling	26
2.2. Fluorescence measurement and chlorophyll relative quantification.....	27
2.3. Chloroplast proteome extraction	27
2.4. Total leaf proteome extraction	27
2.5. Protein quantification assay and SDS-PAGE	28
2.6. Mass spectrometry analysis.....	28
2.7. Protein identification	29
2.8. Statistical analysis and functional annotation.....	29
2.9. Subcellular prediction	30
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	30
3.1. Photosynthetic proteins comprise most of the <i>Eucalyptus grandis</i> chloroplast proteome 31	
3.2. Chloroplast proteome reflects the physiological status in developing leaves.....	33
3.3. Transition seasons induce the most pronounced chloroplast proteome changes.....	39
3.4. The importance of studying chloroplasts metabolic changes	45
4. CONCLUSIONS.....	46
5. REFERENCES	47
CAPÍTULO 3 – Análise de fluxos metabólicos por proteômica quantitativa em espécies de <i>Eucalyptus</i> cultivadas em atmosfera enriquecida com CO ₂	56

1. INTRODUÇÃO.....	56
2. OBJETIVOS.....	57
2.1. Geral.....	57
2.2. Específicos.....	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1. Análises Fenotípicas.....	58
3.1.1. Cultivo material vegetal e tratamentos de CO ₂	58
3.1.2. Índice de Crescimento Caulinar.....	59
3.1.3. Área Foliar.....	59
3.1.4. Abertura Estomática.....	59
3.1.5. Análise Estatística.....	59
3.2. Análise do Proteoma - Data-dependent acquisition (DDA).....	60
3.2.1. Material vegetal e tratamentos com CO ₂	60
3.2.2. Extração de proteínas foliares totais.....	60
3.2.3. Análise por espectrometria de massas.....	61
3.2.4. Identificação de proteínas.....	61
3.2.5. Processamento de dados e análise estatística.....	62
3.2.6. Análise funcional, predição subcelular e diagrama de Venn.....	63
3.3. Análise do Proteoma: Data-independente acquisition (DIA).....	63
3.3.1. Processamento de amostras.....	63
3.3.2. Análise por espectrometria de massas.....	64
3.3.3. Processamento de dados.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. O aumento na concentração de CO ₂ induz respostas diferenciais no crescimento das espécies de <i>Eucalyptus</i>	66
4.2. Análise integrada do proteoma foliar das espécies de <i>Eucalyptus</i> cultivadas em concentração elevada de CO ₂	70
4.3. Alterações metabólicas induzidas por cultivo em atmosfera enriquecida por CO ₂	77
4.3.1. O Ciclo de Calvin-Benson.....	77
4.3.2. O ciclo TCA e a síntese de ácidos graxos.....	86
4.3.3. O metabolismo antioxidante.....	90
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS.....	94
CAPÍTULO 4 - Considerações Finais.....	103

Alterações metabólicas induzidas por fatores ambientais em folhas de espécies de *Eucalyptus*: uma abordagem proteômica

RESUMO – É inegável a influência humana nas mudanças climáticas observadas nos últimos anos. As emissões de gases do efeito estufa vêm aumentando desde a era pré-industrial e foram motivadas, em grande parte, pelo crescimento econômico e populacional do planeta. A proteômica é uma tecnologia chave para o estudo de sistemas biológicos dinâmicos e complexos mediante às mudanças metabólicas que ocorrem em resposta a fatores ambientais. O gênero *Eucalyptus* é de grande importância econômica no Brasil e suas florestas são fontes essenciais de estoque de carbono. Neste trabalho, foram estudados o metabolismo foliar mediante ao aumento de CO₂ e a dinâmica cloroplastidial em resposta ao seu desenvolvimento e mudanças sazonais em *Eucalyptus* utilizando a técnica de proteômica. A dinâmica de desenvolvimento cloroplastidial revelou que em folhas maduras as proteínas mais abundantes estão relacionadas a processos redox e catabólicos, já em folhas jovens estas estão relacionadas à biogênese. Nossos resultados também sugerem que as estações de transição (primavera e outono) induziram as mudanças mais pronunciadas no proteoma do cloroplasto ao longo do ano. Além disso, o aumento na concentração de CO₂ induziu respostas diferenciais no crescimento das diferentes espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas. Foi revelado que a espécie *Eucalyptus urophylla* é a mais responsiva ao CO₂, tanto no crescimento quanto no metabolismo; em contrapartida, *Eucalyptus grandis* não apresentou grandes variações metabólicas e *Eucalyptus pellita* parece usar uma fonte alternativa de energia em resposta ao aumento na concentração de CO₂. Este estudo contribui para uma compreensão mais abrangente sobre os mecanismos de adaptação e de enfrentamento ao estresse em espécies de *Eucalyptus* para melhor entendimento da regulação metabólica das plantas em cenários de mudanças ambientais.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, cloroplastos, CO₂, proteômica, mudanças metabólicas

Metabolic alterations induced by environmental factors in leaves of *Eucalyptus* species: a proteomic approach

ABSTRACT – The human influence on climate change observed in recent years is undeniable. Greenhouse gas emissions have been increasing since pre-industrial times and were largely driven by the planet's economic and population growth. Proteomics is a key technology for the study of dynamic and complex biological systems through metabolic changes that occur in response to environmental factors. The *Eucalyptus* genus has great economic importance in Brazil and its forests are essential sources of carbon stocks. In this work, we studied leaf metabolism through high CO₂ concentrations and chloroplast dynamics in response to development process and seasonal changes in *Eucalyptus* using proteomics technique. The dynamics of chloroplast development revealed that in mature leaves the most abundant proteins are related to redox and catabolic processes, whereas in young leaves these are related to biogenesis. Our findings also suggest that transition seasons (spring and fall) induced the most pronounced chloroplast proteome changes over the year. Furthermore, high CO₂ concentration induced differential responses in the growth of the different *Eucalyptus* species studied here. It was revealed that *Eucalyptus urophylla* specie was the most responsive to CO₂, both in growth and metabolism, in contrast, *Eucalyptus grandis* did not present great metabolic variations and *Eucalyptus pellita* seems to use an alternative source of energy in response to increased CO₂ concentration. This study contributes to a more comprehensive understanding of the mechanisms of adaptation and stress response in *Eucalyptus* species for a better understanding of the metabolic regulation of plants in scenarios of environmental changes.

Keywords: *Eucalyptus*, chloroplasts, CO₂, proteomics, metabolic changes

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

É inegável a influência humana nas mudanças climáticas observadas nos últimos anos. As emissões de gases do efeito estufa vêm aumentando desde a era pré-industrial e foram motivadas, em grande parte, pelo crescimento econômico e populacional do planeta. De acordo com o NOAA (2022), a concentração atmosférica de CO₂ subiu consideravelmente nas últimas décadas: de 315 ppm em 1958 para 419 ppm em 2022, a concentração de CO₂ mais alta já registrada no observatório de Mauna Loa, localizado no Hawaii.

Nesse cenário, as plantas pertencentes ao grupo com fotossíntese do tipo C3 podem ser favorecidas. Sabe-se que uma grande parte da limitação à assimilação de carbono nessas plantas é devido às propriedades catalíticas de oxigenase e carboxilase da enzima RuBisCO (PORTIS; PARRY, 2007). O aumento da propriedade de carboxilação da RuBisCO inibe a fotorrespiração, auxiliando indiretamente nas taxas fotossintéticas (MAKINO; MAE, 1999). Portanto, a fotossíntese e a biomassa dessas espécies podem aumentar quando cultivadas em condições de elevada concentração de CO₂ (KIMBALL, 2016; MAKINO; MAE, 1999).

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

Os cloroplastos, que abrigam diversos processos metabólicos, incluindo a fotossíntese, também são muito sensíveis às flutuações ambientais. O seu desenvolvimento está intimamente relacionado ao crescimento e desenvolvimento do

organismo. Por isso, o estudo das mudanças no seu proteoma pode representar um fator chave para entender suas respostas a estresses bióticos, abióticos e condições adversas (TAYLOR et al., 2009). Nesse sentido, a proteômica é uma ferramenta poderosa e é considerada uma das tecnologias chave para o estudo e investigação de sistemas biológicos dinâmicos e complexos, pois permite medições qualitativas e quantitativas de proteínas em larga escala e fornece uma análise precisa das mudanças metabólicas que ocorrem em resposta a fatores ambientais (CHEN; HARMON, 2006). De modo geral, a proteômica permite desenvolver trabalhos que visam investigar o perfil quantitativo de proteínas, modificações pós-traducionais, vias de sinalização, localização e compartimentação subcelular, complexos proteicos e interações proteína-proteína (MATROS et al., 2011; PFLIEGER; BIGEARD; HIRT, 2011).

Portanto, os objetivos do presente trabalho foram (1) realizar uma análise exploratória das alterações no proteoma cloroplastidial durante o desenvolvimento foliar e variações sazonais em *Eucalyptus grandis*; (2) investigar o crescimento das diferentes espécies de *Eucalyptus* mediante a alta concentração de CO₂ e determinar qual concentração induz a maior resposta diferencial nessas espécies; (3) analisar a variação na abundância das enzimas do ciclo de Calvin-Benson em plantas de *Eucalyptus* cultivadas em elevada concentração de CO₂ utilizando abordagens proteômicas dependente e independente de dados (DDA e DIA) e (4) identificar diferenças e variações quantitativas no proteoma foliar induzidas por crescimento em elevada concentração de CO₂ entre as espécies de *Eucalyptus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Eucalyptus* e o setor florestal

As espécies do gênero *Eucalyptus* constituem-se de plantas arbóreas e de vida longa. São encontradas predominantemente no hemisfério sul e pertencem à família *Myrtaceae*, que compreende outros 130 gêneros (THE PLANT LIST, 2019). No sentido amplo, os eucaliptos também incluem os gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora* (POTTS; BRADLEY, 2004). Esse gênero é nativo da Austrália e da Indonésia e foi

vastamente plantado em diversos países, mostrando-se particularmente bem sucedido em regiões tropicais e subtropicais (STANTURF et al., 2013). Muito embora o eucalipto seja considerado uma planta alógama, é estimado que ele possua uma frequência de autofecundação de 10% a 30% (ELDRIDGE et al., 1993). Numa espécie com esta taxa de autofecundação é importante verificar o efeito da endogamia na expressão fenotípica de alguns caracteres.

Foi introduzido no Brasil em meados de 1868 no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro e começou a ser cultivado de forma comercial por Navarro de Andrade por volta de 1909, na cidade de Rio Claro - SP, com a finalidade de produção de madeira para construção de estações e vilas, combustível para locomotivas, dormentes e mourão de cercas e postes (MORA; GARCIA, 2000). Atualmente, já foram catalogadas cerca de 700 espécies de eucalipto, sendo que os mais cultivados no país são *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e seu híbrido, o *Eucalyptus urograndis* (VITAL, 2007).

A espécie *E. grandis* é a mais cultivada, devido às suas características silviculturais, importância econômica, propriedades e aplicabilidade da madeira para diversos fins, aliada à grande variabilidade genética. Essa espécie tem se destacado dentro do gênero, como a melhor em desenvolvimento nos plantios comerciais para as regiões subtropicais, porém não apresenta um alto índice de resistência à seca (KAGEYAMA, 1980; MORAES, 1987; ASSIS, 1996). O interesse pela espécie *E. urophylla* cresceu no país depois de ser reconhecida como resistente ao cancro do eucalipto, além de mostrar um bom potencial para ser cultivada em regiões de clima quente e de elevados déficits hídricos devido a sua boa performance nestas condições e também por apresentar boa qualidade da madeira para carvão e celulose. Suas árvores são de grande porte, retas, com forte dominância apical e casca rugosa (RUY; FILHO, 2001). Já a espécie *E. saligna* destaca-se por apresentar maior resistência ao frio quando comparada a *E. urophylla* além de demonstrar alta produtividade e facilidade na obtenção de material clonal, devido a seu fácil enraizamento quando cultivado na região sul do país (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

Dentre todas as espécies de eucalipto já descritas, apenas 27,4% são as mais utilizadas para fins comerciais ao redor do mundo (SANTAROSA; PINTO JÚNIOR; GOULART, 2014). Nesse contexto, estudos envolvendo outras espécies de eucalipto menos tradicionais e com boas características agronômicas, são imprescindíveis para a composição de uma base científica que possibilite o fomento de plantios em escala comercial.

No Brasil, as florestas de *E. pellita* têm sido estabelecidas principalmente para a produção de carvão vegetal devido a suas características de densidade, além de ser utilizado por possuir resistência à seca, às doenças como ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) e manchas foliares por fungos do gênero *Cylindrocladium* (OLIVEIRA et al., 2010; RESENDE; ASSIS, 2008; ASSIS et al., 2015). As árvores de *E. camaldulensis* tem uma plasticidade ambiental muito grande pois apresentam capacidade de desenvolvimento em zonas geográficas críticas, tolerância a longos períodos de seca e chuva concentrada, baixas temperaturas e geadas intensas. Além de adaptação a ampla variedade de solos, o que envolve solos pobres, periodicamente inundados e compactados por uso extensivo de pastagens (ARNOLD; LUO, 2018; AZEVEDO et al., 2015). O plantio da espécie *Corymbia citriodora* têm crescido devido a sua ampla adaptabilidade às diferentes regiões brasileiras, sendo considerada essa uma relevância silvicultural para plantio de extensas áreas (LUZ et al., 2018). Além de sua aplicação madeireira, a espécie se destaca na extração do óleo essencial extraído de suas folhas, como o citronelal, com potencial fungicida e bactericida (REIS et al., 2013; BIAGIOTTI, 2017).

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

O genoma da espécie *E. grandis*, proveniente de uma geração de autofecundação de uma árvore chamada BRASUZ1, possui 640Mb, 36.376 genes preditos os quais estão localizados em 11 cromossomos (MYBURG et al., 2014).

Atualmente, o Brasil é o 2º maior produtor mundial de celulose, perdendo somente para os Estados Unidos. Também ocupa a 9ª posição no ranking dos maiores produtores de papel, produzindo 10,2 milhões por tonelada no ano de 2020. Além disso, a produtividade das florestas de *Eucalyptus* plantadas no Brasil é de cerca de 38 a 50 m³/há/ano (IBÁ,2021). Os principais artigos que esse segmento fornece são produtos de higiene e beleza, papéis para escrever e imprimir e embalagens (ABRAF, 2013).

A área florestal plantada no país é de 9,55 milhões de hectares para o cultivo industrial e 6 milhões de hectares para conservação, sendo 78% da área florestal total do país (IBÁ, 2021). O estoque total de carbono das florestas de eucalipto atualmente é de cerca de 153 toneladas por hectare, sendo 104 toneladas estocadas em biomassa (FAO, 2020). O setor ainda criou cerca de 500 mil empregos diretos e mais 1,5 milhões de empregos indiretos em 2020 (IBÁ, 2021).

2.2. Mudanças climáticas e aumento da concentração atmosférica de CO₂

As mudanças climáticas observadas nas últimas décadas foram ocasionadas principalmente por influência antropológica e motivadas em grande parte pelo crescimento econômico e populacional do planeta (QADERI; REID, 2009). As emissões de gases do efeito estufa vêm aumentando desde a era pré-industrial, somente o CO₂ aumentou mais de 40% sua concentração atmosférica (IPCC, 2013).

De acordo com o NOAA (2022), a concentração atmosférica de CO₂ subiu consideravelmente nas últimas décadas: passou de 315 ppm em 1958 para 419 ppm em 2022, a concentração de CO₂ mais alta já registrada no observatório de Mauna Loa, localizado no Hawaii. Por isso, a fim de promover uma visão ampla a respeito das pesquisas sobre mudanças climáticas no mundo, consolidar e confirmar as tendências nesse campo de conhecimento e sugerir políticas para a mitigação dos efeitos adversos, foi criado no final da década de 1980 o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), que é composto por um corpo internacional de especialistas para avaliação da pesquisa sobre esse tema (OJIMA, 2011).

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

Neste sentido, um dos mais importantes elementos dos esforços do IPCC é a criação de modelos climáticos, considerando as forças motrizes e as opções de resposta a essas mudanças (MOSER; LUERS, 2007). As projeções de emissões de gases de efeito estufa variam em uma grande escala, dependendo da política climática e do desenvolvimento socioeconômico da população mundial. Os novos cenários climáticos propostos pelo IPCC indicam uma elevação na concentração de CO₂ de 700 a 1000 ppm para o ano de 2100 dependendo da política de mitigação adotada (IPCC, 2022). Apesar do número crescente de políticas para mitigação de mudanças climáticas, as emissões anuais de gases que causam efeito estufa cresceram, em média, 1 GtCO₂-eq por ano, de 2000 a 2010, comparado a 0,4 GtCO₂-eq ao ano, de 1970 a 2000 (IPCC, 2014).

O aumento de CO₂ afetará diretamente o metabolismo das plantas, principalmente pelo seu papel na fotossíntese, que é o ponto de entrada do carbono na biosfera. É esperado que concentrações elevadas desse gás aumentem as taxas fotossintéticas foliares, mas não é possível saber com qual intensidade isso acontecerá, uma vez que o estímulo da fotossíntese também depende da temperatura foliar e da disponibilidade de água e nutrientes (LEAKEY et al., 2009; ZHU et al., 2017).

2.3. Efeito do aumento do CO₂ nos organismos vegetais

A concentração elevada de CO₂ afeta direta e indiretamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, principalmente as espécies vegetais com metabolismo do tipo C₃, modificando uma série de processos bioquímicos e fisiológicos. Quase 90% das espécies vegetais conhecidas pertencem ao grupo de plantas C₃ e não estão

fotossinteticamente saturadas na concentração de CO₂ atual. Este ciclo leva tal nome pois o primeiro produto estável a ser formado é um composto de três carbonos, o fosfoglicerato (3-PGA). Sabe-se que uma grande parte da limitação à assimilação de carbono em plantas C3 é devido às propriedades catalíticas de oxigenase e carboxilase da enzima RubisCO (PORTIS; PARRY, 2007). O aumento da propriedade de carboxilação da RubisCO inibe a fotorrespiração, auxiliando indiretamente nas taxas fotossintéticas (MAKINO; MAE, 1999). Portanto, a fotossíntese e a biomassa dessas espécies podem aumentar quando cultivadas em condições de elevada concentração de CO₂ (KIMBALL, 2016; MAKINO; MAE, 1999).

As características das plantas C3 permitem que elas sejam mais eficientes em condições de climas temperados e a redução na sua produtividade deve-se ao aumento do processo de fotorrespiração com o aumento da temperatura. As adaptações espaciais que ocorreram nas plantas com fotossíntese do tipo C4 permitem que elas fotossintetizem em altas taxas, mesmo em altas temperaturas, pois o mecanismo de concentração de CO₂ praticamente elimina a fotorrespiração e elas conseguem altas produtividades nas condições tropicais. Já as adaptações fisiológicas das plantas CAM permitem a sua sobrevivência em condições de climas áridos e semiáridos, porém são pouco produtivas devido às baixas taxas fotossintéticas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

É conhecido que altos níveis de CO₂ possam suprimir a fotorrespiração, um processo geralmente visto como uma reação de desperdício da RubisCO. Estudos anteriores confirmam essa hipótese, uma vez que foi relatado aumento da produtividade de plantas modificadas com desvios metabólicos para contornar a fotorrespiração (KEBEISH et al., 2007; MAURINO; PETERHANSEL, 2010). No entanto, muitos mutantes para esse processo cresceram mal nas concentrações atuais de CO₂ (TIMM; BAUWE, 2013), indicando que a fotorrespiração tem um papel importante no metabolismo de carbono da planta. Também há evidências de que a fotorrespiração fornece tolerância ao estresse nos organismos vegetais (VOSS et al., 2013). Além disso, a fotorrespiração tem sido associada ao aumento da capacidade de absorção de nitrogênio (BLOOM et al., 2014; DELLERO et al., 2015; BUSCH et al., 2018), particularmente nitrato, indicando que

o aumento do CO₂ pode reduzir a absorção de nitrogênio pelas plantas quando o nitrato é a principal fonte de nitrogênio disponível.

Com relação à fotossíntese, estudos mostraram que a eficiência dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) e o fluxo de transporte de elétrons aumentaram em altas concentrações de CO₂, produzindo mais ATP e NADPH (VAN HEERDEN; SWANEPOEL; KRÜGER, 2007; ZHANG et al., 2008; SEKHAR; SREEHARSHA; REDDY, 2015). Esses resultados também sugerem alta eficiência na fase fotoquímica do processo fotossintético em elevadas concentrações de CO₂. Além disso, o aumento das taxas de fotossíntese nessas mesmas condições, resultou em maior produção de açúcares, incluindo glicose, frutose e rafinose, em várias espécies vegetais (ARANJUELO et al., 2015; WATANABE et al., 2013).

Em contrapartida, a condutância estomática, que está relacionada ao tamanho da abertura estomática e número de estômatos por unidade de área foliar, parece diminuir em culturas expostas a elevadas concentrações de CO₂ (AINSWORTH; LONG, 2005; LEAKEY et al., 2009). Do mesmo modo, a concentração de nitrogênio diminui especialmente nos tecidos foliares das plantas cultivadas nessas condições (STITT; KRAPP, 1999; TAKATANI et al., 2014; SENEWEERA et al., 2011). Já foi observado que as taxas elevadas de CO₂ alteraram a alocação de N para diferentes órgãos da planta, reduzindo nas folhas e aumentando a alocação nas bainhas foliares e raízes (SENEWEERA et al., 2011).

Com relação ao crescimento, o alto fornecimento de carbono pode contribuir para uma divisão e expansão celular mais rápida nos tecidos meristemáticos e acelerar o crescimento e desenvolvimento inicial da planta (THILAKARATHNE et al., 2015). Já foi relatado que sob o efeito de elevada concentração de CO₂, as plantas tendem a apresentar uma taxa de iniciação e alongamento foliar mais acelerada juntamente com o aumento da área foliar (SENEWEERA et al., 1995; TAYLOR et al., 1994; TAYLOR et al., 2001). Além disso, já foram descritas respostas positivas de crescimento em atmosfera enriquecida com CO₂ em espécies de plantas lenhosas quando outros recursos foram fornecidos apropriadamente (ATWELL; HENERY; BALL, 2009; CROUS; WALTERS; ELLSWORTH, 2008; LIBERLOO et al., 2006). Estudos sobre eucalipto indicam que essa

espécie apresenta estímulo no seu crescimento, especialmente nos primeiros anos de desenvolvimento, estando entre as plantas lenhosas mais sensíveis ao incremento de CO₂ (AINSWORTH; LONG, 2005; ATWELL; HENERY; WHITEHEAD, 2003).

Do ponto de vista molecular, vários genes associados aos fotossistemas, como por exemplo, PSII protein K, PSII protein D1 e D2, PSI P700 Chl a apoprotein A1, apoprotein A2 e ferredoxina-1 aumentaram sua expressão quando as plantas foram expostas a elevadas concentrações de CO₂ (GAMAGE et al., 2018). Além disso, enzimas importantes envolvidas no metabolismo da sacarose, como sacarose fosfato sintase e sacarose sintase, também foram significativamente abundantes sob efeito de CO₂ (GESCH et al., 2002; AOKI et al., 2003). Também foi observado que altas concentrações desse gás influenciam genes envolvidos no ciclo celular e em propriedades da parede celular que funcionam na tolerância ao estresse (AINSWORTH et al., 2006; WEI et al., 2013).

2.4. A proteômica e suas diferentes abordagens

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

proteicas (CHEN; HARMON, 2006). Por esse motivo, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas como a proteômica, que tem por objetivo o estudo do produto final da expressão gênica para avaliação da sua condição fisiológica, farmacológica e/ou patológica.

Os avanços significativos alcançados nessa área nas últimas décadas devem-se ao aumento na disponibilidade de informação genômica depositada em bancos de dados, à melhorias tecnológicas em espectrometria de massas, especialmente o desenvolvimento de técnicas de ionização suave para análise de peptídeos (AEBERSOLD; MANN, 2003), bem como o desenvolvimento de técnicas e equipamentos que possibilitam a separação, quantificação e caracterização de proteínas, além de ferramentas capazes de relacionar estas informações com aquelas obtidas por outros métodos (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004). De modo geral, a proteômica permite desenvolver trabalhos que visam investigar o perfil quantitativo de proteínas, modificações pós-traducionais, vias de sinalização, localização e compartimentação subcelular, complexos proteicos e interações proteína-proteína (MATROS et al., 2011; PFLIEGER; BIGEARD; HIRT, 2011).

A estratégia proteômica “shotgun” tornou-se o método mais utilizado para quantificação de proteínas a partir de amostras biológicas e seu progresso nos últimos anos permitiu que mais de 10.000 proteínas fossem identificadas e quantificadas a partir de uma única análise (MUNTEL et al., 2019). O preparo de amostras para essa estratégia tem muitas variações, mas todas seguem algumas etapas necessárias. Primeiramente, as proteínas são isoladas usando tampão aquoso contendo um agente solubilizante e desnaturante. Em seguida, as ligações dissulfeto nos resíduos de cisteína são reduzidas e alquiladas covalentemente, e então, as proteínas são hidrolisadas enzimaticamente em peptídeos, normalmente utilizando a enzima tripsina (MEYER, 2021). Existem diversas maneiras de operar o espectrômetro de massa para análise desses peptídeos proteotípicos, como as abordagens de aquisição dependente de dados (DDA) e independente de dados (DIA).

Nos fluxos de trabalho DDA, os íons peptídicos digeridos (íons precursores) são analisados no nível MS1 utilizando um analisador de massa de alta resolução. Em

seguida, os precursores selecionados são isolados e fragmentados, gerando espectros do tipo MS2. Para cada varredura MS1, geralmente, são realizadas várias varreduras MS/MS, até a próxima varredura MS1 e assim o ciclo se repete. Embora essa abordagem "TopN" permita a identificação de precursores abrangendo toda a faixa de massa, a fragmentação dos íons precursores, geralmente os íons mais intensos, limita a reprodutibilidade dos experimentos, resulta em valores ausentes e vieses de quantificação para os peptídeos mais abundantes (AEBERSOLD; MANN, 2016). Isso pode ser desvantajoso para fluxos de trabalho que não utilizam marcação e para amostras com uma alta faixa dinâmica de proteínas, como tecidos fotossintéticos.

A técnica DIA, surgiu como uma abordagem alternativa poderosa para aquisição dependente de dados (DDA) pois o espectrômetro de massa adquire sistematicamente espectros MS/MS, independentemente de um sinal precursor ser detectado ou não. Nos fluxos de trabalho DIA, o ciclo do instrumento é estruturado de forma que os espectros MS/MS sejam sequencialmente adquiridos ao longo de um intervalo constante de m/z , permitindo medições quantitativas usando íons fragmentados em vez de íons precursores (VENABLE et al., 2004; GILLET et al., 2012). Essa abordagem produz dados semelhantes ao monitoramento de reação paralela direcionada (PRM), porém, em vez de mensurar peptídeos específicos, os dados quantitativos são adquiridos em um intervalo predefinido de razão massa carga (m/z). Entretanto, uma grande desvantagem do método DIA, é que cada varredura MS2 contém espectros multiplexados de vários íons precursores, dificultando a identificação precisa de peptídeos. Para solucionar esse problema, diversas ferramentas e estratégias vêm sendo desenvolvidas ao longo do tempo (PANCHAUD, et al., 2009; TSOU et al., 2015; RÖST et al., 2014).

Uma das estratégias desenvolvidas foi o uso de corridas com janelas estreitas dedicadas à detecção de peptídeos para a construção de bibliotecas cromatográficas já baseada na abordagem de DIA. A vantagem da utilização das bibliotecas cromatográficas é registrar a forma do pico cromatográfico dos íons fragmentos e o tempo de retenção para cada peptídeo detectável no experimento, assim, essas coordenadas podem ajustar os sinais para um sistema cromatográfico e espectrômetro de massas específico (SEARLE et al., 2018).

2.5. A dinâmica do proteoma cloroplastidial

O cloroplasto é o maior compartimento metabolicamente ativo e a organela mais abundante nos tecidos vegetais. Além de realizar o processo de fotossíntese, ele ainda é responsável por mediar uma série de funções celulares essenciais como a síntese de lipídios, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, hormônios e metabólitos secundários tais como alcalóides e isoprenóides, que são necessários para assimilação de nitrogênio e enxofre (KAMAL et al., 2013; VAN WIJK, 2004). Além disso, as folhas de eucalipto possuem uma grande quantidade de antioxidantes, principalmente flavonóides, que fornecem proteção contra danos causados por EROs e estresse oxidativo (OBERSCHELP et al., 2020).

Os cloroplastos são compostos por alguns compartimentos, incluindo envelope de membrana interna e externa, o estroma, a membrana do tilacóide e o lúmen do tilacóide (VAN WIJK, 2004). Estima-se que estejam presentes entre 2500 e 3000 proteínas nos cloroplastos (VAN WIJK, 2001). Uma vez que o genoma do cloroplasto pode codificar aproximadamente 120 proteínas, a maioria dessas são codificadas no núcleo e posteriormente transportadas para a organela (KEEGSTRA; CLINE, 1999). Em *Eucalyptus grandis*, o genoma do cloroplasto apresenta aproximadamente 160 kb (PINARD; MYBURG, 2019).

A biogênese dos cloroplastos começa a partir dos proplastídeos, que, após exposição à luz, se transformam em cloroplastos maduros com transportadores de elétrons funcionais, proteínas de membrana e enzimas do estroma que são capazes de capturar, assimilar e armazenar carbono (BISWAL; PANDEY, 2016). Durante a senescência, eles se diferenciam dos gerontoplastos, que levam ao amarelecimento das folhas, necrose e morte (THOMAS, 2013). Assim, o desenvolvimento plastidial está intimamente relacionado ao desenvolvimento de toda a planta em diferentes estágios (KUTÍK et al., 2004).

Como os cloroplastos são muito sensíveis às flutuações ambientais, mudanças dinâmicas no proteoma podem representar um fator chave para entender suas respostas a estresses abióticos (TAYLOR et al., 2009). Além disso, a caracterização da dinâmica do proteoma do cloroplasto pode contribuir para um melhor entendimento da adaptação

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

Os trabalhos a respeito de proteomas cloroplastidiais mais recentes tiveram como objetivo identificar alterações induzidas por estresses bióticos e abióticos (ZHU et al., 2021; HERRMANN et al., 2021), investigar os mecanismos de remodelação e reprogramação do metabolismo vegetal (LANDE et al., 2020), estudar sua biogênese, senescência e desenvolvimento (XIONG et al., 2021; PIPITONE et al., 2021; FLANNERY et al., 2021), além de descoberta de novas estratégias para aumentar a cobertura de identificação do proteoma (BAYER et al., 2021).

3. REFERÊNCIAS

- ABRAF. Anuário Estatístico - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF**, p. 146, 2013.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198, 2003.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, p.347–355, 2016.
- AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis,

- canopy properties and plant production to rising CO₂. **New Phytologist**, v. 165, n. 2, p. 351–372, 2005.
- AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; VODKIN, L. O.; WALTER, A.; SCHURR, U. The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. **Plant Physiol.**, v. 142, p. 135-147, 2006.
- AOKI, N.; ONO, K.; SASAKI, H.; SENEWEERA, S. P.; SAKAI, H.; KOBAYASHI, K.; ISHIMARU, K. Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic carbon metabolism in flag-leaf blades of rice before and after heading. **Plant Prod. Sci.**, v. 6, p. 52-58, 2003.
- ARANJUELO, I.; ERICE, G.; SANZ-SÁEZ, A.; ABADIE, C.; GILARD, F.; GIL-QUINTANA, E.; ARAUS, J. L. Differential CO₂ effect on primary carbon metabolism of flag leaves in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Plant, Cell & Environment**, v. 38, p. 2780–2794, 2015.
- ARNOLD, R. J.; LUO, J. *Eucalyptus camaldulensis*. In: THOMSON, L.; DORAN, J.; CLARKE, B. (org.) Trees for life in Oceania: conservation and utilisation of genetic diversity. Australian Government: Australian Centre for International. **Agricultural Research**, p. 94–99, 2018.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 189, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F.; ABAD, J. I. M.; AGUIAR, A. M. Melhoramento genético do eucalipto, In: SCHUMACHER, M. V.; VIEIRA, M. **Silvicultura do eucalipto no Brasil**. Santa Maria, RS: UFSM, p. 217-244, 2015.
- ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; BALL, M. C. Does soil nitrogen influence growth, water transport and survival of snow gum (*Eucalyptus pauciflora* Sieber ex Sprengel.) under CO₂ enrichment? **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 5, p. 553–566, 2009.
- ATWELL, B. J.; HENERY, M. L.; WHITEHEAD, D. Sapwood development in *Pinus radiata* trees grown for three years at ambient and elevated carbon dioxide partial pressures. **Tree Physiology**, v. 23, n. 1, p. 13–21, 2003.
- AZEVEDO, L. P. A.; COSTA, R. B.; MARTINEZ, D. T.; TSUKAMOTO FILHO, A. A.; BRONDANI, G. E.; BARETTA, M. C.; AJALA, W. V. Genetic selection in *Eucalyptus camaldulensis* progenies in savanna area of Mato Grosso State, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 11, p. 2001–2006, 2015.
- BAYER, R. G.; STAEL, S.; TEIGE, M. Chloroplast Isolation and Enrichment of Low-Abundance Proteins by Affinity Chromatography for Identification in Complex Proteomes. In: Posch A, editor. **Proteomic Profiling: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US; p. 535–47, 2021.

- BIAGIOTTI, G.; VALERI, S. V.; DA CRUZ, M. C. P.; DE VASCONCELOS, R. T. Fertilização potássica na implantação de *Corymbia citriodora* (Hook.) KD Hill & LAS Jonhson, **Scientia Forestalis**, p. 129-137, 2017.
- BISWAL, B.; PANDEY, J. Development of Chloroplast Biogenesis, Senescence, and Regulations. In: **Handbook of photosynthesis**. Third edition. CRC press; p. 77-93, 2016.
- BLOOM, A. J.; BURGER, M.; KIMBALL, B. A.; PINTER, P. J. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. **Nature Climate Change**, v. 4, p. 477-480, 2014.
- BUSCH, F. A.; SAGE, R. F.; FARQUHAR, G. D. Plants increase CO₂ uptake by assimilating nitrogen via the photorespiratory pathway. **Nature Plants**, v. 4, p. 46-54, 2018.
- CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.
- CROUS, K. Y.; WALTERS, M. B.; ELLSWORTH, D. S. Elevated CO₂ concentration affects leaf photosynthesis-nitrogen relationships in *Pinus taeda* over nine years in FACE. **Tree Physiology**, v. 28, n. 4, p. 607-614, 2008.
- DELLERO, Y.; LAMOTHE-SIBOLD, M.; JOSSIER, M.; HODGES, M. *Arabidopsis thaliana* ggt1 photorespiratory mutants maintain leaf carbon/nitrogen balance by reducing Rubisco content and plant growth. **Plant Journal**, v. 83, p. 1005-1018, 2015.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, I.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. Eucalypt domestication and breeding. **New York**: Oxford University Press, p. 288, 1993.
- FAO - Food and Agriculture Organization - **Global Forest Resources Assessment**, 2020. Disponível em: <<https://fra-data.fao.org/BRA/fra2020/home/>>. Acesso em: 20 maio 2022.
- FLANNERY, S. E.; HEPWORTH, C.; WOOD, W. H. J.; PASTORELLI, F.; HUNTER, C. N.; DICKMAN, M. J.; et al. Developmental acclimation of the thylakoid proteome to light intensity in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 105, n. 1, p. 223-44, 2021.
- GAMAGE, D.; THOMPSON, M.; SUTHERLAND, M.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; SENEWEERA, S. New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. **Plant Cell Env.**, v. 41, p. 1233-1246, 2018.

- GESCH, R. W.; VU, J.C.; BOOTE, K.J.; HARTWELL ALLEN, L.; BOWES, G. Sucrose-phosphate synthase activity in mature rice leaves following changes in growth CO₂ is unrelated to sucrose pool size. **New Phytol.**, 154, pp. 77-84, 2002.
- GILLET, L. C. et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. **Mol. Cell Proteom**, v.11, O111.016717, 2012.
- HERRMANN, H. A.; DYSON, B. C.; MILLER, M. A. E.; SCHWARTZ, J. M.; JOHNSON G. N. Metabolic flux from the chloroplast provides signals controlling photosynthetic acclimation to cold in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environment**, v.44, n.1, p.171-85, 2021.
- IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. **Anuário estatístico da IBA**: ano base 2014, p. 100, 2015.
- IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. **Relatório anual IBÁ** - 2021, p. 176, 2021.
- IPCC - Climate Change: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth **Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. IPCC, Geneva, Suíça, p. 151, 2014.
- IPCC - Summary for Policymakers [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, M. Tignor, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Lösckke, V. Möller, A. Okem (eds.)]. In: **Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability**. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Lösckke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. In Press, 2022.
- IPCC - Summary for policymakers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the **Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate change**. In T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, s. K. Ailen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex & P. M. Midgley (eds.). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2013.
- KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. 1980. 125 f. Tese (**Doutorado em Ciências Florestais**) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- KAMAL, A. H. M.; CHO, K.; CHOI, J. S.; BAE, K. H.; KOMATSU, S.; UOZUMI, N.; WOO, S. H. The wheat chloroplastic proteome. **Journal of Proteomics**, v. 93, p. 326–342, 2013.

- KEBEISH, R.; NIESSEN, M.; THIRUVEEDHI, K.; BARI, R.; HIRSCH, H. J.; ROSENKRANZ, R.; STÄBLER, N.; SCHÖNFELD, B.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 593–599, 2007.
- KEEGSTRA, K.; CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **The Plant cell**, v. 11, n. 4, p. 557–570, 1999.
- KIMBALL, B. A. Crop responses to elevated CO₂ and interactions with H₂O, N, and temperature. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 31, p. 36–43, 2016.
- KUTÍK, J.; BISWAL, B.; BISWAL, U. C.; RAVAL, M. K. Chloroplast biogenesis: From proplastid to gerontoplast. **Photosynthetica**. v.42, p.350, 2004.
- LANDE N. V.; BARUA, P.; GAYEN, D.; KUMAR, S.; VARSHNEY, S.; SENGUPTA, S.; CHAKRABORTY, S.; CHAKRABORTY, N. Dehydration-induced alterations in chloroplast proteome and reprogramming of cellular metabolism in developing chickpea delineate interrelated adaptive responses. **Plant Physiol Biochem**, v. 146, p.337-48, 2020.
- LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ROGERS, A.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 2859–2876, 2009.
- LIBERLOO, M.; CALFAPIETRA, C.; LUKAC, M.; GODBOLD, D.; LUO, Z. B.; POLLE, A.; HOOSBECK, M. R.; KULL, O.; MAREK, M.; RAINES, C.; RUBINO, M.; TAYLOR, G.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G.; CEULEMANS, R. Woody biomass production during the second rotation of a bio-energy *Populus* plantation increases in a future high CO₂ world. **Global Change Biology**, v. 12, n. 6, p. 1094–1106, 2006.
- LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tools for the new biology**. Humana Press: New Jersey, p. 3, 2002.
- LUZ, O. D. S. L.; HONÓRIO, A. B. M.; FIDELIS, R. R.; NASCIMENTO, I. R. D.; MORAES, C. B. D.; LEAL, T. C. A. D. B. Characteristics for the selection of parents of *Corymbia citriodora* aiming to the production of wood and essential oil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 42, n. 1, 2018.
- MAKINO, A.; MAE, T. Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, p. 999–1006, 1999.
- MATROS, A.; KASPAR, S.; WITZEL, K.; MOCK, H. P. Recent progress in liquid chromatography-based separation and label-free quantitative plant proteomics. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 963–974, 2011.

- MAURINO, V. G.; PETERHANSEL, C. Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 248–255, 2010.
- MEYER, J. G. Qualitative and Quantitative Shotgun Proteomics Data Analysis from Data-Dependent Acquisition Mass Spectrometry. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 2259, p. 297–308, 2021.
- MORA, A.; GARCIA, C. H. A cultura do eucalipto no Brasil. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, p.12, 2000.
- MORAES, M. L. T. Variação genética da densidade básica da madeira em progênies de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden e suas relações com as características de crescimento. 1987. 129 f. Dissertação (**Mestrado em Ciências Florestais**) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOSER, S. C.; LUERS, A. L. Managing climate risks in California: The need to engage resource managers for successful adaptation to change. **Climatic Change**, v. 87, n. 1 SUPPL, 2007.
- MUNTEL, J.; GANDHI, T.; VERBEKE, L.; BERNHARDT, O. M.; TREIBER, T.; BRUDERER, R.; REITER, L. Surpassing 10 000 identified and quantified proteins in a single run by optimizing current LC-MS instrumentation and data analysis strategy. **Mol Omics**, v.15, p. 348–360, 2019.
- MYBURG, 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.; ELSER, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; LHEIM, C.K.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JR, JG. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMAPETTENATI, J.; SALSE, J. J.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.

- NOAA -National Oceanic and Atmospheric Administration - Earth System Research Laboratory, **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**, 2022. Disponível em: <<https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>> Acesso em: 04 abr. 2022.
- OBERSCHELP, G. P. J.; GUARNASCHELLI, A. B.; TESON, N.; HARRAND, L.; PODESTÁ, F. E.; MARGARIT, E. Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: A metabolomic and proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.1, n.154, p.316–27, 2020.
- OJIMA, R. As dimensões demográficas das mudanças climáticas: cenários de mudança do clima e as tendências do crescimento populacional. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 28, n. 2, p. 389–403, 2011.
- OLIVEIRA, A. C.; CARNEIRO, A. C. O.; VITAL, B. R.; ALMEIDA, W.; PEREIRA, B. L. C.; CARDOSO, M. T. Parâmetros de qualidade da madeira e do carvão vegetal de *Eucalyptus pellita* F. Muell. **Scientia Forestalis**, v.38, p.431-439, 2010.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2006. 45 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 129).
- PANCHAUD, A. et al. Precursor acquisition independent from ion count: how to dive deeper into the proteomics ocean. **Anal. Chem**, v.81, p.6481–6488, 2009.
- PARK, O. K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 133–138, 2004.
- PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y. Características Da Madeira De Algumas Espécies De Eucalipto Plantadas No Brasil. **Embrapa Florestas**, v. Documentos, 38, p. 113p, 2000.
- PFLIEGER, D.; BIGEARD, J.; HIRT, H. Isolation and characterization of plant protein complexes by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1824–1833, 2011.
- PINARD, D.; MYBURG, A. A.; MIZRACHI, E. The plastid and mitochondrial genomes of *Eucalyptus grandis*. **BMC Genomics**, v.20, p.132, 2019.
- PINO, L. K.; SEARLE, B. C.; BOLLINGER, J. G.; NUNN, B.; MACLEAN, B.; MACCOSS M. J. The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. **Mass Spectrom Rev**, v.39, n.3, p.229-244, 2020.
- PIPITONE, R.; EICKE, S.; PFISTER, B.; GLAUSER, G.; FALCONET, D.; UWIZEYE, C.; et al. A multifaceted analysis reveals two distinct phases of chloroplast biogenesis during de-etiolation in *Arabidopsis*. **eLife**,10:e62709, 2021.

- PORTIS, A. R.; PARRY, M. A. J. Discoveries in RubisCO (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): A historical perspective. **Photosynthesis Research**, v. 94, n. 1, p. 121–143, 2007.
- POTTS, BRADLEY. Genetic improvement of eucalypts. **Encyclopedia of Forest Science**. p.1480-1490, 2004.
- QADERI, M. M.; REID, D. M. Crop responses to elevated carbon dioxide and temperature. In **Climate change and crops** (pp. 1–18). Springer, 2009.
- REIS, C. A. F.; ASSIS, T. F.; SANTOS, A. M.; PALUDZYSZYN FILHO, E. *Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil. **Embrapa Florestas**-Documentos (INFOTECA-E), 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/974349/corymbia-citriodora-estado-da-arte-de-pesquisas-no-brasil>. Acesso em: 20 maio 2022.
- RESENDE, M. D. V.; ASSIS, T. F. Seleção recorrente recíproca entre populações sintéticas multi-espécies (SRR-PSME) de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 57, p. 57-60, 2008.
- RÖST, H. L. et al. Open SWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. [letter]. **Nat. Biotechnol.** v.32, p.219–223, 2014.
- RUY, O. F.; FILHO, M. T. Variação da qualidade da madeira entre grupos fenotípicos de clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake da Ilha de Flores, Indonesia. **Scientia**, p. 21–27, 2001.
- SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. Transferência de tecnologia florestal – Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. **Embrapa Florestas**, Brasília, 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1010933/transferencia-de-tecnologia-florestal-cultivo-de-eucalipto-em-propriedades-rurais-diversificacao-da-producao-e-renda>. Acesso em: 20 maio 2022.
- SANTOS, B. M. DOS; BALBUENA, T. S. Carbon assimilation in *Eucalyptus urophylla* grown under high atmospheric CO₂ concentrations: A proteomics perspective. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 252–257, 2017.
- SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 6, p. 1–17, 2004.
- SEARLE, B.C.; PINO, L.K.; EGERTSON, J.D. et al. Chromatogram libraries improve peptide detection and quantification by data independent acquisition mass spectrometry. **Nat Commun**, v.9, p. 5128, 2018.

- SEKHAR, K. M., SREEHARSHA, R. V., REDDY, A. R. Differential responses in photosynthesis, growth and biomass yields in two mul-berry genotypes grown under elevated CO₂ atmosphere. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 172–179, 2015.
- SENEWEERA, S. P.; BASRA, A. S.; BARLOW, E. W.; CONROY, J. P. Diurnal regulation of leaf blade elongation in rice by CO₂ (is it related to sucrose-phosphate synthase activity?), **Plant Physiology**, v. 108, p. 1471–1477, 1995.
- SENEWEERA, S.; MAKINO, A.; HIROTSU, N.; NORTON, R.; SUZUKI, Y. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves, **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.128–136.2011.
- STANTURF, J. A.; VANCE, E. D.; FOX, T. R.; KIRST, M. Eucalyptus beyond Its Native Range: Environmental Issues in Exotic Bioenergy Plantations. **International Journal of Forestry Research**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular back-ground. **Plant, Cell & Environment**, v.22, p.583–621,1999.
- TAKATANI, N.; ITO, T.; KIBA, T.; MORI, M.; MIYAMOTO, T.; MAEDA, S.I.; OMATA, T. Effects of high CO₂ on growth and metabolism of *Arabidopsis* seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. **Plant and Cell Physiology**, v.55, p.281–292, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Editora Artmed, 719p, 2004.
- TAYLOR, G.; CEULEMANS, R.; FERRIS, R.; GARDNER, S.; SHAO, B. Increased leaf area expansion of hybrid poplar in elevated CO₂. From controlled environments to open-top chambers and to FACE. **Environmental Pollution**, v.115, p. 463–472, 2001.
- TAYLOR, G.; RANASINGHE, S.; BOSAC, C.; GARDNER, S. D. L.; FERRIS, R. Elevated CO₂ and plant growth: Cellular mechanisms and responses of whole plants. **Journal of Experimental Botany**, v.45, p.1761–1774,1994.
- TAYLOR, N. L.; TAN, Y. F.; JACOBY, R. P.; MILLAR, A. H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v. 72, n.3, p.367–78, 2009.
- TAYLOR, N. L.; TAN, Y. F.; JACOBY, R. P.; MILLAR, A. H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v.72, n.3, p.367–78, 2009.

- THE PLANT LIST, **Version 1.1**, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>
Acesso em: 25 set. 2017.
- THILAKARATHNE, C. L.; TAUSZ-POSCH, S.; CANE, K.; NORTON, R. M.; FITZGERALD, G.J.; TAUSZ, M.; SENEWEERA, S. Intraspecific variation in leafgrowth of wheat (*Triticum aestivum*) under Australian Grain Free AirCO₂ Enrichment (AGFACE): Is it regulated through carbon and/or nitrogen supply? **Functional Plant Biology**, v.42, p. 299–308, 2015.
- THOMAS, H. Senescence, aging and death of the whole plant. **New Phytologist**. v.197, p.696–11, 2013.
- TIMM, S.; BAUWE, H. The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. **Plant Biology**, v. 15, p. 737–747, 2013.
- TSOU, C. C. et al. DIA-Umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics. **Nat. Methods**, v.12, p.258–264, 2015.
- UBEREGUI, E.; HALL, M.; LORENZO, O.; SCHRODER, W. P.; BALSERA, M. An *Arabidopsis* soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the Executer pathway in response to increased light conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 2067–2077, 2015.
- VAN HEERDEN, P.; SWANEPOEL, J.; KRÜGER, G. Modulation of photo-synthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO₂ assimilation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 124–136, 2007.
- VAN WIJK, K. J. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 501–508, 2001.
- VAN WIJK, K. J. Plastid proteomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 963–977, 2004.
- VELIKOVA, V.; GHIRARDO, A.; VANZO, E.; MERL, J.; HAUCK, S. M.; SCHNITZLER, J. Genetic manipulation of isoprene emissions in poplar plants remodels the chloroplast proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 2005–2018, 2014.
- VENABLE, J. D.; DONG, M. Q.; WOHLSCHLEGEL, J.; DILLIN, A.; YATES, J. R. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. **Nat. Methods**, v. 1, p. 39–45, 2004.
- VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista Do Bndes**, v. 14, n. 28, p. 235–276, 2007.

- VOSS, I.; SUNIL, B.; SCHEIBE, R.; RAGHAVENDRA, A. S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v.15, p. 713–722, 2013.
- WATANABE, C. K.; SATO, S.; YANAGISAWA, S.; UESONO, Y.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: Possible relationships with respiratory rates. **Plant and Cell Physiology**, v.185, 2013.
- WEI, H.; GOU, J.; YORDANOV, Y.; ZHANG, H.; THAKUR, R.; JONES, W.; BURTON, A. Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. **J. Plant Res.**, 126, p. 305-320, 2013.
- XIONG E, LI Z, ZHANG C, ZHANG J, LIU Y, PENG T, CHEN Z, ZHAO Q. A study of leaf-senescence genes in rice based on a combination of genomics, proteomics and bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 4, p. 1–35, 2021.
- ZHANG, D. Y., CHEN, G. Y., GONG, Z. Y., CHEN, J., YONG, Z. H., ZHU, J. G., XU, D. Q. Ribulose-1, 5-bisphosphate regeneration limitation in rice leaf photosynthetic acclimation to elevated CO₂. **Plant Science**, v.175, p. 348–355, 2008.
- ZHU P, ZHUANG Q, CIAIS P, WELP L, LI W, XIN Q. Elevated atmospheric CO₂ negatively impacts photosynthesis through radiative forcing and physiology-mediated climate feedback. **Geophysical Research Letters**, v. 44, p. 1956–1963, 2017.
- ZHU, D.; LUO, F.; ZOU, R.; LIU, J.; YAN, Y. Integrated physiological and chloroplast proteome analysis of wheat seedling leaves under salt and osmotic stresses. **Journal of Proteomics**, v.234, p.104097, 2021.

CAPÍTULO 2 - The *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome: seasonal variations in leaf development¹

Abstract

Chloroplast metabolism is very sensitive to environmental fluctuations and is intimately related to plant leaf development. Characterization of the chloroplast proteome dynamics can contribute to a better understanding on plant adaptation to different climate scenarios and leaf development processes. Herein, we carried out a discovery-driven analysis of the *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome during leaf maturation and throughout different seasons of the year. The chloroplast proteome from young leaves differed the most from all assessed samples. Most upregulated proteins identified in mature and young leaves were those related to catabolic-redox signaling and biogenesis processes, respectively. Seasonal dynamics revealed unique proteome features in the fall and spring periods. The most abundant chloroplast protein in humid (wet) seasons (spring and summer) was a small subunit of RuBisCO, while in the dry periods (fall and winter) the proteins that showed the most pronounced accumulation were associated with photo-oxidative damage, Calvin cycle, shikimate pathway, and detoxification. Our investigation of the chloroplast proteome dynamics during leaf development revealed significant alterations in relation to the maturation event. Our findings also suggest that transition seasons induced the most pronounced chloroplast proteome changes over the year. This study contributes to a more comprehensive understanding on the subcellular mechanisms that lead to plant leaf adaptation and ultimately gives more insights into *Eucalyptus grandis* phenology.

1. INTRODUCTION

Chloroplast is a subcellular compartment in which solar radiation is used to generate sugar compounds in a complex process named photosynthesis. It also hosts several other metabolic processes that are essential for plant survival and is composed of inner and outer membrane, stroma, thylakoidal membrane, and lumen [1]. Moreover, *Eucalyptus* leaves have a great amount of antioxidants, particularly flavonoids, which provide protection against ROS damage, oxidative stress and can increase stress tolerance [2]. Plastid genome encodes 120-130 proteins, however approximately 2000 proteins, are synthesized in the cytosol, and imported into the organelle through the

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista PLoS One 17 (9): e0265134, 2022. doi.org/10.1371/journal.pone.0265134

envelope membranes [3-4]. In *Eucalyptus grandis*, the chloroplast genome presents approximately 160 kb [5-6].

As chloroplasts are very sensitive to environmental fluctuations, dynamic proteome changes may represent a key factor for understanding their responses to abiotic stresses [7]. The most recent chloroplast proteomics studies have aimed to identify (1) changes induced by biotic and abiotic stresses [8-12], (2) mechanisms of remodeling and reprogramming of plant metabolism [13,14], (3) biogenesis and senescence [15-17], (4) chloroplast development [18,19], in addition to (5) novel techniques for increasing proteome coverage [20-22].

Chloroplast biogenesis starts from proplastids, which, upon exposure to light, turn into mature chloroplasts with functional electron transport carriers, membrane channel proteins, and stromal enzymes that are able to capture, assimilate, and storage carbon [23]. During senescence, they differentiate from gerontoplasts, which lead to leaf yellowing, necrosis, and death [24]. Thereby, plastid development is intimately related to the development of the whole plant at different stages [25]. The manipulation of several agronomic traits, e.g., photosynthetic rate, stomatal conductance, chlorophyll content, and PSII photochemical, has been reported to delay the senescence process and increase plant biomass, seed yield, seed protein composition, and tolerance to abiotic stresses [26-28].

Plants are sessile organisms, which means that they are subjected to seasonal climate alterations and adverse environmental conditions. Seasonal climate variations can drive plant growth and development, favoring a metabolic adaptation of the life cycle with changes in the environment [29]. Strong seasonal effects have been observed on the growth of perennial plants due to varying availability of water, light, nutrients, and temperature [30, 31]. In *Populus* species, for instance, seasonal phenology is largely related to changes in growth and development, such as bud flush in spring followed by vegetative growth in the summer; while during the fall, the trees present growth inhibition and bud formation, followed by leaf senescence, abscission, and cold acclimation before the winter season [32]. Regarding photosynthetic physiological changes, studies have revealed that the quantum efficiency seasonal pattern shows minimal values in the spring,

increasing during the summer, and reaching maximal values in the fall followed by a decrease in the winter [33,34].

Understanding functional and regulatory networks based on leaf development process and seasonal metabolic changes can provide valuable information for increasing plant productivity and learning the mechanisms that lead to plant adaptation. This is the first exploratory investigation on proteome changes during leaf development and seasonal variations in *Eucalyptus grandis* young plants on an organellar level. This research aimed to carry out an exploratory analysis of chloroplast alterations during leaf development and seasonal variations in the *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant cultivation and sampling

Eucalyptus grandis plants were planted at the “Horto Florestal” of the São Paulo State University (Jaboticabal – SP, Brazil) using a randomized block design experiment with 2 m x 3 m spacing. Fertilization and irrigation were carried out twice a month and three times a week, respectively. The region climate is defined as tropical and characterized by rainfalls concentrated in the summer and dry winter [35]. Agrometeorological data were collected daily at the UNESP environmental station (S1 Table).

For the leaf developmental assay, three biological replicates, comprising five randomly selected branches, were divided into three different regions (young, middle, and mature), according to the fluorescence data (FV/FM) and chlorophyll relative quantification (CCI), and used to assess proteome changes throughout development (S1A Fig). For the chloroplast proteome seasonal variation assay, four biological replicates, comprising forty leaves from the first until the fifth node, were assessed in all four seasons from August/2019 to August/2020 (S1B Fig).

2.2. Fluorescence measurement and chlorophyll relative quantification

Fluorescence analysis was performed using the fluorometer FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments) assessing the adaxial surface of leaves from different regions of the 15 branches. The fluorescence values obtained directly from the device were used to assess the potential quantum efficiency of photosystem II (FV/FM). Relative chlorophyll was quantified on CCM-200 equipment (Opti-Sciences), and the adaxial surface of leaves from different regions of the 15 branches was examined. The CCI values obtained directly from the device were used to assess relative chlorophyll quantification. Statistical analysis was performed according to the ANOVA test ($p < 0.05$), and Tukey's test was used for comparison among different leaves.

2.3. Chloroplast proteome extraction

Six grams of leaves were collected, fine sliced, and transferred to tubes containing 20 mL of chloroplast isolation buffer (CIB, CP-ISO-Sigma Aldrich). The leaf tissue was homogenized (Omni GLH Turrax) and filtered through a nylon membrane. The processed material was centrifuged, and the chloroplasts were isolated in an 80%/40% (1:2 v/v) Percoll density gradient. After washing, the chloroplast pellet was resuspended in a protein extraction buffer (Thiourea 2M; CHAPS; Tris-HCl 1M, pH 8; Glycerol 50%; Triton X-100; DTT 1M and Urea 8M) and the lysis of intact chloroplasts was carried out through 20 cycles of sonication. After centrifugation, the supernatant was precipitated in cold acetone for 16 hours at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the protein pellet obtained was solubilized in Tris buffer (125 mM Tris pH 6.8, 20% glycerol, 1% SDS, 0.1% DTT).

2.4. Total leaf proteome extraction

To assess the enrichment of the chloroplast subproteome in relation to the total leaf proteome, intact leaves were frozen in -80°C and grinded in Tris extraction buffer (125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol, 1% SDS, 0.1% DTT). Upon centrifugation at 4°C for 15 min, the supernatant was transferred to a clean tube and the proteins were precipitated in

cold acetone for 16 hours at -30 °C. Finally, the proteins were solubilized in Tris buffer before protein quantification assay.

2.5. Protein quantification assay and SDS-PAGE

Sample quantifications followed the Bradford method using a BSA curve as reference. Aliquots of 50 µg of proteins were separated for 1 hour by denaturing electrophoresis on a polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) to obtain a single band. The electrophoretic system was composed of a stacking gel (5%) and a separation gel (12.5%). The single protein band was excised from the gel and subjected to in-gel digestion.

2.6. Mass spectrometry analysis

Proteins were in-gel digested using trypsin at 1:10 proportion (trypsin:protein) [36]. To clean up the peptide samples, extracts were filtered in an acetate cellulose membrane (Spin-X, Corning) by centrifugation for 7 minutes. The flow-through was collected using a clean tube, concentrated, and then desalted with ZipTip Pipette Tips (Millipore) according to the manufacturer's protocol. The amount of 1 µg of extracted peptides was analyzed through liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer. Tryptic peptides were resuspended in H₂O containing 0.1% formic acid and separated in an EASY-nLC1000 chromatographic system (Thermo Fisher Scientific) for 95 minutes using a C18 nano-column under a constant flow of 400 nL/min and increasing concentrations of acetonitrile (7 to 30% over 70 min and then 70% in 25 min). The peptides were ionized through electrospray (3.5 kV) and the mass spectrometer (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific) was operated in data-dependent acquisition mode according to a top 20 acquisition method with dynamic exclusion time adjusted to five seconds. Full scans and MS/MS scans were acquired with resolutions equal to 70,000 and 35,000 FWHM (full width at half maximum), respectively. The MS/MS spectra were generated from HCD fragmentation (high-energy collision dissociation) of the precursor peptide ions isolated

under 35 eV collision energy. Mass spectrometric data are available via Proteome Xchange under identifier PXD029004.

2.7. Protein identification

The peptides and protein inferences were identified through stringent searches of experimental data against the protein database *Eucalyptus grandis* v.2.0 (<http://www.phytozome.net/>) on MaxQuant (v. 1.6.3.3) [37] based on dedicated search parameters: 20 ppm tolerance for precursor ions, oxidation of methionines and carbamidomethylation of cysteines – selected as dynamic and static modifications, respectively. Maximum missed cleavages of 2 and false-discovery rate adjusted to 1%. Relative abundance of the chloroplast proteins were quantified based on the label free-based approach (LFQ intensity). Relative abundance of total leaf proteins was obtained following the NSAF ("normalized spectral abundance factor") approach [38]. Mass spectrometry proteomics data are currently stored on the ProteomeXchange Consortium via PRIDE partner repository under dataset identifier PXD029004.

2.8. Statistical analysis and functional annotation

Data processing and statistical analysis were carried out on the Perseus software (v. 1.6.15.0) [39]. Firstly, all contaminants and reverse sequences were removed from data analysis. Subsequently, label-free quantification data (LFQ) were transformed into \log_2 scale, and a protein was considered a true hit if identified in at least two out of three replicates. Missing values imputation was carried out from the normal distribution curve from each biological replicate. The means of ANOVA test and Tukey comparison test ($p < 0.05$) were used in the comparative analyses. Multivariate analyses were carried out with differentially abundant proteins for both assays on the Perseus software. For PCA and hierarchical clustering, data were z-score normalized. Hierarchical clustering was performed using Euclidean distance and complete linkage.

Functional annotation of the differentially abundant proteins was carried out using the Blast2GO platform ($p < 0,05$) [40]. The ten most representative level-four biological

processes were considered in the functional characterization aiming to balance between a comprehensive overview and detailed information on the targeted biological process. Level four was chosen for including photosynthesis, an important process in the context of leaves and chloroplasts.

2.9. Subcellular prediction

In silico analysis was performed using predictors of subcellular location and chloroplast proteome repositories to assess and confirm the cellular location of the identified proteins. For this purpose, a protein was considered plastidial if identified by at least one of the subcellular prediction algorithms – ChloroP [41] and Predotar [42] – or by presenting at least one homologous protein in any of the databases used – PPDB [43] or AT-Chloro [44].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Before performing any description or comparative proteome analysis, we decided to verify the efficiency of the chloroplast enrichment strategy used herein. For this purpose, we compared the abundance levels, in terms of NSAF and LFQ intensities, of a well-known chloroplast proteoform Eucgr.C03525.1 (Ribulose-bisphosphate carboxylase – RBCL) against five potential mitochondrial contaminants commonly found in chloroplast extracts (Table 1). Quantitative analysis indicated that the chloroplast proteoform was enriched upon the extraction process, whereas the mitochondrial proteoforms presented a decrease in the abundance levels. These results indicated that our chloroplast extraction and enrichment strategy was effective in reducing the cross-contaminants protein abundance, as well as in the enrichment process of chloroplast-related proteins in the target samples.

Table 1. Enrichment analysis of chloroplast proteins in *Eucalyptus grandis* using a comparative approach between total leaf protein extract and chloroplast protein extract.

Description ^a	Loc ^b	NSAF ^c			LFQ intensity ^d				
		Leaf	Chloro	FD	Leaf	Chloro	FD		
Contaminants									
Malate dehydrogenase (Eucgr.F01209.1)	M	0.0036	0.0010	3.52	↓	3.E+08	2.E+07	15.39	↓
Isocitrate dehydrogenase (Eucgr.A01135.1)	M	0.0010	0.0005	2.27	↓	2.E+08	1.E+07	10.98	↓
Citrate synthase (Eucgr.G03412.1)	M	0.0004	0.0000	10.98	↓	3.E+07	2.E+06	16.04	↓
Fumarase (Eucgr.H01081.1)	M	0.0001	0.0000	3.65	↓	7.E+06	4.E+05	20.04	↓
Succinate dehydrogenase (Eucgr.F00243.1)	M	0.0002	0.0002	1.02	↓	2.E+06	2.E+06	1.13	↓
Positive control									
Ribulose-bisphosphate carboxylase-large (Eucgr.C03525.1)	C	0.0155	0.0276	1.78	↑	3.E+09	3.E+09	1.19	↑

Local: Localization, M: Mitochondria, C: Chloroplast, Leaf: Total leaf protein extract, Chloro: Chloroplast protein extract, FD: Fold-Change.

^a Functional Annotation and protein identifier according to the *E. grandis* v 2.0 annotation

^b Subcellular protein location

^c Relative protein expression by the NSAF approach

^d Relative protein expression by the LFQ intensity approach

3.1. Photosynthetic proteins comprise most of the *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome

Aiming to illustrate a general overview of the chloroplast proteome isolated from *Eucalyptus grandis* leaves, we compiled the identification datasets from both leaf development and seasonal experiments. The combined analysis resulted in a stringent, non-redundant dataset of 431 chloroplast proteins (S2 Table). Gene ontology analysis indicated that most of the isolated proteins were involved in the “organonitrogen compound metabolic process”, “organic substance biosynthetic process”, and “macromolecule metabolic process” (Fig 1A). Although these biological processes were the most prominent in terms of protein identifications, an MS1-based quantitative analysis indicated that the “photosynthesis process” represented 11% of the isolated chloroplast proteomes (Fig 1B). The fraction of “photosynthetic process” related to proteins becomes even more pronounced within the isolated proteome upon the analysis of the most abundant proteins identified in the entire experiment (Fig 1C). The RuBisCO small chain

(Eucgr.J01502.2.p) was the most abundant protein identified herein, showing approximately 4000 MS/MS counts. The proteins involved in the photosystem II structure were also highly abundant: two extrinsic proteins (PsbO-2 – Eucgr.I01025.1.p and PsbQ-2 – Eucgr.D00854.1.p) that form the oxygen-evolving complex (OEC) and a light-harvesting complex protein from the PSII (Eucgr.F04099.1.p) corresponding to 1500 to 3000 MS/MS counts (Fig 1C).

Regarding the suborganellar localization of the 431 chloroplast proteins, 137 proteins were present in the stroma compartment, whilst 135 were thylakoidal proteins. A total of 87 proteins were predicted *in silico* to be located in the chloroplast outer membrane, and 13 identifications were found to be part of the chloroplast inner membrane. Finally, 52 proteins were located in the chloroplast lumen and 7 proteins herein identified had been previously reported as part of the plastoglobule structure (Fig 1D).

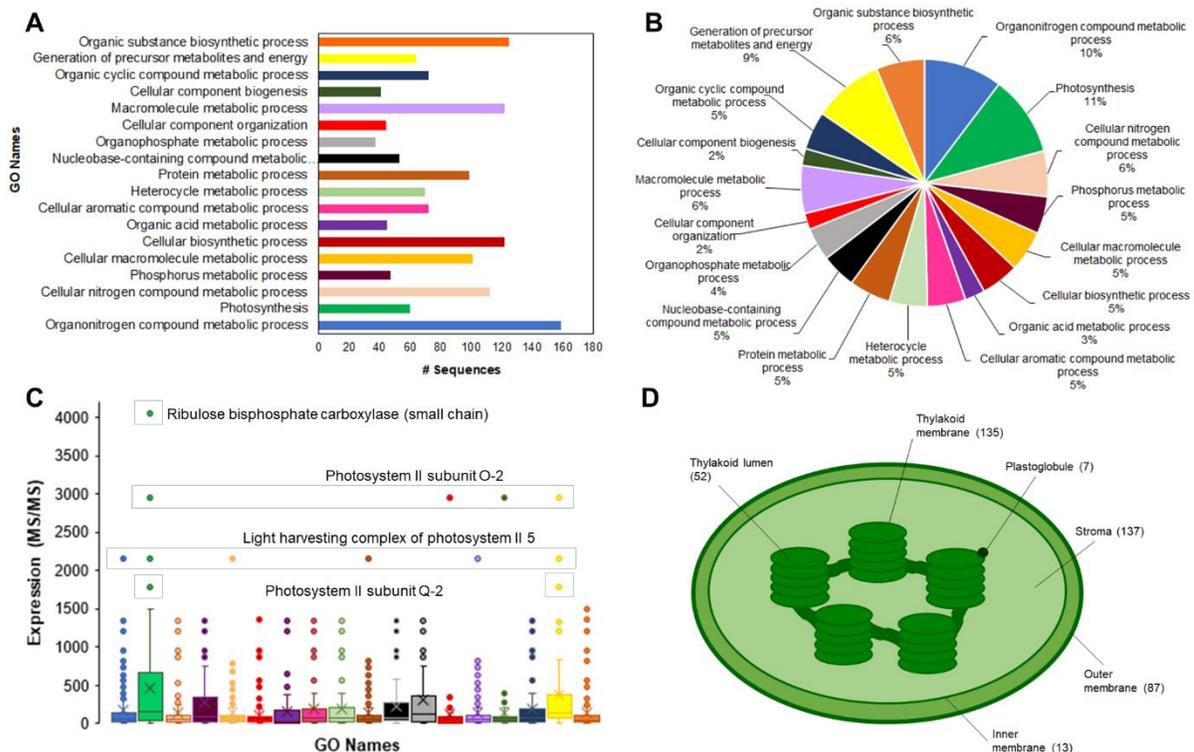


Fig 1. The *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome. Classification analysis, in terms of the number of identified proteins (A) and terms of the percentage of identified proteins (B), upon categorization using the “biological process” ontology; protein expression

analysis of the Gene Ontology terms (C) and number of protein identifications per chloroplast sub-cellular compartment (D).

3.2. Chloroplast proteome reflects the physiological status in developing leaves

Based on the varying FV/FM ratios and the differences observed from the relative chlorophyll quantitation analysis (S2 Fig), we isolated the chloroplast proteome from young, middle, and mature leaves. Quantitative data from the isolated proteins were used to demonstrate the changes within this subcellular structure throughout the leaf development process. Pairwise analysis indicated that 61 proteins were considered to be differentially abundant over the development process, with the young chloroplast proteome as the most dissimilar of the three different regions (Fig 2A). Such result is in accordance with physiological evidence highlighted in S1 Fig, as the young leaf tissue presented the most significant variations concerning middle and mature regions. A study on sugarcane leaves have also demonstrated that physiological parameters, such as chlorophyll content, nitrogen content, and RubisCO activity, were greater and more consistent between mature and transition tissues than in young regions [45].

Clustering analysis allowed to classify the differentially abundant proteins (DAP) in three distinctive groups: upregulated – 17 proteins with higher abundance over leaf development, downregulated – a set of 29 proteins with lower abundance along the studied process, and an undefined group, comprising 15 proteins with an unclear abundance pattern (Fig 2B).

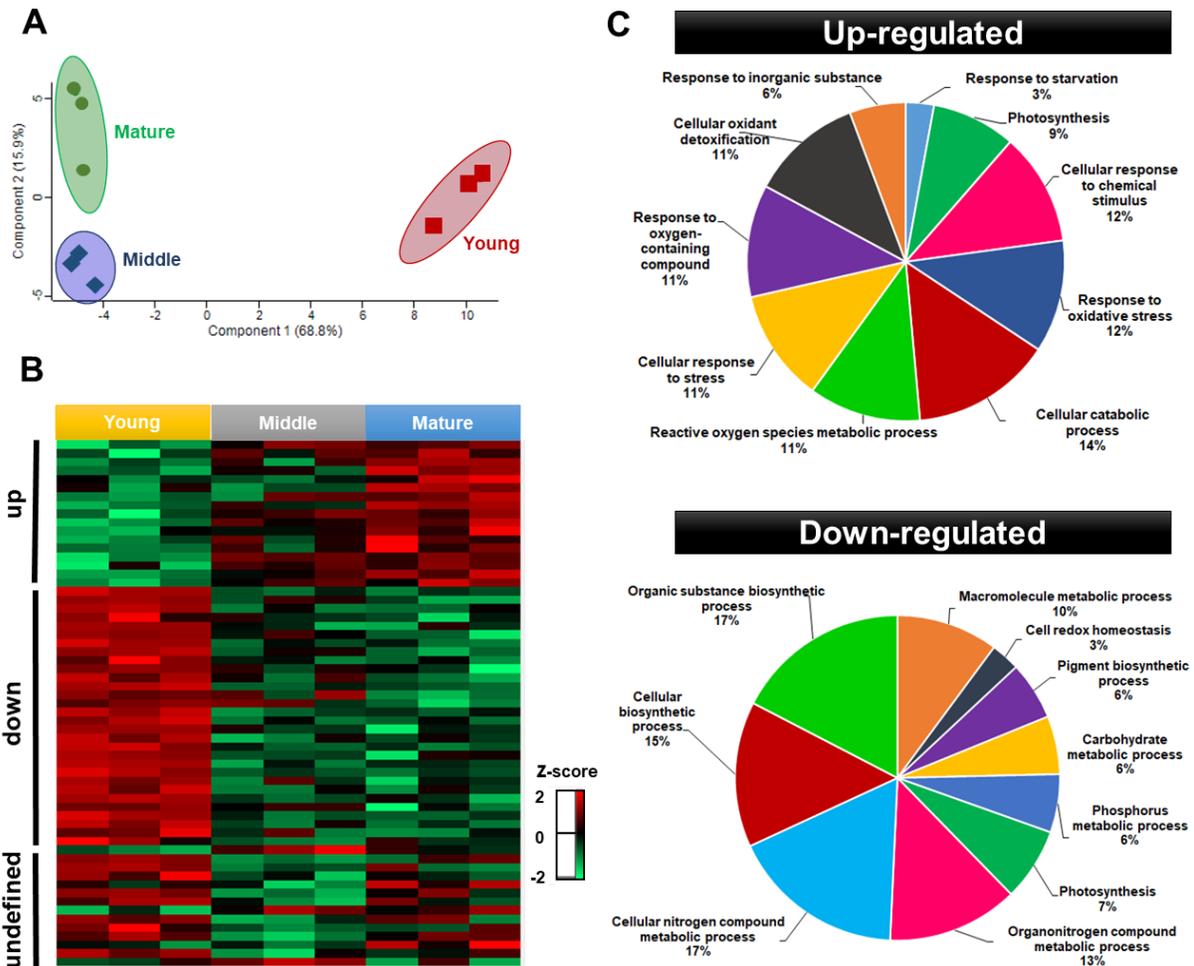


Fig 2. Multivariate analyses of the 61 differentially abundant chloroplast proteins isolated from young, middle, and mature *Eucalyptus grandis* leaves. Principal component analysis (A), clustering expression analysis (B) and functional categorization of the differentially-regulated chloroplast proteins between young (downregulated) and mature (upregulated) (C). The z-score indicates the distance of the data compared to the mean value.

Proteins with higher abundance throughout leaf development comprised those involved in the antioxidant metabolism (APX4, CAT2, tAPX, and SODFe2), stress responses/protection against lipid peroxidation (IDH-V, MPC1, and CHL), and photosynthesis (PSBQ-2, PSBO-2, GAPB, and FTRA2). Additionally, proteins involved in post-transcriptional modifications (CBR), regulation of PSII (TLP), amino acid metabolism (PYD2), photorespiration (GCT), carboxylation, and CO₂ diffusion (CA1) and plastoglobuli

development (FIB4) were also found to be upregulated. Conversely, ribosomal proteins (RPL13, PRPL1, RBD1, RBD2, and RPS1), proteins related to different biosynthetic processes (CRD1, PORA, THI1, PLP and IPP2, GSA1, LPD1, and FKB), folding, modification and transport (TPR, HSC70-2 and CLPC1, CURT1C, ENR1, LTP1, and LTP2), antioxidants and detoxification (TPX, AOR 1 and AOR2) and also photosynthesis proteins (RCA, RBCS1, RBCS2, and PSBS) were observed to lower abundance during leaf development. Proteins with unclear abundance pattern or those presenting a transient increase or decrease in the abundance levels were found to be involved in the photosynthetic process and electron transport chain (LHB1, PSAF, and THOL), in addition to folding, modification, and transport (HSP70, HSP21, ENR2, OEP24A, and RABE1B) and biosynthetic processes (NDPK1, MEE32, and PSAT). Proteins responsible for peptide degradation/repair of photosynthetic machinery (PREP2 and FtsH), oxidoreductase, and protease (CHLP and ASP) were also clustered within such heterogeneous group (S3 Table).

Aiming to highlight changes in the chloroplast metabolic processes along leaf development, up and downregulated proteins were cross-referenced to corresponding gene ontology terms. Functional categories revealed differences between the chloroplast protein groups (Fig 2C). Leaf development induced “cellular catabolic processes” in *Eucalyptus grandis* chloroplasts for being the most representative category within the upregulated group. Responses to stress, mainly to oxidative stress and cellular detoxification, were the most abundant functional category in upregulated throughout leaf development, based on the maturity of the photosynthetic apparatus and the higher photosynthesis rates in young leaves. In non-stressing conditions, mature leaves are expected to maintain cellular homeostasis with a dynamic balance between the light energy absorbed and energy consumption [46]. In mature leaves, generation of reactive oxygen species and changes in the redox state in the photosynthetic electron transport chain are important indicators of operational retrograde signals. The function of operational retrograde signaling differs from biogenic signaling as it focuses on the adjustments and cellular homeostasis of the chloroplast in response to different perturbations and developmental cues [47].

Conversely, the most representative functional class identified in the chloroplast downregulated protein group (*i.e.*, abundant in young leaves) were involved with cellular and organic biosynthetic processes, being the most representative in the “organic substance biosynthetic process” and the “nitrogen compound metabolic process”. These results are under the developmental stage of the young leaves used here. As plastids are intimately related to developmental and environmental signals, chloroplasts from young leaves were expected to reflect the biogenesis processes, which involves large-scale gene transcription followed by synthesis, importing, and assemblies of biogenesis proteins, such as those involved in plastid translation apparatus and enzymes in the synthesis of isoprenoids and tetrapyrroles [48]. In turn, in mature leaves, redox-related proteins comprised most of the differentially regulated proteins; the only category suggested by gene ontology analysis in young leaves for “cell redox homeostasis” comprised only 3% of all downregulated proteins. A study on the developmental dynamics of maize leaves also found upregulated genes that encode enzymes involved in diverse biosynthetic processes in young leaves. Similarly, in mature leaves, the upregulated genes predominant encoded Calvin cycle, redox regulation, and the light reactions of photosynthesis [48].

For better insights into the changing patterns of the up and downregulated proteins, we classified the chloroplast proteins into three expression trends, as shown in Fig 3. The early responsive proteins comprised the subset with a drastic change in the abundance level in middle leaf tissues, remaining at similar levels in both mature and young leaves. Conversely, late responsive proteins showed a drastic abundance change only in the contrasting leaf tissue (young or mature leaves). We considered as almost linear responsive the proteins without drastic changes throughout the leaf development process, but with a significant change between mature and young tissues.

Early upregulated proteins (*i.e.*, early increased abundance along leaf development) were identified as follows: Mitochondrial pyruvate carrier (MPC1), Isocitrate dehydrogenase V (IDH-V), Ferredoxin/thioredoxin reductase subunit A2 (FTRA2), Pyrimidine 2 (PYD2), Carbonic anhydrase 1 (CA1), and Glycine cleavage T-protein family (GCT). The most pronounced increase occurred in the Pyrimidine 2 (PYD2) protein from

young to middle tissues. This protein acts in beta-alanine biosynthesis and nitrogen recycling from pyrimidines to general nitrogen metabolism [49]. Late upregulated proteins (*i.e.*, late increased abundance along leaf development) were identified as follows: Photosystem II subunit Q-2, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit, and Chloroplast lipocalin (PSBQ-2, GAPB, CHL). The chloroplast lipocalin (CHL) presented the most pronounced increase in abundance. This protein acts in the protection of thylakoidal membrane lipids against reactive oxygen species, especially singlet oxygen, induced by high light and drought stresses occurring mainly at early stress stages in *Arabidopsis* [50]. It has also been reported that stress conditions cause the CHL to protect the thylakoid membrane by facilitating a sustained non-photochemical quenching (NPQ) in the LHCII in *Arabidopsis* [51]. A nearly increasing linear responsive pattern throughout leaf development was found in the following chloroplast proteins: Ascorbate peroxidase 4 (APX4), Catalase 2 (CAT2), Thylakoidal ascorbate peroxidase (tAPX), Fe superoxide dismutase 2 (SODFe2), Thylakoid lumen 18.3 kDa protein (TLP), Photosystem II subunit O-2 (PSBO-2), Chloroplast RNA binding (CBR) and Plastid-lipid associated protein PAP/fibrillin (FIB4).

Early downregulated proteins (*i.e.* early decreased abundance along leaf development) was the largest trend group according to our categorization (16 proteins) comprising proteins involved in the biosynthesis of fatty acids, isoprenoids, and amino acids (LPD1, IPP2, and PLP), chloroplast RNA binding proteins (RBD1, RBD2, and DAG), ribosomal proteins acting in the biosynthesis of thylakoid membrane and thylakoid curvature (RPS1 and CURT1C), transport, modification and import into the chloroplast (LTP2, TPR, and CLPC1), proteins associated with detoxification (TPX1, AOR1, and AOR2), binding cofactors (ENR1), and sucrose metabolism (ALD). A nearly linear downregulated responsive trend appeared in 10 protein sequences showed that act in carbon fixation RubisCO (RCA, RBCS1, and RBCS2), chlorophyll biosynthesis (CRD1, PORA, GSA1), transport and folding (LTP1 and HSC70-2), and structural ribosomal proteins (RPL13 and RPL1). In turn, only two proteins showed a late downregulated pattern, pfkB-like carbohydrate kinase family protein and Thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (FKB and THI1).

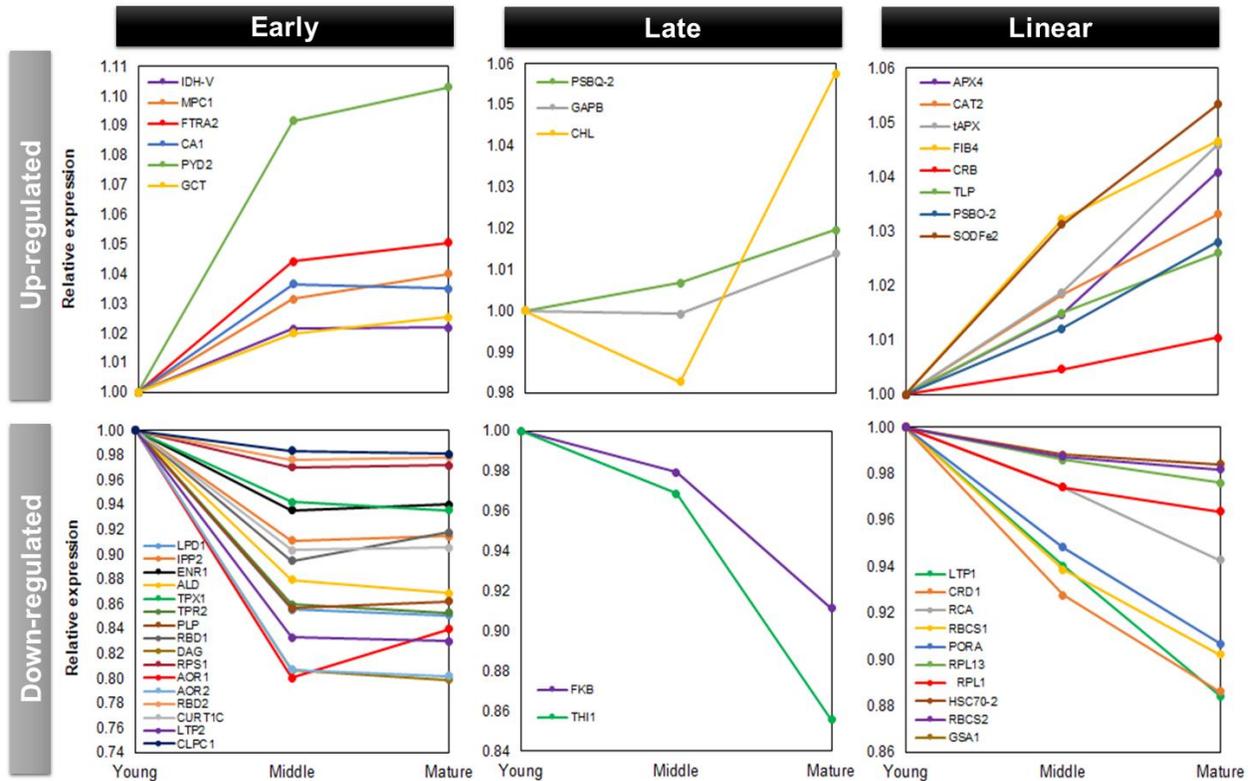


Fig 3. Expression trends of the differentially regulated chloroplast proteins. Upregulated proteins increased abundance throughout leaf development, while downregulated proteins decreased abundance during leaf development.

In conclusion, while investigating the chloroplast proteome changes over leaf development, we found significant alterations in the target proteome regarding the maturation process. Out of the 431 proteins isolated from the chloroplast material, 61 showed significant changes in the abundance throughout leaf development. There was no clear bias towards a unique change in the proteome composition; instead, we found distinct patterns of protein accumulation. In addition to pinpointing proteins with pronounced changes ranging the studied phenomenon, through a quantitative proteomics approach, we also specified the most particular biological and metabolic processes involving leaf development. However, as the proteome of any living entity is constantly changing, we also decided to investigate the undisturbed (*i.e.*, without inducing anthropogenic alterations due to external stimulus) sub-cellular proteome dynamics by

analyzing the seasonal changes occurring in the chloroplast proteome of *Eucalyptus grandis* plants cultivated at the State of Sao Paulo Forest Nursery between September 2019 and August 2020.

3.3. Transition seasons induce the most pronounced chloroplast proteome changes

Meteorological data revealed only small changes in the mean and maximum temperatures recorded throughout the study period, with the minimum diurnal temperature ranges observed during the summer season. Precipitation analysis revealed extremely dry fall and winter seasons and mean monthly rainfall of almost 10 mm over the summer (Fig 4A). Multivariate analysis of the *E. grandis* chloroplast proteomes suggested that both the fall and the spring-related samples presented the most dissimilar profiles of the studied seasons (Fig 4B). This is likely to be related to the phenological transitions commonly occurring in the species during such periods. In *Populus* species, phenology is largely related to seasonal changes in growth and development, such as bud flush in spring followed by vegetative growth in summer. In turn, during the fall, the trees presented growth cessation and bud formation, followed by leaf senescence and abscission, in addition to cold acclimation for the winter [32]. Our comparative proteome analysis revealed that 41 proteins were differentially regulated across the seasons of the year in *E. grandis* (S4 Table).

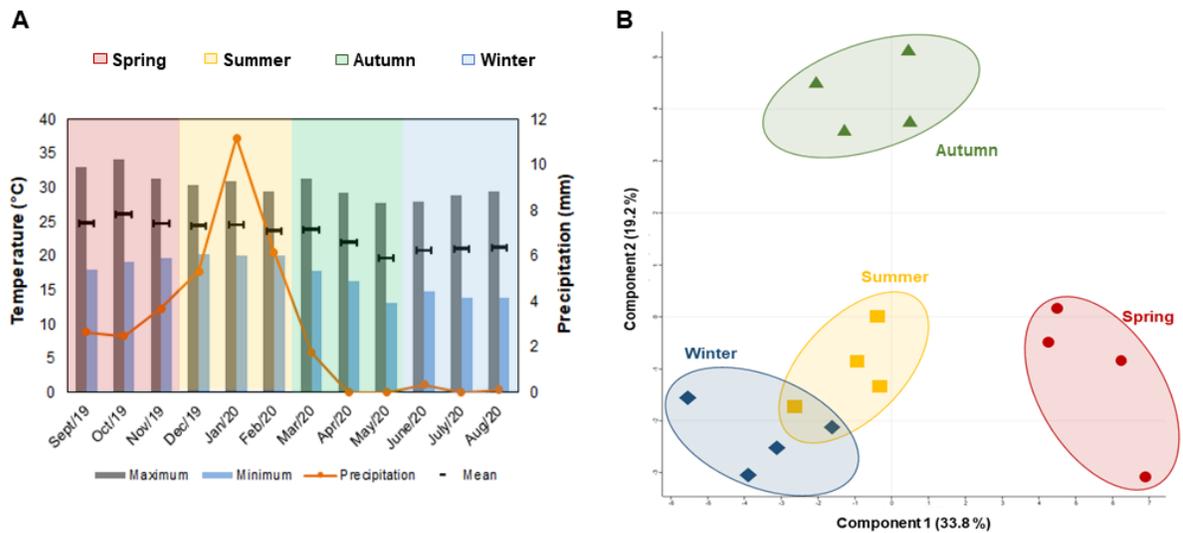


Fig 4. Meteorological data recorded at the Sao Paulo State University Forest Nursery during *Eucalyptus grandis* cultivation. Changes in temperature and rainfall rates between August 2019 and September 2020 (A) and multivariate analysis of the chloroplast proteome samples collected in the summer, fall, winter, and spring (B).

Hierarchical clustering analysis of DAP proteins suggests 5 different clusters according to their abundance patterns (Fig 5A). As the transition seasons (fall and spring) presented the most dissimilar profiles, it is worth highlighting the clusters that showed the most expressive differences in these specific periods.

Cluster 1 comprises 10 identifications with the lowest abundance values in the spring season. Proteins are related to light-harvesting complex, carbonyl detoxification, folding and modifications, carbohydrate biosynthesis, hydrolases, amino acid precursors, and ATP carriers. Conversely, Cluster 5 is composed of 6 proteins that showed higher abundance in the spring. Most of these identifications are associated with RuBisCO regulation to enhance photosynthetic capacity. Other identifications are responsible for lipid transport, protein modification, and translation (Fig 5B).

Other studies have revealed that quantum efficiency seasonal pattern has minimal values in the spring, increasing over the summer, reaching maximal values in the fall, and finally decreasing in the winter [33,34]. Such scenario is demonstrated in Cluster 1, with proteins LHB1 and LHCB4, which participate in the first steps of photosynthesis and are

very efficient in capturing light energy and transforming light into chemical energy [52]. Photosynthetic capacity in plants has also been reported to fluctuate with increased levels throughout leaf development, reaching its peak in the spring or early summer, and remaining stable or gradually declining over the summer [53-55]. Such pattern appears in Cluster 5, with RuBisCO-related proteins (RCA, RBCS1, and RBCS2). Leaf fluorescence and photosynthesis are expected to increase over the spring, especially in chlorophyll content. In the fall, these parameters are reduced when associated with leaf physiological properties such as leaf aging and senescence [56].

Cluster 4 presented the highest abundance for the fall season (Fig 5B), with 7 identifications associated with the following processes: PSII regulation, chlorophyll biosynthesis, translation, phospholipid transport; in addition to two histones that play an important role in regulating transcription and DNA repair and replication.

As previously described, trees undergo growth cessation and establish dormancy before the onset of winter over a transition season. Low temperatures were found to facilitate photoinhibition but not necessarily to cause it [57]; in addition, downregulation of Calvin-Benson cycle activity and gas exchange precedes the reorganization of photosynthetic apparatus in thylakoid membrane during the fall [58]. All these events are partially related to PSII regulation and corroborate our analysis, where we found an upregulated protein related to the regulation of PSII in Cluster 4. Furthermore, a plant epigenome is very responsive to changes in the environment, and variations in epigenetic silencing mechanisms are among the key factors that assist plants to adapt to different climate conditions [59]. DNA methylation and histone modifications associated with chromatin remodeling were reported to be the major changes occurring throughout dormancy season transitions [60]. The up-regulation of two histones in the fall occurring in Cluster 4 could be associated with these epigenetics events.

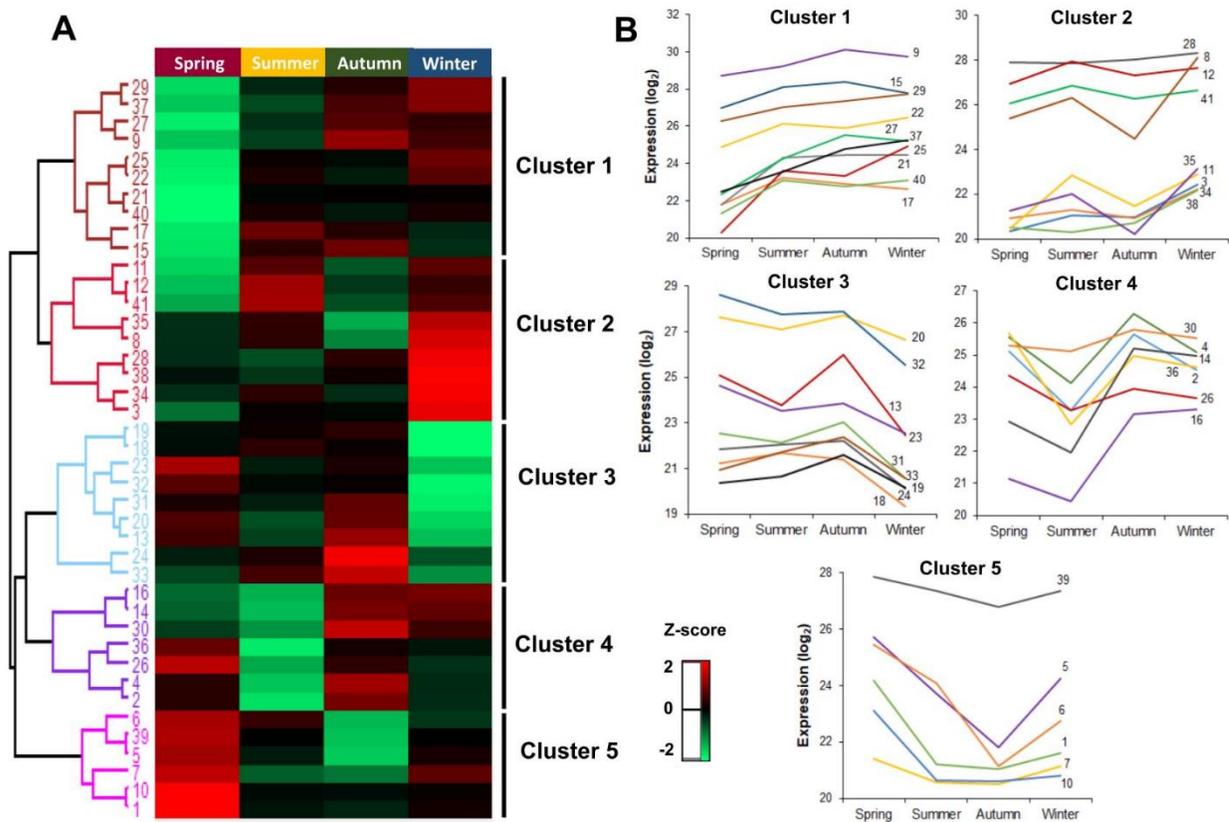


Fig 5. Differentially abundant proteins identified in *Eucalyptus grandis* chloroplasts in different seasons of the year. Hierarchical clustering (A) and protein abundance trends (B). The z-score indicates the distance of the data compared to the mean value.

Aiming to investigate which chloroplast proteins had the most pronounced synthesis in each season, we carried out a fold-change analysis, as shown in Fig 6. The red boxes indicate proteins with significant change equal or higher than 2-folds, blue boxes show significant change equal or higher than 5-folds, and white boxes point to proteins with change lower than 2-folds.

The most significant abundance increase had in both wet seasons (spring and summer) occurred in the RBCS1 protein. This is one of the small subunits of the RuBisCO enzyme, whose down-regulation has been observed in *Cistus albidus* [61] in drought periods, such as fall and winter. In *Lolium perenne*, the RbcS transcripts reached the highest levels over the spring, gradually decreasing between the summer and winter [62]. Similarly, all photosynthetic parameters measured in *Quercus coccinea* Muench (scarlet oak) showed a peak in the late summer, followed by a sharp decline in the fall [63].

ID	Accession	Description	Humid seasons		Dry seasons	
			Spring	Summer	Autumn	Winter
1	Eucgr.A00746.1	LTP1				
2	Eucgr.K03160.1	HTA12				
3	Eucgr.A02448.1	ENR1				
4	Eucgr.H04433.2	G-H2AX				
5	Eucgr.B02310.1	RCA				
6	Eucgr.B03013.1	RBCS1				
7	Eucgr.C01875.1	ENR2				
8	Eucgr.C02720.2	ASP5				
9	Eucgr.D00322.1	LHB1				
10	Eucgr.D00609.2	RPS5				
11	Eucgr.D02023.1	SCO1				
12	Eucgr.D02467.1	TKL				
13	Eucgr.E02606.1	PETA				
14	Eucgr.F01098.1	PORA				
15	Eucgr.G03060.1	LHCB4.3				
16	Eucgr.G03205.2	MPH1				
17	Eucgr.G03388.1	AAC2				
18	Eucgr.H00243.3	CLPD				
19	Eucgr.H01473.3	RRF				
20	Eucgr.H02991.1	APTF				
21	Eucgr.H04427.1	MEE32				
22	Eucgr.H04673.1	GAPC2				
23	Eucgr.I00441.1	PRPL29				
24	Eucgr.I00922.1	ZEP				
25	Eucgr.I01374.1	TPI				
26	Eucgr.I01643.1	RPL27				
27	Eucgr.I01808.1	AOR				
28	Eucgr.I02771.1	HSC70-2				
29	Eucgr.J00025.1	HSC70				
30	Eucgr.J00865.1	HCF136				
31	Eucgr.J02666.1	RPL14				
32	Eucgr.J02738.1	ATPB				
33	Eucgr.K00402.3	TPR				
34	Eucgr.K00732.1	PDIL2-2				
35	Eucgr.K01105.1	AHRI				
36	Eucgr.K01283.1	LTP2				
37	Eucgr.K01490.1	ENR3				
38	Eucgr.K01713.1	SFGH				
39	Eucgr.K02223.1	RBCS2				
40	Eucgr.K02765.1	HAD				
41	Eucgr.L02773.1	GCT				

<2-fold up-regulated
 2-fold up-regulated
 >5 fold up-regulated

Fig 6. Most differentially abundant chloroplast proteins isolated from *Eucalyptus grandis* leaves in studies seasons. Red boxes indicate proteins with significant change higher than 2-folds. Blue boxes indicate a significant change higher than 5-folds. White boxes indicate proteins with change lower than 2-folds.

In contrast, the most abundant proteins in both dry seasons (fall and winter) were MPH1, PORA, MEE32, TPI and AOR. MPH1 (proline-rich family protein) is a PSII-associated proline-rich protein that participates in the maintenance of normal PSII activity and protection of PSII from photooxidative damage under excessive light conditions [64]. The PORA protein (Protochlorophyllide oxidoreductase A) catalyzes the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide, subsequently producing chlorophyll a and b [65,66]. In addition to its role in chlorophyll biosynthesis, PORA can also exert a photoprotective action in the transition from dark to light [67], whereas the *Triose phosphate isomerase* enzyme (TPI) interconverts glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) in the Calvin cycle placed in chloroplasts. Up-regulation of TPI in the winter has been reported in experiments performed on tubers and *Eucalyptus grandis* bark [68,69].

The bifunctional enzyme MEE32 (dehydroquinase dehydratase, putative/shikimate dehydrogenase) is responsible for steps three and four of the shikimate pathways, catalyzing the dehydration of dehydroquinase to dehydroshikimate and the reversible reduction of dehydroshikimate to shikimate, respectively. Transgenic lines of tobacco with suppressed MEE32 gene displayed severe growth retardation and reduced content of aromatic amino acids and downstream products such as lignin and chlorogenic acid [70]. In *Eucalyptus camaldulensis*, it confers aluminum tolerance [71]. AOR protein (Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein) detoxify α , β -unsaturated carbonyls by reducing a highly electrophilic α , β -unsaturated bond using NAD(P)H [72,73]. It favors the detoxifying of stromal lipid peroxide-derived reactive carbonyls (RCs) produced under oxidative stress in chloroplasts [73], in addition to protecting dark respiration and supporting plant growth during the night [74].

In conclusion, our findings suggest that transition seasons (spring and fall) induce the most pronounced chloroplast proteome changes over the year. Out of the 431 proteins isolated in the chloroplast proteome, 41 showed significant abundance changes in different seasons. We also found distinct patterns of protein abundance among the seasons and were able to pinpoint the most abundant proteins in both the dry and wet periods of the year.

3.4. The importance of studying chloroplasts metabolic changes

Chloroplast biogenesis starts with proplastids that are exposed to light and then transformed into mature chloroplasts, which differentiate from gerontoplasts during senescence. Leaf senescence can be triggered by both external and internal factors. Internal factors include age, reproductive growth, redox metabolism, and hormone levels [75-77]. Leaf premature senescence can cause productivity losses due to lower assimilatory capacity [78]. Investigating the complex molecular network behind the developmental processes is essential for understanding the continual transition of functional and regulatory metabolic pathways occurring multiple times throughout the perennials plants lifespan. It is also quite relevant for agriculture because [79-80] it may open new possibilities to increase crop yield and establish strategies to maximize biomass production.

An inter-organellar transcriptomic analysis of leaf senescence in *Arabidopsis* indicated that the chloroplast transcriptome exhibited the most pronounced changes throughout the plant lifespan [81]. These findings indicate that plastid compartment could be an important target to plant breeding programs that intend to delay leaf senescence and maximize biomass production. Regarding chloroplast metabolism, a large number of differentially expressed transcripts were identified in mature to senescence stages, and the biological processes associated with biogenesis at the growth to maturation stage showed higher expression, suggesting robust transcriptional coordination during early leaf development and more dynamic biochemical transitions during the senescence process [81]. At the protein level, we also observed higher abundance in biogenesis processes in young leaf tissue; in contrast, we detected a larger number of differential abundance proteins for the young stage rather than in mature tissues. This indicates that protein-level dynamics diverges from transcriptome dynamics. The plants also presented a strong translational coordination during early leaf development, and such biochemical networks seem more active during early stages.

Plants are sessile organisms and need to develop survival strategies due to changing environmental conditions. Perennial plants have been described to be strongly

affected by seasonally varying availability of nutrients, water, light, and temperatures [30,31]. Seasonal climate variations can drive plant growth and development, favoring a metabolic adaptation of the life cycle with changes in the environment [29].

Our findings suggest that transition seasons (spring and fall) induce the most pronounced chloroplast proteome changes over the year in *Eucalyptus grandis* cultivated in tropical climate. For the fall, we found higher abundance of proteins related to epigenetic events that are very sensitive to external environment changes. Such epigenetic mechanisms are among the factors that help plants adapt to different environmental climates [59]. The combination of seasonal proteomics and epigenomics studies in natural environments can be important to reveal seasonal dynamics regulation at each level on plant responses plasticity.

Moreover, agrometeorological data revealed extremely dry autumn and winter seasons and mean monthly rainfall of almost 10 mm over the summer. Photosynthetic organisms have established several strategies to cope with dry environments, including short life cycle, enhanced water uptake and reduced water loss, osmotic adjustment, and antioxidant capacity [82]. *Eucalyptus* species have been reported to have developed a strategy involving lower photosynthetic activity during dry periods associated with resource reallocation through major changes in the gene expression of primary metabolism [83]. Identifying these metabolic changes allows to further investigate and understand the mechanisms behind plants adaptation and assist tree breeding programs.

4. CONCLUSIONS

Investigation of *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome provided a comprehensive resource for understanding different processes underlying age-dependent and seasonal variation in an organellar level. Our chloroplast extraction and enrichment strategies were effective at reducing cross-contaminants abundance and allowed a deep investigation of the changes occurring in the chloroplast proteome throughout leaf development and the seasons of the year. Distinct patterns of protein accumulation were detected in both assays. The *Eucalyptus grandis* chloroplast proteome seems to increase

metabolisms related to catabolic and redox processes as leaves age, while the accumulation of proteins involved in biosynthetic processes are downregulated. Most pronounced proteome changes occurred in the transition seasons of the year with a clear proteome bias towards photosynthesis over the wet seasons.

A deeper understanding on age-associated biological networks is important for developing strategies to maximize the biomass production. Furthermore, analyzing seasonal dynamics unravels the molecular mechanisms underlying metabolism plasticity and plant adaptation in spatiotemporal networks.

5. REFERENCES

1. van Wijk KJ. Plastid proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004;42(12):963–77.
2. Oberschelp GPJ, Guarnaschelli AB, Teson N, Harrand L, Podestá FE, Margarit E. Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: A metabolomic and proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020;154:316–27.
3. Keegstra K, Cline K. Protein import and routing systems of chloroplasts. *The Plant cell*. 1999;11(4):557–70.
4. Rossig C, Reinbothe C, Gray J, Valdes O, Von Wettstein D, Reinbothe S. Three proteins mediate import of transit sequence-less precursors into the inner envelope of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110:19962-67.
5. Myburg AA, Grattapaglia D, Tuskan GA, Hellsten U, Hayes RD, Grimwood J, et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*. 2014;510(7505):356–62.
6. Pinard D, Myburg AA, Mizrahi E. The plastid and mitochondrial genomes of *Eucalyptus grandis*. *BMC Genomics*. 2019;20:132.
7. Taylor NL, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics*. 2009; 72(3):367–78.
8. Tamburino R, Vitale M, Ruggiero A, Sassi M, Sannino L, Arena S, et al. Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC Plant Biology*. 2017;17(1):40.
9. Chang L, Wang L, Peng C, Tong Z, Wang D, Ding G, et al. The chloroplast proteome response to drought stress in cassava leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;142:351-62.

10. Megias E, Do Carmo LST, Nicolini C, Silva LP, Blawid R, Nagata T, Mehta A. Chloroplast Proteome of *Nicotiana benthamiana* Infected by Tomato Blistering Mosaic Virus. *The Protein Journal*. 2018;37(3):290-99.
11. Zhu D, Luo F, Zou R, Liu J, Yan Y. Integrated physiological and chloroplast proteome analysis of wheat seedling leaves under salt and osmotic stresses. *Journal of Proteomics*. 2021;234:104097.
12. Herrmann HA, Dyson BC, Miller MAE, Schwartz JM, Johnson GN. Metabolic flux from the chloroplast provides signals controlling photosynthetic acclimation to cold in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*. 2021;44(1):171-85.
13. Lande NV, Barua P, Gayen D, Kumar S, Varshney S, Sengupta S, Chakraborty S, Chakraborty N. Dehydration-induced alterations in chloroplast proteome and reprogramming of cellular metabolism in developing chickpea delineate interrelated adaptive responses. *Plant Physiol Biochem*. 2020;146:337-48.
14. Watson SJ, Sowden RG, Jarvis P. Abiotic stress-induced chloroplast proteome remodelling: a mechanistic overview. *Journal of Experimental Botany*. 2018; 69(11):2773-81.
15. Xiong E, Li Z, Zhang C, Zhang J, Liu Y, Peng T, Chen Z, Zhao Q. A study of leaf-senescence genes in rice based on a combination of genomics, proteomics and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*. 2021; 22(4):1–35.
16. Pipitone R, Eicke S, Pfister B, Glauser G, Falconet D, Uwizeye C, et al. A multifaceted analysis reveals two distinct phases of chloroplast biogenesis during de-etiolation in *Arabidopsis*. *eLife*. 2021;10:e62709.
17. Huokko T, Ni T, Dykes GF, Simpson DM, Brownridge P, Conradi FD, et al. Probing the biogenesis pathway and dynamics of thylakoid membranes. *Nature Communications*. 2021;12(1):3475.
18. Mielke K, Wagner R, Mishra LS, Demir F, Perrar A, Huesgen PF, Funk C. Abundance of metalloprotease FtsH12 modulates chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2021;72(9):3455-73.
19. Flannery SE, Hepworth C, Wood WHJ, Pastorelli F, Hunter CN, Dickman MJ, et al. Developmental acclimation of the thylakoid proteome to light intensity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2021; 105(1):223-44.
20. Bouchnak I, Brugière S, Moyet L, Le Gall S, Salvi D, Kuntz M, et al. Unraveling Hidden Components of the Chloroplast Envelope Proteome: Opportunities and Limits of Better MS Sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019;18(7):1285-06.
21. Lande NV, Barua P, Gayen D, Kumar S, Chakraborty S, Chakraborty N. Proteomic dissection of the chloroplast: Moving beyond photosynthesis. *Journal of Proteomics*. 2020; 212:103542.
22. Bayer RG, Stael S, Teige M. Chloroplast Isolation and Enrichment of Low-Abundance Proteins by Affinity Chromatography for Identification in Complex Proteomes. In:

- Posch A, editor. Proteomic Profiling: Methods and Protocols New York, NY: Springer US; 2021. p. 535–47.
23. Biswal B, Pandey J. Development of Chloroplast Biogenesis, Senescence, and Regulations. In: Handbook of photosynthesis. Third edition. CRC press; 2016. p. 77–93.
 24. Thomas H. Senescence, aging and death of the whole plant. *New Phytologist*. 2013;197: 696–11.
 25. Kutík J, Biswal B, Biswal UC, Raval MK. Chloroplast biogenesis: From proplastid to gerontoplast. *Photosynthetica*. 2004;42:350.
 26. Xue ZC, Gao HY, Zhao SJ. Effects of cadmium on the photosynthetic activity in mature and young leaves of soybean plants. *Environmental Science and Pollution Research* 2014;(21):4656-64.
 27. Mlinarić S, Dunić JA, Štolfa I, Cesar V, Lepeduš H. High irradiation and increased temperature induce different strategies for competent photosynthesis in young and mature fig leaves. *South African Journal of Botany*. 2016; (103):25-31.
 28. Guo Y, Gan SS. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(14):3901-13.
 29. Donohue K. Why ontogeny matters during adaptation: developmental niche construction and pleiotropy across the life cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution*. 2014; 68:32–47.
 30. Kimberley MO, Richardson B. Importance of seasonal growth patterns in modelling interactions between radiata pine and some common weed species, *Canadian Journal of Forest Research*. 2004;(34):184-94.
 31. Nazarova GG. Effects of seasonal, ontogenetic, and genetic factors on lifespan of male and female progeny of *Arvicola amphibious*. *Frontiers in Genetics*. 2013;(4):100.
 32. Dillen SY, Rood RSB. Ceulemans Growth and physiology. In: Genetics and Genomics of Populus. New York, NY: Springer New York; 2010. p. 39–63.
 33. Goethem D van, Potters G, De Smedt S, Gu L, Samson R. Seasonal, diurnal and vertical variation in photosynthetic parameters in *Phyllostachys humilis* bamboo plants. *Photosynth Res*. 2014;120:331–46.
 34. Yang HB, An SQ, Sun OJ, Shi ZM, She XS, Sun QY, Liu SR. Seasonal variation and correlation with environmental factors of photosynthesis and water use efficiency of *Juglans regia* and *Ziziphus jujuba*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008; 50:210–22.
 35. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves, JLM, Sparovek, G. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. 2013; 22(6):711–28.
 36. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2007;1(6):2856–60.

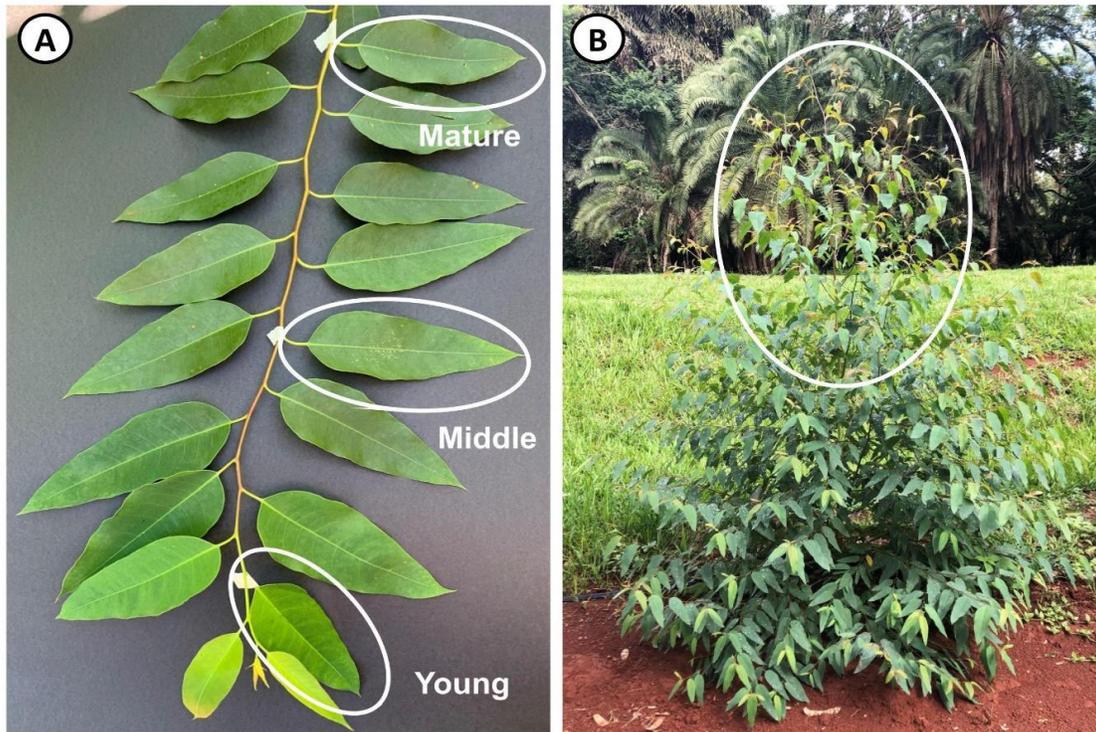
37. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protocols*. 2016a;(11):2301–19.
38. Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, Sato S, Zhu D, Conaway, RC, et al. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006;103(50):18928–33.
39. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*. 2016b;13:731–40.
40. Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, et al. High throughput functional annotation and data mining with the blast2go suite. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(10):3420–35.
41. Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*. 1999;8(5):978-84.
42. Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*. 2004;4(6):1581-90.
43. Sun Q, Zybaylov B, Majeran W, Friso G, Olinares PD, van Wijk KJ. PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Research*. 2008;37(2):969–74.
44. Salvi D, Bournais S, Moyet L, Bouchnak I, Kuntz M, Bruley C, Rolland N. AT_CHLORO: The First Step When Looking for Information About Subplastidial Localization of Proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2018; 1829:395-406.
45. Mattiello L, Riaño-Pachón DM, Martins MC, Da Cruz LP, Bassi D, Marchiori PE, et al. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. *BMC plant biology*, 2015; 15(300).
46. Biswal B, Joshi PN, Raval MK, Biswal UC. Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: Stress signaling and adaptation. *Current Science*. 2011;101:47–56.
47. Chan KX, Phua SY, Crisp P, Mcquinn R, Pogson BJ. Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annu Rev Plant Biol*. 2016; (67):25–53.
48. Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, et al. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics*. 2010; 42:1060–67.
49. Zrenner R, Riegler H, Marquard CR, Lange PR, Geserick C, Bartosz CE, et al. A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in *Arabidopsis*. *New phytologist*. 2009;183(1):117–32.
50. Levesque-Tremblay G, Havaux M, Ouellet F. The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *The Plant Journal*. 2009;60(4):691-702.

51. Malnoë A, Schultink A, Shahrabi S, Rumeau D, Havaux M, Niyogi KK. The Plastid Lipocalin LCNP Is Required for Sustained Photoprotective Energy Dissipation in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 2018; 30(1):196–208.
52. Cheng YC, Fleming GR. Dynamics of light harvesting in photosynthesis. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2009; 60:241-62.
53. Bauerle WL, R. Oren, D. A. Way, S. S. Qian, P. C. Stoy, P. E. Thornton. Pattern of photosynthetic capacity and the implications for carbon cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109: 8612–17.
54. Medvigy D, Jeong SJ, Clark KL, Skowronski NS, Schäfer KV. Effects of seasonal variation of photosynthetic capacity on the carbon fluxes of a temperate deciduous forest. *Journal of Geophysical Research – Biogeosciences*. 2013;118:1703–14.
55. Xu L, Baldocchi DD. Seasonal trends in photosynthetic parameters and stomatal conductance of blue oak (*Quercus douglasii*) under prolonged summer drought and high temperature. *Tree Physiology*. 2003;23:865–77.
56. Yang H, Yang X, Zhang Y, Heskell MA, Lu X, Munger JW, Sun S, Tang J. Chlorophyll fluorescence tracks seasonal variations of photosynthesis from leaf to canopy in a temperate forest. *Global Change Biology*. 2017; 23:2874-86.
57. Sello S, Meneghesso A, Alboresi A, Baldan B, Morosinotto T. Plant biodiversity and regulation of photosynthesis in the natural environment. *Planta*. 2019; 249:1217–28.
58. Chang CY, Unda F, Zubilewich A, Mansfield SD, Ensminger I. Sensitivity of cold acclimation to elevated autumn temperature in field-grown *Pinus strobus* seedlings. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:165.
59. Baulcombe DC, Dean C. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(9):a019471.
60. Howe GT, Horvath DP, Dharmawardhana P, Priest HD, Mockler TC, Strauss SH. Extensive transcriptome changes during natural onset and release of vegetative bud dormancy in *Populus*. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6:989.
61. Brossa R, Pintó-Marijuan M, Francisco R, López-Carbonell M, Chaves MM, Alegre L. Redox proteomics and physiological responses in *Cistus albidus* shrubs subjected to long-term summer drought followed by recovery. *Planta*. 2015;241(4):803-22.
62. Sathish P, Withana N, Biswas M, Bryant C, Templeton K, Al-Wahb M, et al. Transcriptome analysis reveals season-specific rbcS gene expression profiles in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Biotechnology Journal*. 2007; 5(1):146-61.
63. Burnett AC, Serbin SP, Lamour J, Anderson J, Davidson KJ, Yang D, Rogers A. Seasonal trends in photosynthesis and leaf traits in scarlet oak, *Tree Physiology*. 2021;41(8):1413–24.

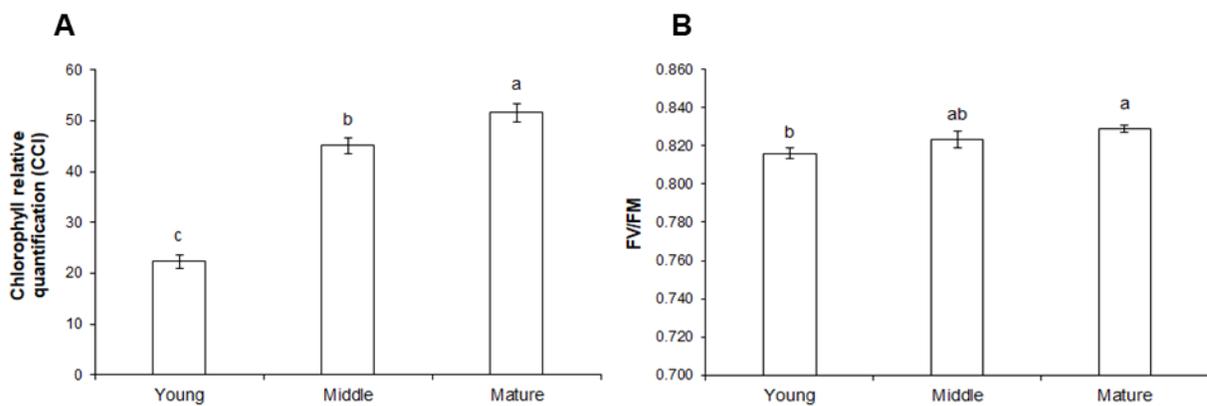
64. Liu J, Last RL. MPH1 is a thylakoid membrane protein involved in protecting photosystem II from photodamage in land plants. *Plant Signal Behav.* 2015;10(10):e1076602.
65. Buhr F, Bakkouri M, Valdez O, Pollmann S, Lebedev N, Reinbothe S, Reinbothe C. Photoprotective role of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105:12629–34.
66. Heyes DJ, Hunter CN. Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase. *Trends in Biochemical Sciences.* 2005;(30):642–649.
67. Paddock T, Lima D, Mason ME, Apel K, Armstrong GA. Arabidopsis light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) is essential for normal plant growth and development. *Plant Molecular Biology.* 2012; 78:447–60.
68. Budzinski IGF, Moon DH, Morosini JS, Lindén P, Bragatto J, Moritz T, et al. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. *BMC Plant Biology.* 2016; 16:149.
69. Jungsukcharoen J, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Cherdshewasart W, Sangvanich P. Proteome analysis of *Pueraria mirifica* tubers collected in different seasons. *Bioscience Biotechnology Biochemistry.* 2016;80(6):1070–108.
70. Ding L, Hofius D, Hajirezaei MR, Fernie AR, Börnke F, Sonnewald U. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany.* 2007;58(8):2053-67.
71. Tahara K, Nishiguchi M, Funke ES, Miyazawa S, Miyama T, Milkowski C. Dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenases involved in gallate biosynthesis of the aluminum-tolerant tree species *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta.* 2021; 253(3).
72. Mano J, Torii Y, Hayashi S, Takimoto K, Matsui K, Nakamura K, et al. The NADPH: quinone oxidoreductase P1- ζ -crystallin in Arabidopsis catalyzes the α,β -hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiology.* 2002;(43):1445–55.
73. Yamauchi Y, Hasegawa A, Mizutani M, Sugimoto Y. Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Letters.* 2012; 586(8):1208-13.
74. Takagi D, Ifuku K, Ikeda K, Inoue KI, Park P, Tamoi M, et al. Suppression of Chloroplastic Alkenal/One Oxidoreductase Represses the Carbon Catabolic Pathway in *Arabidopsis* Leaves during Night. *Plant Physiology.* 2016;170(4):2024-39.
75. Mayta ML, Hajirezaei MR, Carrillo N, Lodeyro AF. Leaf Senescence: The Chloroplast Connection Comes of Age. *Plants (Basel).* 2019 ;8(11):495.

76. Gan S. Mitotic and post-mitotic senescence in plants. *Science of Aging Knowledge Environment* [Internet]. 2003;2003(38):re7–re7
77. Jibrán R, Hunter D, Dijkwel P. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology*. 2013;82: 547–61.
78. Egli DB. Seed-fill duration and yield of grain crops. In: *Advances in Agronomy*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc. 2004;83:243–279.
79. Gregersen PL, Culetic A, Boschian L, Krupinska K. Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* 2013; 82:603–22.
80. Moschen S, Higgins J, Di Rienzo JA, Heinz RA, Paniego N, Fernández P. Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17:174.
81. Woo HR, Koo HJ, Kim J, Jeong H, Yang JO, Lee IH, et al. Programming of Plant Leaf Senescence with Temporal and Inter-Organellar Coordination of Transcriptome in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*. 2016; 171(1):452–67.
82. Zhang Q. Strategies for developing Green Super Rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104:16402–09.
83. Villar E, Klopp C, Noirot C. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in *Eucalyptus*. *BMC Genomics*. 2011;12: 538.

SUPPORTING INFORMATION



S1 Fig. *Eucalyptus grandis* sampling. Leaf developmental assay, branches were divided into 3 different regions (young, middle, and mature), according to the fluorescence data (FV/FM) and chlorophyll relative quantification (CCI) (A). Proteome seasonal variation assay, forty leaves were collected from the first until the fifth node in all four seasons (Spring, Summer, Fall and Winter) (B).



S2 Fig. *Eucalyptus grandis* leaf responses. Chlorophyll relative quantification (CCI) (A) and Quantum efficiency of photosystem II (FV/FM) (B). Leaves were isolated from young, middle, and mature regions as described in the Material and Methods section. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$).

S1 Table. Meteorological data recorded at the Sao Paulo State University Forest Nursery during *Eucalyptus grandis* cultivation.

S2 Table. *Eucalyptus grandis* non-redundant protein dataset.

S3 Table. Expression profile of the differentially regulated proteins identified in the *Eucalyptus grandis* chloroplasts during leaf development. Proteins were classified according to their abundance profile: “upregulated” - proteins with the highest abundance in mature leaves; “downregulated” – proteins with the lowest abundance in young leaves; “undefined” – proteins with undefined profile pattern.

S4 Table. Differentially abundant proteins according to the Tukey’s test ($p < 0.05$) in *Eucalyptus grandis* chloroplasts isolated in different seasons of the year classified per protein expression pattern.

CAPÍTULO 3 – Análise de fluxos metabólicos por proteômica quantitativa em espécies de *Eucalyptus* cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂

1. INTRODUÇÃO

A concentração atmosférica de CO₂ vem aumentando drasticamente desde a revolução industrial, e no ano de 2022, o observatório de Mauna Loa registrou a marca histórica de 419 ppm (NOAA, 2022), desafiando as florestas a crescerem e sobreviverem em ambientes cada vez mais adversos (MENEZES-SILVA et al., 2019). Os novos cenários climáticos propostos pelo IPCC indicam uma elevação na concentração de CO₂ de 700 a 1000 ppm para o ano de 2100, dependendo da política de mitigação adotada (IPCC, 2022). Espera-se que as florestas mitiguem parcialmente os efeitos dessa mudança (IPCC, 2018), pois aproximadamente 30% do CO₂ emitido pelo ser humano pode ser absorvido pela fotossíntese dos organismos vegetais (PUGH et al., 2019). Por isso é essencial entender a capacidade das florestas de sequestrar carbono e sobreviver nesses novos cenários de mudanças climáticas (ANDEREGG et al., 2020; CERNUSAK et al., 2019).

Este contexto pode ser benéfico para a maioria das espécies vegetais, especialmente para aquelas que empregam a via fotossintética C₃, como o eucalipto, que são capazes de acumular e estocar esqueletos de carbono em sua biomassa. Diversos trabalhos já mostraram que altas concentrações de CO₂ aumentam a fotossíntese e o acúmulo de biomassa de árvores e florestas (RODEN; BALL, 1996; DELUCIA et al., 1999; NORBY et al., 2005), porém esse aumento depende das condições do local, da idade das plantas e das espécies analisadas (ELLSWORTH et al., 2017; WANG et al., 2012).

Nos últimos anos, diversos estudos foram publicados a respeito do efeito da alta concentração de CO₂ no metabolismo das plantas (ABDELGAWAD et al., 2014; WATSON-LAZOWSKI et al., 2016). Já foi observado que as principais enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose aumentaram significativamente sua abundância em condições de elevado CO₂, sugerindo uma alteração no metabolismo deste

carboidrato (GESCH et al., 2002; AOKI et al., 2003). O mesmo ocorreu com genes envolvidos no ciclo celular e parede celular que funcionam na tolerância ao estresse (AINSWORTH et al., 2006; WEI et al., 2013). Além disso, vários genes associados aos fotossistemas I e II aumentaram sua abundância quando as plantas foram expostas a ambientes com alta concentração de CO₂, o que pode estar correlacionado com o aumento da taxa de fotossíntese nesses organismos (GAMAGE et al., 2018).

O dióxido de carbono é assimilado no ciclo de Calvin-Benson (CB). Devido ao papel central no metabolismo energético da planta, genes relacionados ao CB têm sido atualmente selecionados como alvos de programas de engenharia genética com o objetivo de aumentar a produtividade e desenvolver cultivares melhorados geneticamente a esse novo cenário (DRIEVER et al., 2017; FOYER et al., 2017; NUCCIO et al., 2017; SIMKIN et al., 2017). No entanto, um aumento no ciclo CB não leva necessariamente a um aumento no crescimento da planta, pois isso pode ser dificultado por vários fatores limitantes que afetam sistematicamente o seu desempenho.

Conhecer o crescimento das plantas nesse novo cenário, bem como, identificar os seus gargalos metabólicos podem contribuir para melhor compreensão das mudanças no comportamento celular e bioquímico das espécies vegetais, permitindo a incorporação dos resultados em programas de melhoramento genético para obtenção de cultivares adaptados a essa nova realidade ambiental. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento das plantas através de análises fenotípicas e realizar uma análise exploratória de fluxos metabólicos no proteoma foliar de espécies de *Eucalyptus* cultivadas em condições controladas de CO₂.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar diferenças no metabolismo de carbono, por meio de uma abordagem proteômica exploratória, de diferentes espécies de *Eucalyptus* cultivadas em alta concentração de CO₂.

2.2. Específicos

- Investigar o comportamento de diferentes espécies de *Eucalyptus* mediante à alta concentração de CO₂ utilizando parâmetros fenotípicos e determinar qual concentração induz a maior resposta diferencial nessas espécies;
- Analisar a variação na abundância das enzimas do ciclo de Calvin-Benson em plantas de *Eucalyptus* cultivadas em elevada concentração de CO₂ utilizando abordagens proteômicas dependente de dados (DDA) e independente de dados (DIA);
- Identificar variações em fluxos metabólicos relacionados ao metabolismo do carbono entre as espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises Fenotípicas

3.1.1. Cultivo material vegetal e tratamentos de CO₂

Plantas jovens com 3 meses de idade das espécies *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus urophylla* foram cultivadas em vasos de 10 L contendo substrato florestal por 90 dias. As mudas foram regadas todos os dias e o manejo das plantas realizado de acordo com observações regulares do crescimento e da saúde das plantas. Em seguida, as plantas foram transferidas para as câmaras de crescimento durante 30 dias, com as seguintes condições: 12 h de fotoperíodo, 40% de umidade, 300 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz e 28 °C de temperatura. Os tratamentos com dióxido de carbono foram ajustados de acordo com os cenários do IPCC: 420 ppm (controle), 550 ppm e 680 ppm (tratamentos). Foram utilizadas 10 repetições biológicas por espécie sendo cada repetição constituída por 1 planta.

3.1.2. Índice de Crescimento Caulinar

Foi utilizado um paquímetro digital para medir o diâmetro do caule e uma régua para mensurar a altura após o tratamento com CO₂. Posteriormente, esses dados foram multiplicados para gerar um parâmetro de crescimento caulinar, intitulado de “índice de crescimento caulinar”, o qual foi utilizado nas comparações intra e interespecíficas.

3.1.3. Área Foliar

As folhas foram coletadas e sua área foi medida a partir de um registro fotográfico em esteira do tipo LI-3100C AREA METER.

3.1.4. Abertura Estomática

Foram produzidas lâminas de impressão da face abaxial das folhas de cada planta, em seguida foi feito o registro fotográfico de cinco estômatos por folha, totalizando 50 estômatos por espécie e tratamento em microscópio Leica DM 1000 LED. Foram medidas a largura e o comprimento de cada estômato por meio do programa Image J e sua razão foi calculada.

3.1.5. Análise Estatística

Após processamento dos dados, foi verificada a normalidade dos resíduos e a homocedasticidade das variâncias para determinar se os dados teriam distribuição normal. Para os parâmetros índice crescimento caulinar e área foliar foi realizado um ANOVA e teste de separação de médias de Tukey ($p < 0,05$), já para abertura estomática foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para determinar diferenças estatísticas entre os tratamentos de CO₂ em cada espécie. Foi realizada uma análise de PCA para verificar a distribuição dos dados entre os tratamentos. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico R (RSTUDIO, 2015).

3.2. Análise do Proteoma - Data-dependent acquisition (DDA)

3.2.1. Material vegetal e tratamentos com CO₂

Plantas jovens com 3 meses de idade das espécies *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* (selecionadas dentre as 6 espécies de eucalipto da análise fenotípica) foram cultivadas em vasos de 10 L contendo substrato florestal em casa de vegetação por 90 dias. As mudas foram regadas todos os dias e o manejo das plantas realizado de acordo com observações regulares do crescimento e da saúde das plantas. Em seguida, as plantas foram transferidas para as câmaras de crescimento durante 30 dias, com as seguintes condições: 12 h de fotoperíodo, 40% de umidade, 300 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz e 28°C de temperatura. Os tratamentos com dióxido de carbono foram ajustados de acordo com os cenários do IPCC: 420 ppm (controle) e 680 ppm (tratamento). Foram utilizadas três repetições biológicas por espécie, sendo cada repetição constituída por 4 plantas.

3.2.2. Extração de proteínas foliares totais

Uma alíquota de 1 g de folhas foi coletada, congelada em nitrogênio líquido e macerada. Foi adicionado tampão de extração (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM sacarose, 100 mM KCl, pH 8,0, 1% beta-mercaptoetanol) e as amostras ficaram agitando por 10 min no gelo. Em seguida, foi adicionado fenol equilibrado e os extratos foram acondicionadas por mais 10 min em temperatura ambiente. Os restos de tecidos vegetais foram removidos por centrifugação a 4100 g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado um volume de 4x de solução precipitante (0,1 M acetato de amônio em metanol) para precipitação das proteínas. Finalmente, as proteínas foram solubilizadas em um pequeno volume do tampão Tris (125 mM de Tris, pH 6,8, 20% de glicerol, 1% de SDS, 0,1% de DTT). A quantificação dos extratos protéicos foi realizada no equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific), usando a proteína BSA para obtenção da reta de calibração.

3.2.3. Análise por espectrometria de massas

As proteínas foram digeridas em solução. Para isso, alíquotas de 50 µg foram precipitadas, ressuspendidas em 25 mM de bicarbonato de amônio e aquecidas a 70 °C por 10 min. Para a etapa de redução, foi adicionado DTT e as amostras foram incubadas à 56 °C por 20 min. Posteriormente, foi adicionado IAA e as amostras permaneceram em temperatura ambiente e no escuro por 20 min. A digestão ocorreu overnight a 37 °C com a enzima tripsina (Trypsin Gold, Promega) em uma proporção 1:10. Após a digestão, as amostras foram concentradas e dessalinizadas utilizando ZipTip pipette tips (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos trípticos foram quantificados usando-se o equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific). Foram realizadas 2 injeções de 1 µg cada das amostras peptídicas em cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massa. Os peptídeos trípticos foram ressuspendidos em H₂O contendo 0,1 % ácido fórmico e separados em um sistema cromatográfico EASY-nLC1000 (Thermo Fisher Scientific) por 95 minutos usando uma nano-coluna C18 (15 cm, 3 µm, 100 Å) sob fluxo constante de 400 nL e concentração crescente de acetonitrila (7 a 30% por 70 min e se manteve a 70% por 25 min). A ionização dos peptídeos no espectrômetro de massa (Q-Exactive - Thermo Fisher Scientific) foi realizada por electrospray e o espectrômetro foi operado no modo de aquisição dependente de dados em um top 20 e tempo de exclusão dinâmica de 5 s. Espectros do tipo Full scan e MS/MS foram adquiridos com resoluções iguais a 70.000 e 35.000 FWHM (full width at Half maximum), respectivamente. Os espectros MS/MS foram adquiridos após a fragmentação por HCD (dissociação de colisão de alta energia) dos íons peptídeos precursores isolados sob energia de colisão de 35 eV.

3.2.4. Identificação de proteínas

A identificação de peptídeos e inferência de proteínas foram realizadas através de buscas rigorosas de dados experimentais contra o banco de dados de proteínas *Eucalyptus grandis* v.2.0 disponível na plataforma phytozome (<http://www.phytozome.net/>) no software MaxQuant (TYANOVA et al., 2016a) (v. 1.6.3.3),

usando parâmetros de pesquisa dedicados: tolerância de 30 ppm para íons precursores, oxidação de metioninas e carbamidometilação de cisteínas foram selecionados como modificações dinâmicas e estáticas, respectivamente. Máximo de clivagens perdidas de 2 e taxa de falsos positivos ajustada para 1%. A quantificação relativa das proteínas foi realizada usando a abordagem livre de marcação (LFQ intensity).

3.2.5. Processamento de dados e análise estatística

Primeiramente, a qualidade dos dados foi analisada com o algoritmo proteiNorm (GRAW et al., 2020). Para isso, a base de dados proteinGroups.txt extraída do programa MaxQuant foi adicionada ao algoritmo, as repetições biológicas foram classificadas em grupos e uma proteína só foi considerada na análise se apresentou no mínimo 2 valores válidos em pelo menos 1 tratamento. Após a análise de qualidade, os dados foram normalizados pelo método de Cyclic Loess que foi a estratégia de normalização que apresentou menor variação e maior correlação intragrupo entre todas as estratégias analisadas. A nova base de dados normalizados foi exportada e em seguida, importada para o software Perseus (TYANOVA et al., 2016b). Os dados de quantificação relativa normalizados foram transformados em log (2) e o tratamento dos valores ausentes foi realizado a partir da curva de distribuição normal de cada repetição biológica. Foi realizado um teste t ($p < 0,05$) entre os tratamentos com CO₂ (420 ppm x 680 ppm) para cada espécie de *Eucalyptus* individualmente. Uma identificação só foi considerada diferencialmente abundante se foi significativa estatisticamente e apresentou um fold-change maior ou igual a 2.

As proteínas relacionadas aos metabolismos antioxidante, ciclo do ácido cítrico (TCA), ciclo de Calvin-Benson e biossíntese de ácidos graxos, amido e sacarose foram selecionadas manualmente. Para estas, foi realizado um teste t ($p < 0,05$) entre os tratamentos com CO₂ (420 ppm x 680 ppm) para cada espécie de *Eucalyptus* individualmente na plataforma R Studio (R STUDIO, 2015). A análise estatística foi realizada a nível de enzima, onde foi considerada a soma das proteoformas com a mesma função.

3.2.6. Análise funcional, predição subcelular e diagrama de Venn

A anotação funcional das proteínas identificadas foi realizada na plataforma EGGNOG (<http://eggnog-mapper.embl.de/>) (CANTALAPIEDRA et al., 2021) utilizando o grupo *Viridiplantae*. A análise de predição subcelular *in silico* foi realizada utilizando o algoritmo MultiLoc2-Highres na plataforma MULTILOC 2 (<https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/multiloc2/webloc.cgi>) (BLUM et al., 2009) onde são preditas dez localizações sub-celulares diferentes. Os diagramas de Venn foram gerados na plataforma da Universidade de Gent (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) com as proteínas diferencialmente abundantes para cada espécie.

3.3. Análise do Proteoma: Data-independente acquisition (DIA)

3.3.1. Processamento de amostras

Foram utilizados os mesmos tratamentos de CO₂ como descrito anteriormente e as proteínas foliares foram extraídas com extração fenólica como descrito no tópico 3.2.2. Em seguida, as amostras foram concentradas e enviadas em gelo seco para o laboratório do Dr. Michael MacCoss (University of Washington - Seattle). Para solubilização dos extratos protéicos, foi adicionado sample buffer contendo 50 mM TEAB e 2% SDS. Em seguida, o material foi sonicado por 30 minutos e agitado por mais 30 minutos à 37 °C até completa solubilização. As amostras foram quantificadas pelo método de BCA utilizando uma curva padrão de BSA.

Uma alíquota de 50 µg de proteína foi utilizada para digestão. Foram adicionadas 800 ng de enolase e 0,5 µl de benzonase às amostras. Em seguida, os extratos proteicos foram reduzidos com 20 mM de DTT e incubados à 95°C por 10 min. Para a etapa de alquilação, foi adicionado 40 mM de IAA e as amostras ficaram incubadas em temperatura ambiente no escuro durante 30 min. As amostras foram acidificadas com 1,2% de ácido fosfórico e foi adicionado 350 µl de tampão S-TRAP (90% Metanol em

100mM TEAB). As amostras foram filtradas e lavadas com Metanol/Clorofórmio (1:1) por 3 vezes na coluna S-TRAP. Depois, foi adicionada tripsina (1:10) e o material foi incubado à 47°C por 1h para a digestão. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em novo tubo. A primeira eluição foi feita com 50mM TEAB para os peptídeos hidrofílicos e a segunda foi realizada com 50% ACN contendo 0,2% ácido fórmico para os peptídeos hidrofóbicos. As duas frações foram coletadas no mesmo tubo. Foram utilizadas 4 repetições biológicas por tratamento.

3.3.2. Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram ressuspensos em H₂O contendo 0,1 % ácido fórmico e separados em um sistema cromatográfico EASY-nLC1000 acoplado a um espectrômetro de massas Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific). A coluna analítica do tipo picofrit com 75 µm de diâmetro interno foi empacotada com resina ReproSil-Pur C18 de 3 µm (Dr. Maisch). Já a coluna trap foi feita a partir de capilares de sílica fundida com 150 µm de diâmetro interno com Kasil em uma das extremidades e empacotada com a mesma resina C18. O solvente A foi composto por 0,1% ácido fórmico em água, enquanto o solvente B foi composto por 0,1 % ácido fórmico em ACN a 98%. Para cada injeção, 3 µl de amostra foram carregadas e eluídas usando um gradiente de 90 minutos de 5 a 35% B, seguido por um gradiente de lavagem de 40 min.

Foram criadas bibliotecas cromatográficas para cada espécie estudada nesse trabalho conforme descrito em Searle et al. (2018). Para isso, foram feitas 6 injeções para aquisição de 6 bibliotecas com espectros DIA de 4 m/z. As janelas de isolamento dos precursores de 4 m/z foram adquiridas com resolução de 30.000, AGC target de 1e6, Max IT de 55 ms e utilizando sobreposição de faixas de massa estreita para cada injeção (400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900 e 900-1000 m/z). Dois espectros precursores, um de amplo espectro (400–1600 m/z) com resolução de 60.000 e um de espectro estreito (correspondente a cada intervalo) com AGC target de 3e6 e Max IT de 100 ms foram intercalados a cada 18 espectros MS/MS.

Para as amostras quantitativas, o equipamento foi configurado para adquirir espectros DIA de 25×24 m/z. As janelas de isolamento do precursor de 24 m/z foram adquiridas com resolução de 30.000, AGC target de $1e6$, Max IT de 55 ms utilizando um padrão de janela sobreposta de 388,43 a 1012,70 m/z. Os espectros precursores (385–1015 m/z com resolução de 30.000, AGC target de $3e6$, Max IT 100 ms) foram intercalados a cada 10 espectros do tipo MS/MS. Todos os espectros DIA foram adquiridos com energia de colisão de 27 e carga +2. Os arquivos RAWs foram convertidos para o formato mzML e deconvoluídos no software MSConvert (v. 3.0.21312).

3.3.3. Processamento de dados

Primeiramente, foi criada uma biblioteca espectral na plataforma Prosit (<https://www.proteomicsdb.org/prosit/>) a partir do arquivo fasta da espécie *E. grandis*. Para isso, o arquivo fasta foi convertido em csv no algoritmo EnciclopeDIA (Searle et al, 2018) com os seguintes parâmetros: NCE: 34, carga: +3 e máximo de clivagens perdidas de 1. A biblioteca espectral foi convertida em uma biblioteca DLIB, que foi utilizada como banco de dados para fazer as buscas dos arquivos RAW das bibliotecas cromatográficas que geraram bibliotecas denominadas ELIB. Foram criadas bibliotecas ELIB individuais para cada espécie do experimento, que por sua vez, foram utilizadas para fazer as buscas das amostras quantitativas. Os parâmetros de busca da ferramenta EncyclopeDIA foram ajustados para: 10 ppm de tolerância para íons precursor e fragmento, fragmentação HCD considerando íons B e Y e digestão com enzima tripsina. O algoritmo de busca utilizado foi o Percolator versão 3.1 (Figura 1).

Os dados foram importados para o software Skyline (Pino et al., 2020), onde foram removidos todos os peptídeos que apresentarem menos de três transições. Além disso, os dados foram normalizados pela Total Ion Current (TIC). Foi realizada uma comparação entre os tratamentos com o teste de “Tukey’s Median polish” com p-value ajustado para 0,05 no nível de espectro MS2.

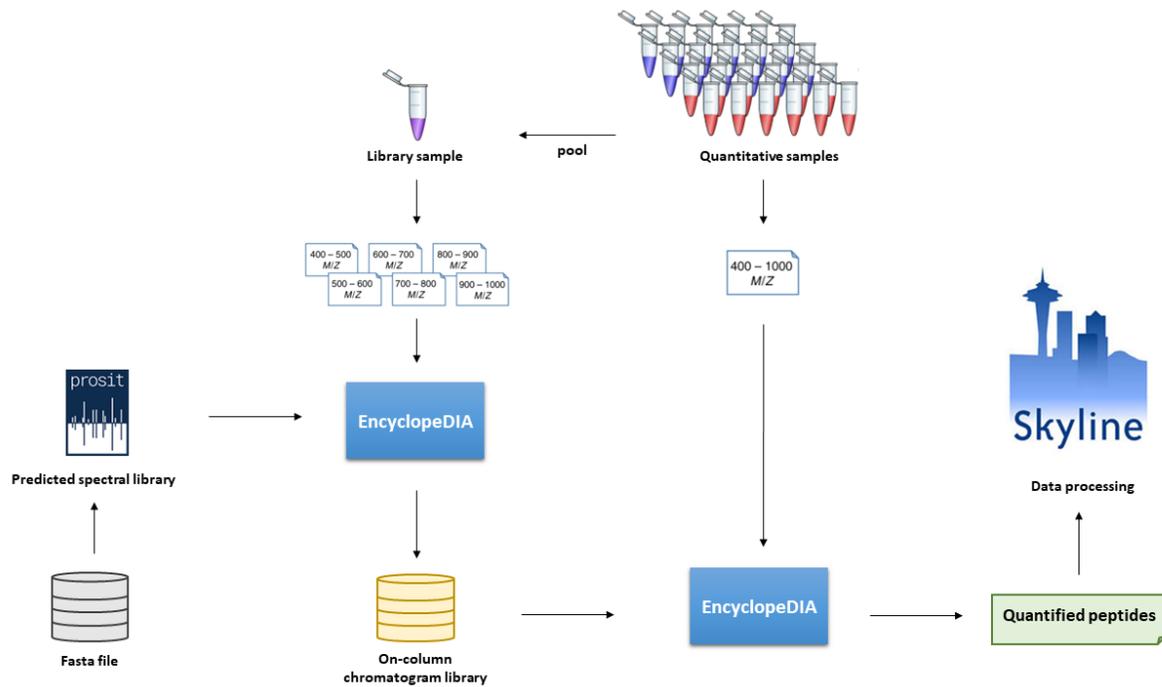


Figura 1. Workflow da análise e processamento de dados adquiridos com a técnica de proteômica Data-Independent Acquisition (modificado de Searle et al., 2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. O aumento na concentração de CO₂ induz respostas diferenciais no crescimento das espécies de *Eucalyptus*

Segundo os critérios fenotípicos aqui adotados, as espécies *E. pellita* e *E. saligna* não apresentaram crescimento caulinar significativo, já que os tratamentos com 550 e 680 ppm não resultaram em alteração na variável índice de crescimento caulinar. Contrariamente, todas as outras espécies apresentaram crescimento caulinar significativo na condição de 680 ppm (Figura 2A).

Já a área foliar parece ter sido o parâmetro mais sensível ao incremento de CO₂ atmosférico, uma vez que foi verificado um aumento proporcional ao estímulo por esse gás na maioria das espécies (Figura 2B). Em *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, o aumento da área foliar foi concomitante ao aumento de CO₂; em *E. grandis*, *E. citriodora* e *E.*

pellita, o estímulo por CO₂ a 550 ppm parece ter sido suficiente para observar o máximo crescimento do limbo foliar. Em contrapartida, *E. saligna* não apresentou nenhuma alteração na área foliar nas diferentes concentrações de CO₂.

Diversos trabalhos já mostraram que altas concentrações de CO₂ podem aumentar a fotossíntese e o acúmulo de biomassa de espécies florestais (RODEN; BALL, 1996; DELUCIA et al., 1999; NORBY et al. 2005), porém esse aumento depende das condições do local, da idade das plantas e das espécies analisadas (ELLSWORTH et al., 2017; WANG et al., 2012). Do mesmo modo, já foi relatado que o incremento com CO₂ pode ter efeito positivo significativo nas trocas gasosas e no crescimento de espécies arbóreas, entretanto a magnitude da resposta difere entre espécies e genótipos. Essas respostas positivas de crescimento foram impulsionadas por uma mudança coordenada no diâmetro do caule e na altura do caule, com aumento de 38,5% e 9,5%, respectivamente (DIOS et al., 2016).

Com relação a área foliar, em experimentos realizados com diferentes espécies em plataforma de enriquecimento FACE, essa resposta variou de acordo com o grupo funcional, as árvores tiveram um aumento de 21%, já as gramíneas não apresentaram diferença significativa (AINSWORTH, LONG, 2005). Em estudo com o gênero *Populus*, essa resposta parece estar relacionada a expansão e maior produção de células, ocasionado pelo aumento da plasticidade da parede celular, porém a sua magnitude é dependente do ambiente de crescimento e do genótipo analisado (TAYLOR et al., 2001).

Os estômatos são órgãos altamente relacionados com a transpiração e trocas gasosas da planta, por isso podem ser o primeiro órgão foliar a ser afetado por altas concentrações de CO₂. De forma geral, a resposta estomática foi equivalente em todas as espécies, apresentando um maior grau de fechamento em decorrência de uma maior concentração atmosférica desse gás (Figura 2C), o que pode ser considerado uma forte evidência de que os tratamentos com alta concentração de CO₂ foram realmente efetivos.

Baseado nos resultados adquiridos, foram selecionadas três espécies com comportamentos contrastantes frente ao incremento de CO₂ para serem analisadas em experimentos de proteômica, sendo elas: *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. pellita*. As espécies *E. saligna* e *E. citriodora* foram excluídas visto que não apresentaram crescimento

significativo segundo os parâmetros aqui adotados. Já a espécie *E. camaldulensis* se mostrou bastante responsiva em relação à área foliar, mas o seu índice de crescimento caulinar não foi significativo em alta concentração de CO₂.

Dentre as espécies escolhidas, *E. urophylla* demonstrou comportamento muito responsivo ao incremento de CO₂; contrariamente, *E. pellita* se mostrou menos responsiva em todos os parâmetros. *E. grandis* apresentou comportamento intermediário entre *E. urophylla* e *E. pellita* visto que teve crescimento caulinar significativo e máximo aumento da área foliar em 550 ppm.

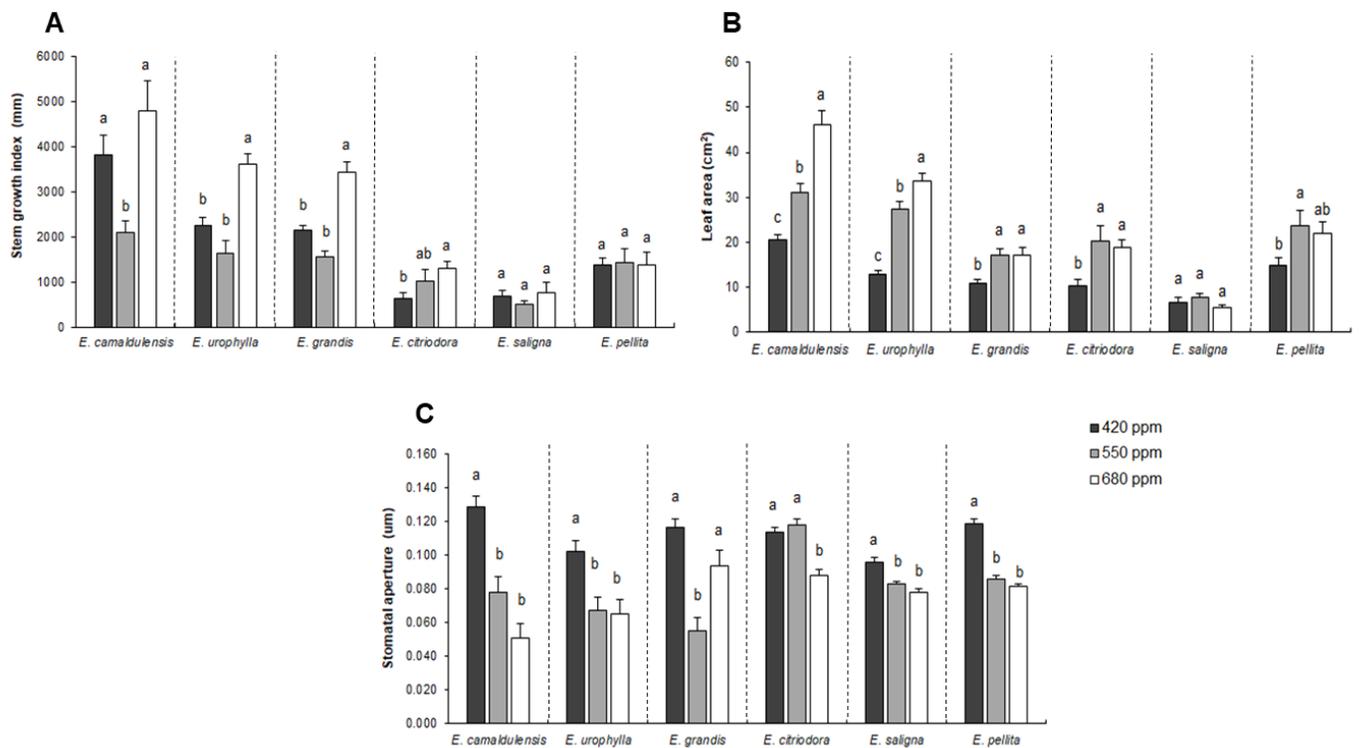


Figura 2. Respostas fenotípicas apresentadas por plantas das espécies de *Eucalyptus* após 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de CO₂ (410, 550 e 680 ppm). **A.** Índice de crescimento caulinar; **B.** Área foliar; **C.** Abertura estomática. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05) e Kruskal-Wallis (p < 0,05).

Visando a seleção do tratamento de alta concentração de CO₂ que induziu as respostas mais contrastantes entre as espécies, foi realizada uma análise de agrupamento pelo componente principal (Figura 3). Levando em consideração os

componentes analisados, é possível observar que o tratamento 550 ppm apresentou pouca variação dos dados entre as espécies *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. pellita* quando comparado ao 680 ppm. Nota-se que a condição 550 ppm formou um grupo mais homogêneo onde as espécies selecionadas ficam no mesmo quadrante e próximas entre si. Em contrapartida, o tratamento 680 ppm apresentou uma maior distância e variação dos dados entre as espécies selecionadas, formando um agrupamento mais disperso, indicando que as espécies tiveram diferenças maiores em sua resposta ao incremento de CO₂. Sendo assim, os tratamentos selecionados para análise de proteômica foram 420 ppm (controle) e 680 ppm (tratamento).

Apesar de ser possível definir qual concentração de CO₂ induziu os comportamentos mais contrastantes entre as espécies de *Eucalyptus*, a partir dos parâmetros utilizados aqui não foi possível determinar a concentração limite a partir da qual o CO₂ deixa de estimular o metabolismo fotossintético e passa a atuar como agente inibidor, uma vez que a maior concentração desse gás utilizada no experimento ainda provoca crescimento das plantas. Seriam necessários experimentos com concentrações ainda mais altas a fim de responder essa questão.

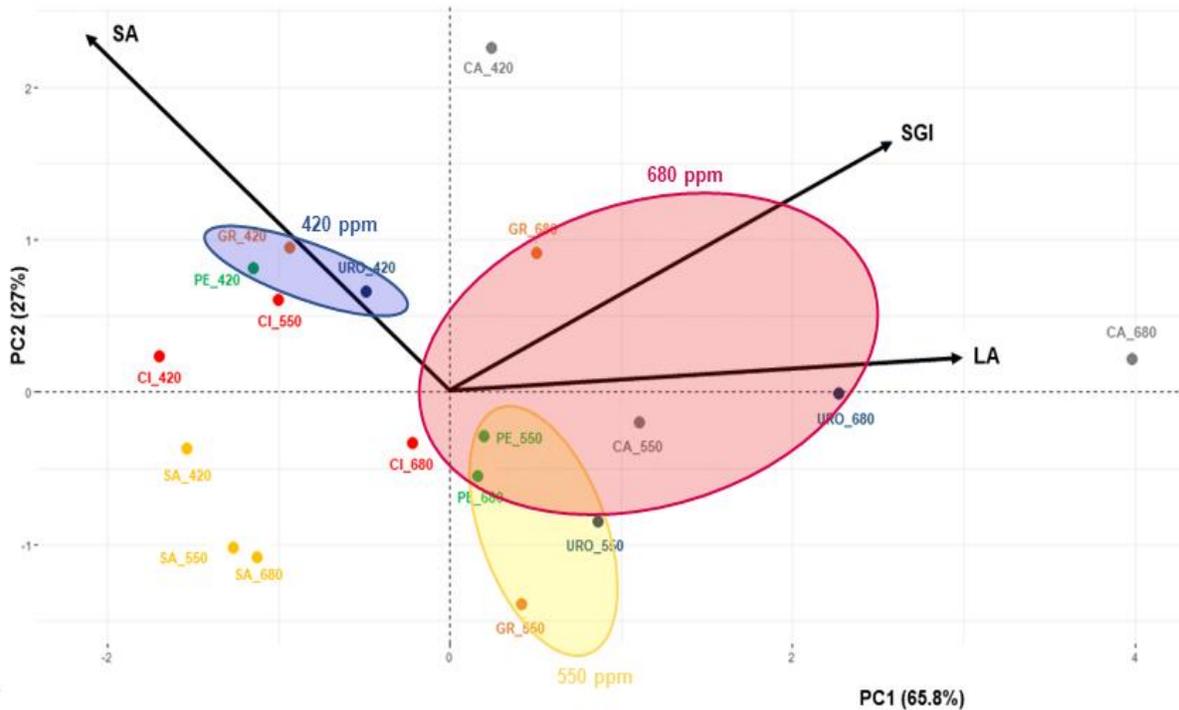


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) de espécies de *Eucalyptus* cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ (420, 550 e 680 ppm). CA: *E. camaldulensis*, GR: *E. grandis*, URO: *E. urophylla*, CI: *E. citriodora*, SA: *E. saligna* e PE: *E. pellita*, SGI: Índice de crescimento caulinar, LA: Área foliar e SA: Abertura estomática.

4.2. Análise integrada do proteoma foliar das espécies de *Eucalyptus* cultivadas em concentração elevada de CO₂

Nas espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas, foram identificadas 1840 proteínas nos tecidos foliares e a análise do intervalo dinâmico de abundância indicou uma variação da ordem de aproximadamente 1,7 vezes. Conforme esperado, a maioria das proteínas envolvidas no Ciclo de Calvin (CB) se mostraram no quartil contendo as proteínas mais abundantes, ou seja, com o maior número de cópias (Figura 4A).

A análise funcional do proteoma combinado das três espécies de *Eucalyptus* revelou que embora uma grande fração do proteoma identificado ainda não possuísse função conhecida, aquelas relacionadas aos mecanismos de modificações pós-

tradicionais, de renovação protéica e de sinalização também foram majoritariamente reportadas no nosso estudo (Figura 4B). A análise exploratória também indicou a presença de grande quantidade de proteínas envolvidas na produção e conversão de energia e de proteínas relacionadas ao metabolismo e transporte de carboidratos. Contrariamente, a classe funcional menos abundante foi composta por aquelas envolvidas na estrutura nuclear. Com relação à localização celular das proteínas isoladas (Figura 4C), as identificações cloroplastidiais e citoplasmáticas foram as mais abundantes no proteoma, na análise integrada das três espécies de *Eucalyptus*.

Os resultados indicam que, embora o número de identificações foliares esteja abaixo daquele predito pelo genoma de *Eucalyptus grandis*, os proteomas aqui estudados contém proteínas dos diferentes compartimentos celulares e obedecem ao padrão estrutura-função esperado para o tecido.

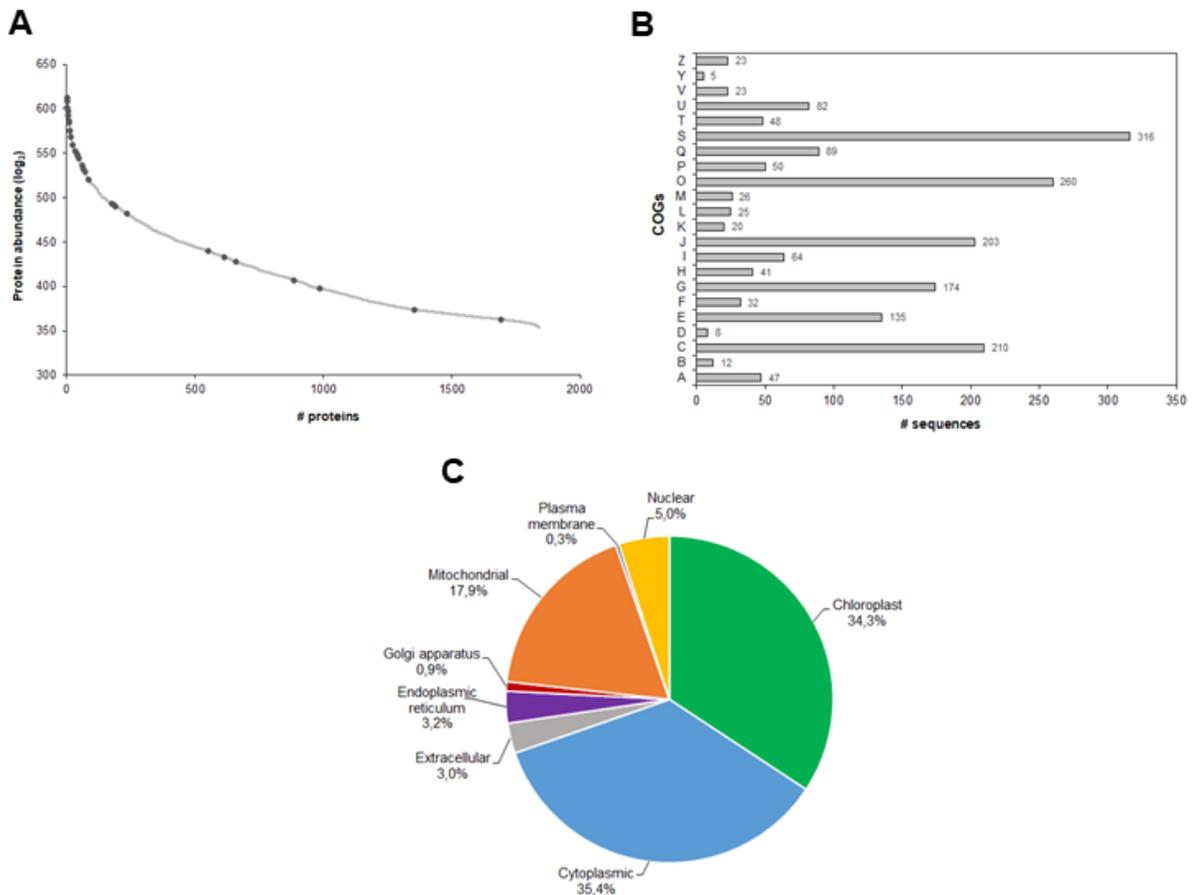


Figura 4. Panorama combinado do proteoma foliar de plantas jovens de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus pellita* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ e em condições enriquecidas de CO₂. **A.** Intervalo dinâmico de abundância (proteofomas relacionadas ao ciclo de Calvin-Benson estão destacadas). **B.** Anotação funcional de acordo com a Plataforma EGGNOG (A - RNA processing and modification, B - Chromatin Structure and dynamics, C - Energy production and conversion, D - Cell cycle control and mitosis, E - Amino Acid metabolism and transport, F - Nucleotide metabolism and transport, G - Carbohydrate metabolism and transport, H - Coenzyme metabolism, I - Lipid metabolism, J – Translation, K – Transcription, L - Replication and repair, M - Cell wall/membrane/envelop biogenesis, N - Cell motility, O - Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions, P - Inorganic ion transport and metabolism, Q - Secondary Structure, T - Signal Transduction, U - Intracellular trafficking and secretion, Y - Nuclear structure, Z – Cytoskeleton, R - General Functional Prediction only and S - Function Unknown), **C.** Localização sub-celular realizada na Plataforma MULTILOC 2.

Ainda visando a identificação de alterações no perfil quantitativo do proteoma induzido por CO₂, as proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas, de acordo com as suas quantidades, entre as diferentes espécies e condições de cultivo aqui avaliadas. Segundo os critérios adotados, uma proteína foi considerada diferencialmente abundante quando foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e apresentou um fold-change maior ou igual a 2. Foram classificadas como proteínas up-regulated aquelas que aumentaram sua abundância na condição de 680 ppm e down-regulated aquelas que diminuíram sua abundância na mesma condição.

O efeito do CO₂ foi mais pronunciado na espécie *Eucalyptus urophylla*, uma vez que foi observada alteração significativa na abundância de 86 proteínas após este estímulo ambiental (Figura 5A). Para esta espécie, a fração do proteoma que apresentou aumento quando estimulado por CO₂ representou aproximadamente 55% (48 proteínas) do proteoma diferencialmente regulado. Já para as espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus pellita* o número de identificações diferencialmente abundantes foi de 49 e 50, respectivamente. Além disso, a fração do proteoma estimulado por CO₂ em relação ao total do proteoma diferencialmente regulado foi bem menor nessas espécies, cerca de 38% em *E. grandis* e 40% em *E. pellita*. Esses resultados vão de encontro ao que foi observado durante a análise fenotípica das três espécies, uma vez que *E. urophylla* foi a espécie mais responsiva em relação ao crescimento e apresentou maior resposta diferencial no seu proteoma em relação às outras espécies.

Além disso, para analisar as formas mais abundantes entre todas as diferencialmente expressas, foram destacadas as identificações que apresentaram um fold-change maior que 6 vezes em alta concentração de CO₂ para cada espécie (Figura 5A). Em *E. grandis*, foi possível observar duas proteoformas com essa característica, sendo elas, Eucgr.F03101.2.p (Ribosomal L28e protein family) e Eucgr.D00111.1.p (Histidinol dehydrogenase). Acredita-se que a proteína Ribossomal L28e estabilize a expansão do RNA ribossomal e contribua para a diversidade dos ribossomos vegetais sem alterar a sua estabilidade (ARMACHE et al., 2010). Já a proteína Histidinol desidrogenase, é uma enzima bifuncional que oxida L-histidina em histidina em duas reações sequenciais (ADAMS, 1955). A histidina é um aminoácido essencial e necessário

ao longo de todo crescimento e desenvolvimento vegetal (MURALLA et al., 2007). Na espécie *E. pellita* apenas uma identificação apresentou um fold-change maior que 6 quando cultivada à 680 ppm (Eucgr.F03038.1.p - photosystem I subunit H-1). O PSI é um complexo multiprotéico localizado nas membranas dos tilacóides que intermedeia o transporte de elétrons da plastocianina para a ferredoxina (ROCHAIX, 2011). Já foi demonstrado que a superexpressão da subunidade H do PSI aumentou a tolerância à estresses abióticos durante a germinação de sementes e desenvolvimento de raízes de plântulas em tabaco (HAO et al., 2020).

A espécie *E. urophylla* foi a que apresentou o maior número de proteformas com o padrão aqui estudado, sendo elas, Eucgr.H04128.1.p (HAD-superfamily hydrolase, subfamily IG), Eucgr.E01249.1.p (Low PSII Accu (ECM1) involved in photosynthesis), Eucgr.F02696.2.p (ribosomal protein 1), Eucgr.D01779.1.p (6-phosphogluconate dehydrogenase family protein), Eucgr.H00466.1.p (NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein) e Eucgr.G01934.1.p (CCR-like). Já foi observado que diversos genes relacionados à família HAD regulam respostas ao estresse por deficiência de Pi em diferentes espécies (TANNERT et al., 2018; ANGKAWIJAYA et al., 2019; HANCHI et al., 2018). A proteína ECM1 é uma chaperona integral de membrana que é necessária para a montagem eficiente de PSII, provavelmente através da interação direta com a proteína D1 (PENG et al., 2006). Com relação à proteína ribossomal 1 encontrada, já foi reportado que os níveis de transcrição de vários genes responsivos à germinação foram modulados por ela sob ABA e estresses abióticos em *Arabidopsis* (JUNG et al., 2013). Estudos mostraram que a proteína 6-fosfogluconato desidrogenase citosólica, aumenta a tolerância ao estresse abiótico, melhorando o desenvolvimento do sistema radicular e ativando o sistema antioxidante em plantas de soja (LI et al., 2021). Já a enzima NADP+ redutase é a última enzima na transferência de elétrons durante a fotossíntese. Já foi reportado que plantas que superexpressam essa proteína, ampliaram os níveis de NADP(H) e glutathione, levando ao aumento da tolerância à alta intensidade luminosa o que indica que a perturbação do equilíbrio redox do cloroplasto e o aumento de radicais livres podem induzir mecanismos de proteção nas plantas (KOZULEVA et al., 2016). Também já foi reportado que os transcritos do gene CCR-LIKE (CCL) são regulados

diferencialmente no nível de estabilidade do mRNA e controlados pelos ritmos circadianos em *Arabidopsis* (LIDDER et al., 2005).

Esses resultados indicam que em *E. grandis* o controle da estabilidade ribossomal e a síntese de histidina são processos muito significativos para o crescimento da espécie. Já em *E. pellita*, isso parece estar relacionado a um elemento encontrado na cadeia de transporte de elétrons fotossintética, porém que não foi suficiente para promover o crescimento dessa espécie. No organismo *E. urophylla*, os processos mais expressivos estão relacionados a mecanismos de tolerância ao estresse, regulação transcricional e eficiência da fotossíntese que podem ter promovido o maior crescimento diferencial entre as espécies estudadas aqui.

O proteoma das espécies também parece apresentar alterações particulares frente ao estímulo por CO₂ uma vez que, entre todas as identificações diferencialmente abundantes, nenhuma é compartilhada entre os 3 organismos, tanto para as proteínas down-regulated quanto para as proteínas up-regulated (Figura 5B). Apenas a proteína Eucgr.C03960.1.p (ATP binding) é compartilhada entre *E. grandis* e *E. urophylla* no grupo down-regulated e as identificações Eucgr.K02185.3.p (TUDOR-SN protein 1) e Eucgr.K02710.1.p (gamma carbonic anhydrase-like 2) entre *E. urophylla* e *E. pellita* no grupo up-regulated.

A identificação Eucgr.C03960.1.p codifica uma proteína que atua na formação de aglomerados de Fe/S e os transfere para a membrana do cloroplasto. Esses aglomerados são capazes de transferir elétrons e atuar como catalisadores em processos como fotossíntese e respiração, metabolismo de nitrogênio e enxofre e regulação redox, portanto, são grupos prostéticos fundamentais para a atividade biológica de muitas proteínas (JOHNSON et al., 2005). Plantas transgênicas com perda de função dessa proteína resultaram em um fenótipo letal nas mudas, diminuição nas subunidades do PSI e diminuição nos níveis de ferredoxina-tioredoxina redutase (FTR) (LEZHNEVA et al., 2004; STÖCKEL, OELMULLER, 2004).

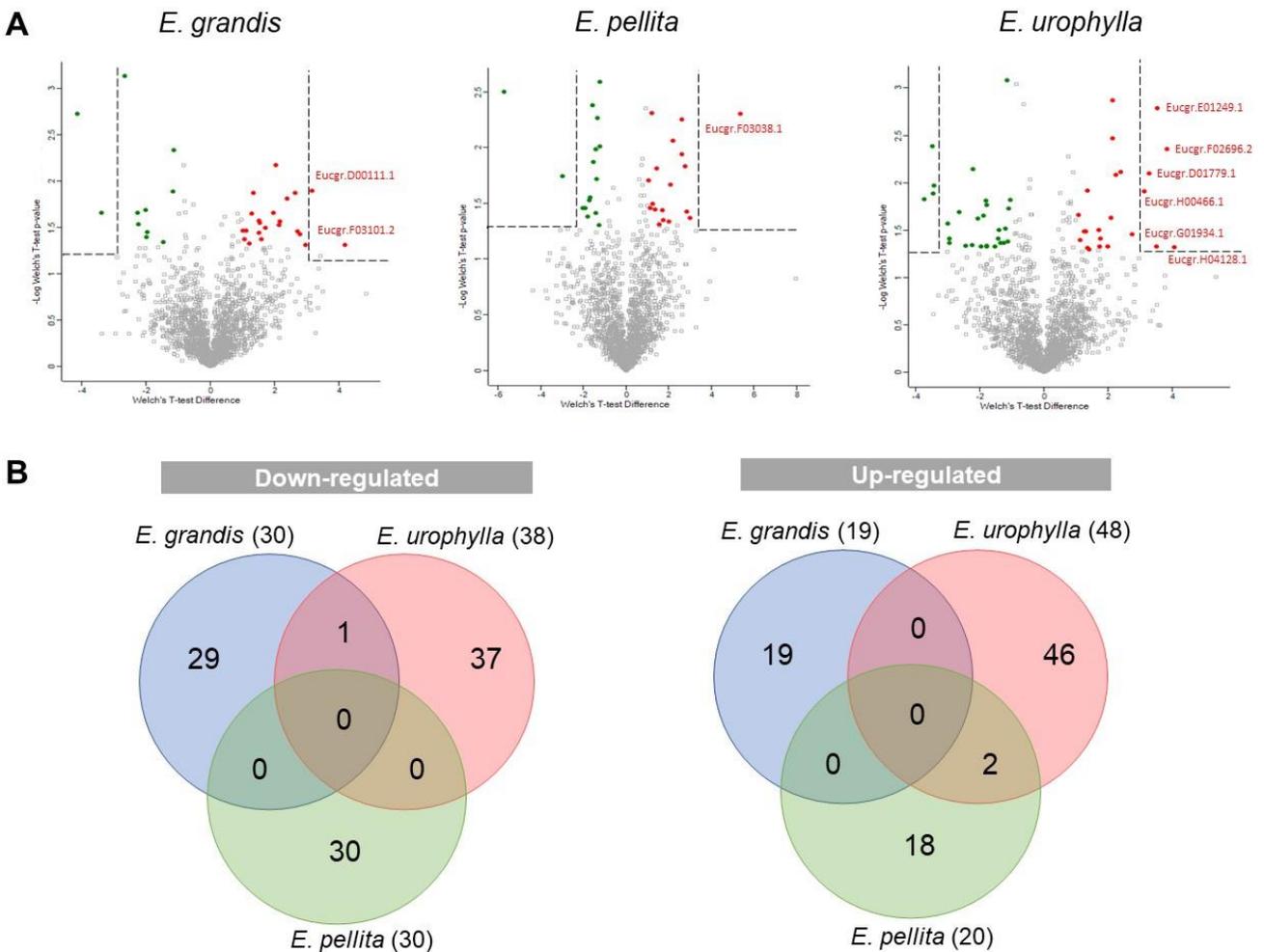


Figura 5. Proteínas diferencialmente abundantes nas espécies *E. grandis*, *E. pellita* e *E. urophylla* cultivadas em concentração atmosférica (420 ppm) e alta concentração de CO₂ (680 ppm). **A.** Volcano plot (proteínas destacadas em vermelho são up-regulated e proteínas destacadas em verde são down-regulated). **B.** Proteínas exclusivas e compartilhadas entre as espécies estudadas.

A proteoforma Eucgr.K02185.3.p codifica uma nuclease TSN que é uma proteína de ligação de RNA muito conservada (GUTIERREZ-BELTRAN et al., 2016). Já foi relatado que essa proteína é essencial para a tolerância, participando da expressão de mRNAs responsivos a estresses (DIT FREY et al., 2010). Foi revelado em estudos recentes que as TSNs têm um papel importante na sinalização de estresse atuando como uma plataforma de ancoragem para proteínas de grânulos de estresse (GUTIERREZ-BELTRAN et al., 2021). Já a proteoforma Eucgr.K02710.1.p codifica uma anidrase

carbônica que faz parte do complexo I mitocondrial. Estudos revelaram que ela é capaz de se ligar dióxido de carbono/bicarbonato, mas parece ser incapaz de catalisar a desidratação reversível do bicarbonato (MARTIN et al., 2009). Também já foi proposto que ela participa na translocação do CO₂ das mitocôndrias para os cloroplastos durante a fotorrespiração (BRAUN; ZABALETA, 2007; ZABALETA et al., 2012).

Os resultados obtidos indicam que a espécie *E. urophylla* tem o proteoma mais responsivo ao estímulo por CO₂ e que as altas concentrações desse gás parecem estimular o proteoma das espécies de diferentes maneiras. A fim de buscar respostas mais detalhadas, foi realizada a investigação de fluxos metabólicos específicos considerados diretamente impactados pelo aumento na concentração de CO₂.

4.3. Alterações metabólicas induzidas por cultivo em atmosfera enriquecida por CO₂

4.3.1. O Ciclo de Calvin-Benson

O ciclo de Calvin-Benson é parte fundamental na da fotossíntese, no qual 11 diferentes enzimas catalisam 13 reações. O ciclo conecta as reações que captam a energia luminosa, a fixação do CO₂ e outras vias do metabolismo de carbono, como a síntese de amido e sacarose (BASSHAM et al., 1969).

Altas concentrações de CO₂ podem afetar diretamente o metabolismo das plantas, principalmente o processo de fotossíntese, que é a porta de entrada do carbono na biosfera. Por isso, é esperado que concentrações elevadas desse gás aumentem a assimilação de C e as taxas fotossintéticas, porém a intensidade com que isso ocorrerá ainda precisa ser melhor elucidada (LEAKEY et al., 2009).

Com o intuito de verificar alterações direcionadas no ciclo de assimilação de C das plantas cultivadas em altas concentrações de CO₂, o primeiro fluxo metabólico analisado neste trabalho foi o Ciclo de Calvin-Benson. A abordagem proteômica DDA resultou na identificação de 29 proteoformas relacionadas a esse metabolismo (Tabela 1). Embora não se tenha conseguido uma cobertura expressiva do total de 73 formas proteicas preditas para o ciclo de Calvin-Benson, a partir da abordagem aqui descrita, ao menos

uma proteoforma foi identificada e quantificada para cada enzima envolvida na via em questão.

Para avaliar se o cultivo em atmosfera enriquecida com CO₂ induziu alterações nessa via, a abundância relativa de cada proteoforma de uma enzima foi combinada e foi aplicado um teste t ($p < 0,05$) entre os tratamentos para cada espécie. Entre todas as espécies, apenas a enzima Frutose 2,6-bisfosfato (FBPase) em folhas de *Eucalyptus urophylla* aumentou significativamente sua abundância em alta concentração de CO₂ (Figura 6). A FBPase catalisa a desfosforilação de frutose-1,6-bisfosfato (FBP) em frutose-6-fosfato (F6P) com a liberação de fosfato inorgânico. Já foi relatado que em plantas transgênicas de tabaco com alta expressão dessa enzima cultivadas em níveis elevados de CO₂, a parte aérea lateral, o número de folhas, o peso fresco e a atividade fotossintética aumentaram significativamente (TAMOI et al., 2008).

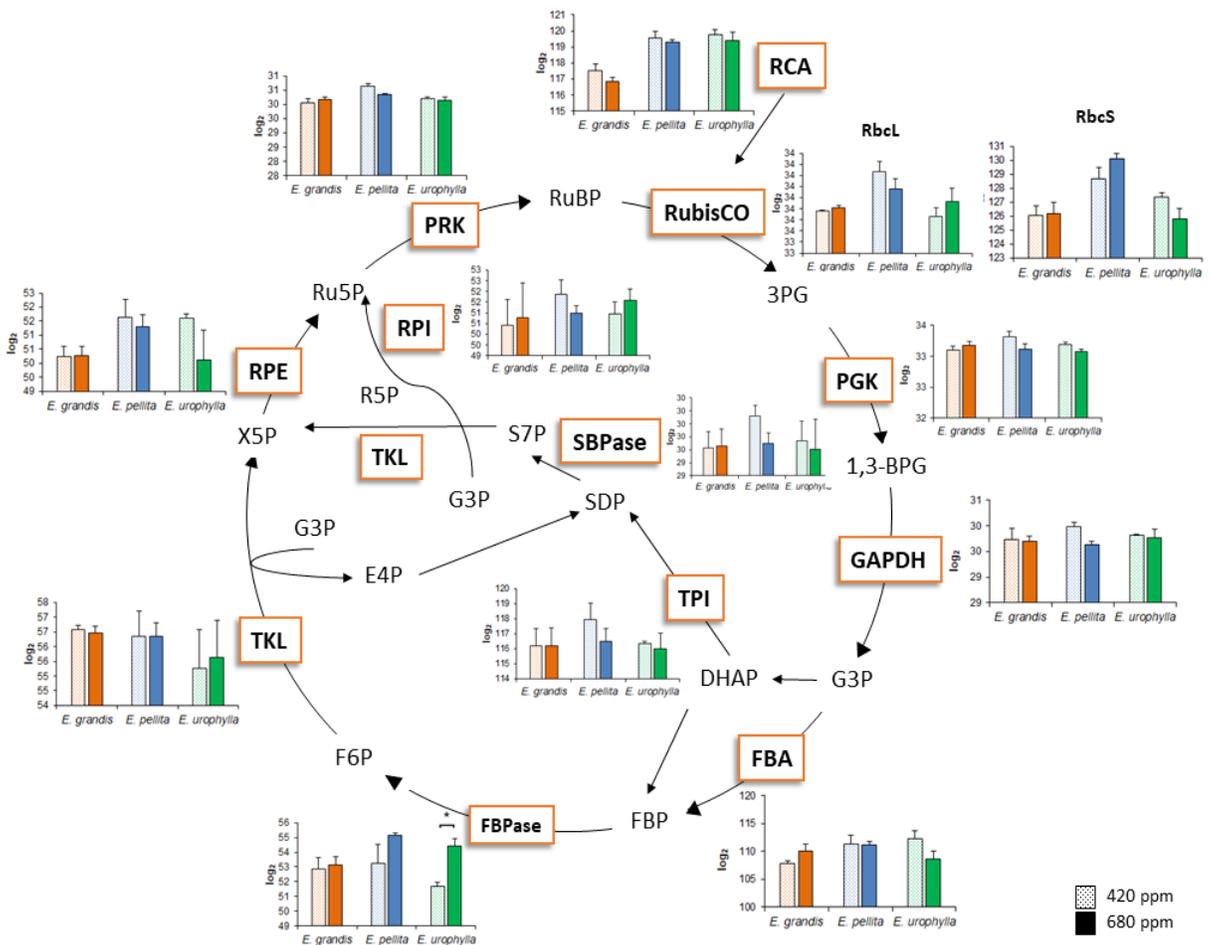


Figura 6. Ciclo de Calvin-Benson e a abundância relativa das enzimas identificadas em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm) pelo método DDA. * indica variação estatisticamente significativa (p < 0,05).

Além disso, de maneira geral, *E. pellita* apresentou uma tendência de diminuição da abundância das enzimas do ciclo de Calvin em atmosfera enriquecida de CO₂. Já *E. grandis* foi a espécie que apresentou menor variação dessa via quando cultivada em altos níveis de CO₂. Esses resultados indicam que o cultivo em atmosfera enriquecida por CO₂ induz poucas alterações na via de assimilação de C em *Eucalyptus*.

A fim de confirmar os resultados obtidos, foi realizada outra análise proteômica utilizando uma técnica chamada “data-independent acquisition” (DIA). Estudos anteriores já reportaram que a técnica o DIA é superior ao DDA no que diz respeito à

reprodutibilidade, especificidade e precisão da quantificação relativa de proteínas (BARKOVITS et al., 2020).

Com o método DIA, foi possível identificar 50 proteoformas diferentes conforme descrito na Tabela 2. Nas duas abordagens foi possível identificar pelo menos 1 proteoforma de cada enzima envolvidas na via de interesse, porém houve um aumento significativo no número de identificações pelo método DIA. Isso pode ocorrer pois nesse fluxo de trabalho, não há apenas a fragmentação dos íons precursores mais abundantes, mas sim todos os peptídeos dentro de uma janela de razão massa carga definida (m/z) são submetidos a fragmentação, o que facilita a identificação de sinais menos abundantes.

Tabela 1. Abundância relativa das proteoformas relacionadas aos Ciclo de Calvin-Benson identificadas pelo método Data-dependente acquisition (DDA) em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm). A abundância relativa foi dada pelo LFQ intensity em escala log (2).

Enzyme	Description	Proteoform	420 ppm			680 ppm		
			<i>E. grandis</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. urophylla</i>
FBA	Fructose-bisphosphate aldolase	Eucgr.B02864.1	22,16	23,97	23,06	24,08	24,09	21,73
		Eucgr.G01726.1	32,34	32,37	32,62	32,41	32,43	32,63
		Eucgr.I01326.1	28,26	29,27	29,14	28,63	29,01	28,97
		Eucgr.I01326.2	25,11	25,74	27,47	24,85	25,55	25,28
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase	Eucgr.B02755.2	30,55	30,61	30,59	30,51	30,36	30,51
		Eucgr.B02757.1	22,32	22,63	21,11	22,62	24,77	23,92
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Eucgr.F01793.1	32,45	32,82	32,56	32,52	32,55	32,64
		Eucgr.F04466.1	22,48	24,40	23,06	22,35	23,09	22,35
		Eucgr.H04673.1	29,78	29,12	29,29	29,69	29,17	29,38
		Eucgr.I01564.1	31,45	31,58	31,40	31,62	31,65	31,62
PGK	Phosphoglycerate kinase	Eucgr.F01476.1	33,11	33,32	33,19	33,18	33,11	33,07
PRK	Phosphoribulokinase	Eucgr.E01261.2	30,05	30,64	30,18	30,17	30,35	30,14
RbcL	Ribulose-bisphosphate carboxylase	Eucgr.C03525.1	33,68	34,03	33,63	33,71	33,88	33,77
RbcS	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain)	Eucgr.B03013.1	29,63	31,62	30,21	28,81	32,53	29,20
		Eucgr.J01502.1	30,70	31,32	31,03	31,21	31,38	30,77
		Eucgr.J01502.2	34,05	33,89	34,12	34,08	34,03	33,86
		Eucgr.K02223.1	31,67	31,87	31,98	32,04	32,17	31,94
		Eucgr.B02310.1	27,16	27,87	27,77	26,14	27,67	27,80
RCA	Rubisco activase	Eucgr.J01234.1	30,51	30,74	30,84	30,59	30,69	30,73
		Eucgr.J02030.1	33,26	33,38	33,54	33,39	33,42	33,45
		Eucgr.J02030.7	26,59	27,59	27,62	26,75	27,54	27,40
RPE	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Eucgr.B00532.5	26,41	27,26	26,94	26,50	27,01	26,63
		Eucgr.K02489.2	23,83	24,39	24,65	23,76	24,30	23,48

RPI	Ribose 5-phosphate isomerase	Eucgr.B02112.1	27,13	27,65	26,75	27,33	27,49	27,59
		Eucgr.H04380.1	23,31	24,23	24,21	23,45	23,50	23,99
SBPase	Sedoheptulose-bisphosphatase	Eucgr.J00242.1	29,51	29,76	29,57	29,53	29,55	29,50
TKL	Transketolase	Eucgr.D02466.1	23,76	23,71	22,21	23,50	23,49	22,58
		Eucgr.D02467.1	32,81	32,64	33,04	32,95	32,84	33,06
TPI	Triosephosphate isomerase	Eucgr.I01374.1	29,73	29,99	29,81	29,69	29,63	29,77

Tabela 2. Comparação das abordagens data-dependent acquisition (DDA) e data-independent acquisition (DIA) em relação às proteoformas do Ciclo de Calvin-Benson encontradas e seu número de peptídeos identificados.

Sigla	Nome	<i>Eucalyptus</i> ID	número peptídeos	
			DDA	DIA
FBA	Fructose-bisphosphate aldolase	Eucgr.B02864.1	7	5
		Eucgr.G01726.1	23	22
		Eucgr.I01326.1	15	13
		Eucgr.I01326.2	13	13
		Eucgr.B02864.2	0	4
		Eucgr.G01726.2	0	15
		Eucgr.G01726.3	0	21
		Eucgr.G01726.4	0	15
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	Eucgr.G01726.5	0	13
		Eucgr.B02755.2	16	0
		Eucgr.B02757.1	2	3
		Eucgr.B02755.1	0	14
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Eucgr.B02755.3	0	10
		Eucgr.F01793.1	23	30
		Eucgr.F04466.1	2	5
		Eucgr.H04673.1	17	23
		Eucgr.I01564.1	18	27
		Eucgr.H02597.1	0	1
PGK	Phosphoglycerate kinase	Eucgr.H02597.2	0	2
		Eucgr.H02597.6	0	2
PRK	Phosphoribulokinase	Eucgr.F01476.1	33	32
		Eucgr.E01261.2	23	23
		Eucgr.D02625.1	0	7
RbcL	Ribulose-bisphosphate carboxylases	Eucgr.E01261.1	0	23
		Eucgr.C03525.1	6	5
RbcS	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain)	Eucgr.B03013.1	14	13
		Eucgr.J01502.1	11	15
		Eucgr.J01502.2	13	15
		Eucgr.K02223.1	15	13
RCA	Rubisco activase	Eucgr.B02310.1	23	26
		Eucgr.J01234.1	27	30
		Eucgr.J02030.1	27	32
		Eucgr.J02030.7	26	0
		Eucgr.K03065.1	0	11
		Eucgr.L03031.1	0	13

		Eucgr.J01234.2	0	18
		Eucgr.J02030.2	0	29
		Eucgr.J02030.3	0	30
		Eucgr.B00532.5	4	7
		Eucgr.K02489.2	13	4
		Eucgr.K02489.1	0	3
RPE	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Eucgr.K02489.3	0	3
		Eucgr.B00532.1	0	7
		Eucgr.B00532.4	0	4
		Eucgr.B00532.6	0	5
		Eucgr.B02112.1	6	11
RPI	Ribose 5-phosphate isomerase	Eucgr.H04380.1	3	5
		Eucgr.L03383.1	0	4
SBPase	Sedoheptulose-bisphosphatase	Eucgr.J00242.1	17	21
		Eucgr.D02466.1	9	15
TKL	Transketolase	Eucgr.D02467.1	33	31
TPI	Triosephosphate isomerase	Eucgr.I01374.1	17	21

Após o processamento de dados e aplicação do teste estatístico, os resultados indicaram variações significativas pontuais: diminuição na abundância da enzima Rubisco ativase (RCA) na condição de 680 ppm em *E. grandis* e aumento na enzima Ribose-5-fosfato isomerase (RPI) em alta concentração de CO₂ em *E. urophylla* (Figura 7). Esses dados, confirmam aqueles obtidos pela estratégia proteômica anterior, apenas indicando variação significativa para as duas enzimas supramencionadas. A RCA regula a atividade da RubisCO e é essencial para a fotossíntese, pois remove os inibidores e libera o sítio ativo da RubisCO para carbamilação espontânea pelo CO₂ (SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Já a RPI catalisa a interconversão reversível entre D-ribulose 5-fosfato (Ru5P) e D-ribose 5 -fosfato (R5P) (STINCONE et al., 2015). Em um trabalho anterior analisando o proteoma cloroplastidial do híbrido *E. urograndis*, foi observado uma grande indução do ciclo CB com o aumento significativo em seis das onze enzimas envolvidas (PGK, GAPDH, FBA, FBPase, SBPase e RPI) quando essas plantas foram cultivadas à 1000 ppm (SANTOS; BALBUENA, 2017). As alterações pouco significativas no presente trabalho, podem se dar ao fato da utilização do extrato foliar total, pois as alterações a nível cloroplastidial podem ter sido menos perceptíveis na análise devido à grande abundância de outras proteínas presentes em diferentes compartimentos celulares. Outro fator a ser considerado deve ser a concentração de CO₂ utilizada, que

pode não ter sido suficiente para estimular mudanças significativas no ciclo nas espécies analisadas.

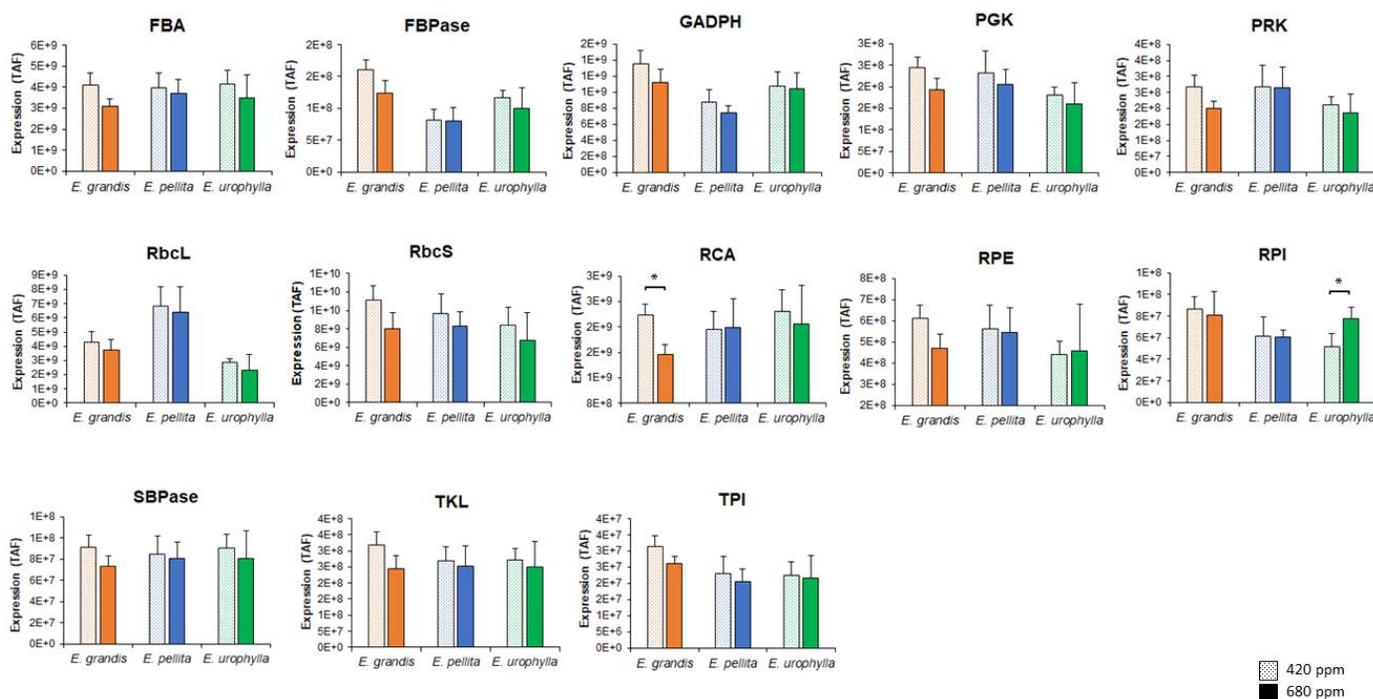


Figura 7. Abundância relativa das enzimas identificadas em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em contração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm) pelo método DIA. TAF: Total area fragment. * indica variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Neste estudo foi possível identificar proteoformas relacionadas ao ciclo CB nas duas abordagens utilizadas, entretanto, com a abordagem DIA a cobertura de identificações foi maior. Após validação com o método DIA, os resultados indicam que existem apenas estímulos pontuais no ciclo de assimilação de C em *Eucalyptus* após cultivo em altos níveis CO₂ e que essas variações são espécie-dependentes. Além disso, apesar dos estímulos sutis, a espécie *E. urophylla* parece ser o organismo que mais responde ao efeito do incremento de CO₂.

Com o intuito de encontrar mais evidências para as diferenças de fenótipo observadas entre as espécies analisadas, foi feita uma investigação utilizando os dados proteômicos adquiridos com a estratégia DDA de outros metabolismos vegetais importantes que envolvem o carbono assimilado na fotossíntese. Os primeiros fluxos

metabólicos analisados foram a respiração mitocondrial e a síntese de ácidos graxos que estão diretamente associados ao metabolismo do C.

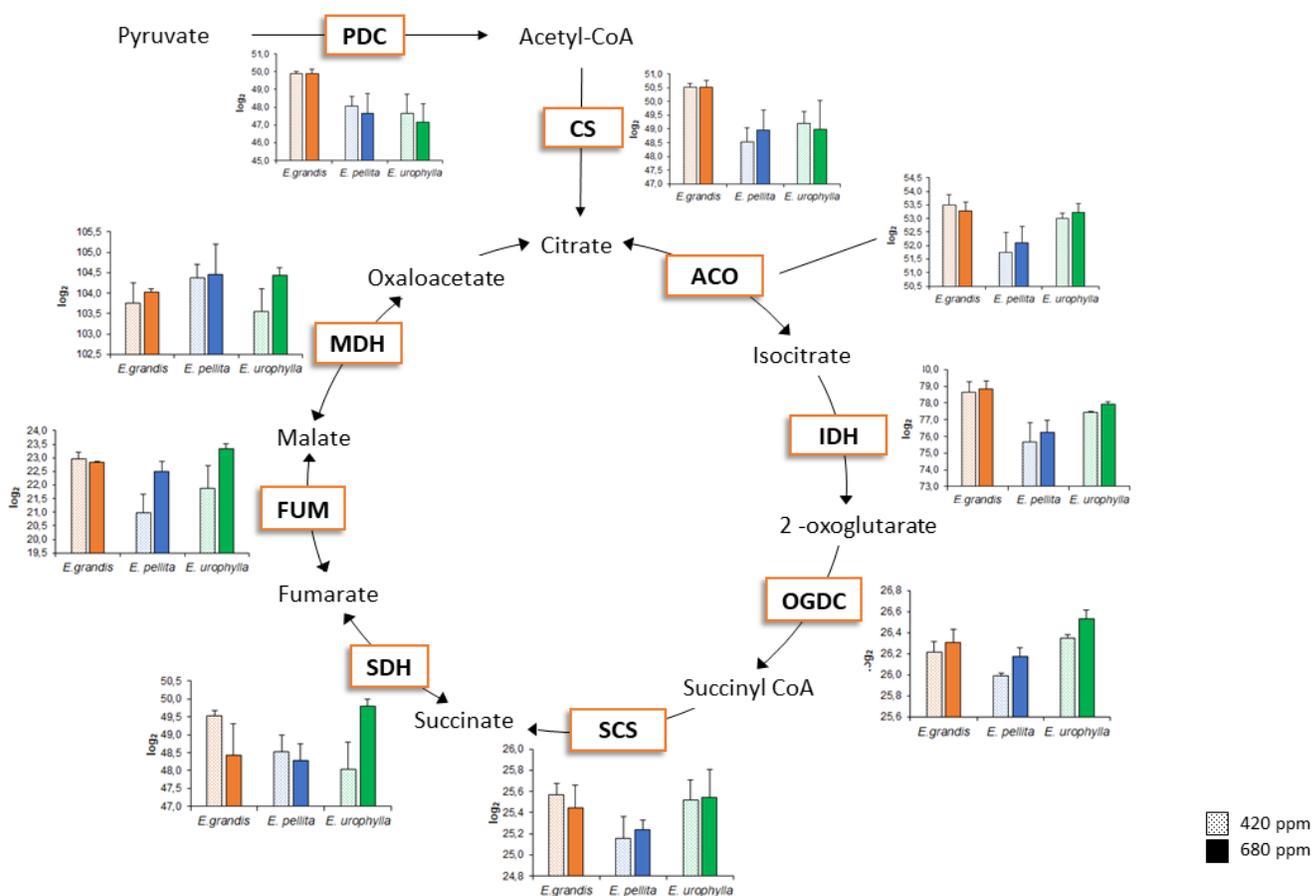
4.3.2. O ciclo TCA e a síntese de ácidos graxos

A respiração é um processo fundamental nas plantas, fornecendo energia e esqueletos de C necessários para seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência. Através desse processo, a energia solar conservada durante a fotossíntese e armazenada como energia química em moléculas orgânicas é liberada de maneira regulada para a produção de ATP. O ciclo do ácido cítrico (TCA) é composto por 9 enzimas que representam a principal maquinaria de metabolização do carbono nas mitocôndrias. O piruvato é transportado diretamente através da membrana interna e então é oxidado pelo complexo piruvato desidrogenase (PDC) para formar acetil-CoA.

A partir dos resultados obtidos, todas as enzimas relacionadas ao ciclo TCA foram identificadas. As espécies *E. grandis* e *E. pellita* foram as que menos apresentaram variações quantitativas nesse metabolismo, entretanto *E. pellita* parece naturalmente expressar menos estas enzimas em comparação às outras espécies. Apesar de novamente não ser possível encontrar diferenças estatísticas, houve um aumento perceptível na abundância de 4 enzimas da via na espécie *E. urophylla* em altas concentrações de CO₂, sendo elas, OGDC, SHD, FUM e MDH (Figura 8, Tabela 3). Já foi reportado que as enzimas FUM e SDH têm papel importante na aclimação das plantas e na sinalização de respostas a estresse, respectivamente (DYSON et al., 2016; BELT et al., 2017). Em estudos anteriores onde não houve a expressão de OGDC e MDH, ocorreu a diminuição da respiração, assimilação de C e crescimento mais lento dos organismos (TOMAZ et al., 2010; CONDORI-APFATA et al., 2019). As evidências obtidas aqui sugerem que altos níveis de CO₂ estimulam pontos específicos da respiração mitocondrial na espécie *E. urophylla* o que pode provocar melhor aclimação dessa espécie quando cultivada nessas condições.

Já foram relatadas mudanças na respiração foliar em resposta ao estímulo por CO₂, entretanto, a extensão dessas mudanças varia dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e de fatores ambientais (AYUB et al., 2011; GRIFFIN et al., 2013;

MARKELZ et al., 2014; WATANABE et al., 2014). Pensava-se que a diminuição na respiração foliar estivesse associada a redução no N foliar (AINSWORTH; LONG, 2005), entretanto, em espécies lenhosas essa resposta nem sempre acontece (CURTIS, 1996; HAWORTH et al., 2015). Casos em que níveis de CO₂ elevados aumentam a respiração mitocondrial podem estar relacionados a maiores concentrações de carboidratos e daí uma maior disponibilidade de substrato para o processo (ROGERS et al., 2004; TJOELKER et al., 2009). É possível que *E. pellita* e *E. grandis* não apresentaram maior estímulo dessa via em alta concentração de CO₂ pois não estão produzindo substratos suficientes para regulação do ciclo TCA.



A fim de confirmar a hipótese levantada, investigamos a síntese de carboidratos nas espécies de *Eucalyptus* aqui estudadas. Para isso, foi analisada a abundância das enzimas responsáveis pela síntese de amido e sacarose (Starch synthase e Sucrose synthase). Os dados espectrométricos não indicam indução dessas enzimas em *E. grandis* e *E. pellita*; porém, existe uma tendência de aumento da síntese de sacarose em *E. urophylla* (Figura 9, Tabela 3).

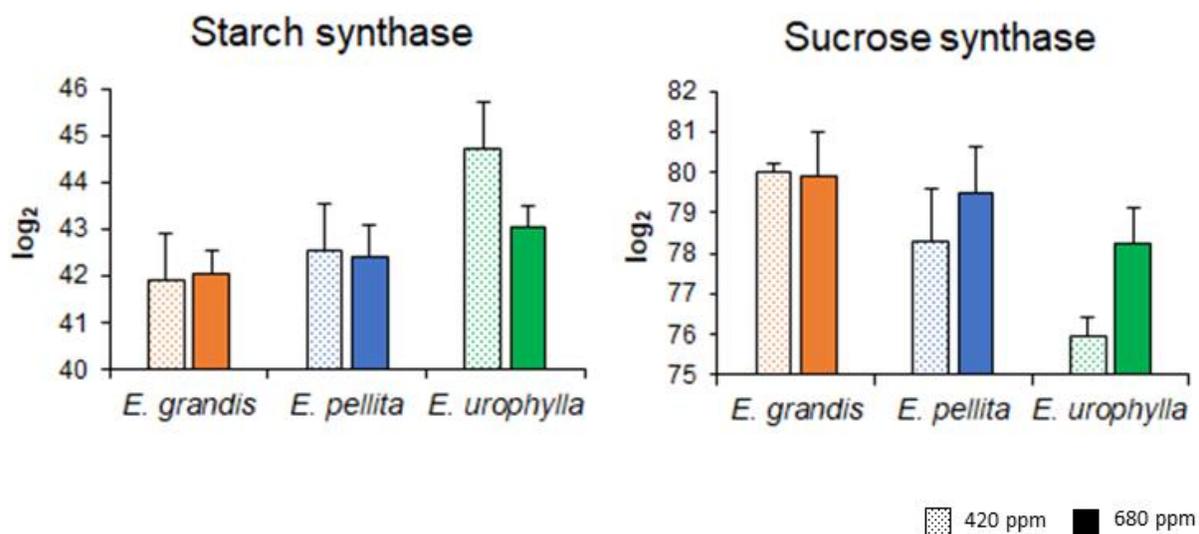


Figura 9. Abundância relativa das enzimas relacionadas à síntese de amido e sacarose (Starch synthase e Sucrose synthase) identificadas em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm) pelo método DDA.

Grande parte do carbono assimilado durante a fotossíntese nos tecidos foliares é armazenado transitoriamente na forma de amido dentro do cloroplasto ou exportado para o citosol para a síntese de sacarose (GRAF; SMITH, 2011; STITT; ZEEMAN, 2012). Porém, uma fração substancial desse carbono é usada no cloroplasto para sintetizar ácidos graxos (AG), que são os principais componentes dos lipídios das membranas das células, organelas e lipídios de armazenamento (triacilgliceróis - TAG). Durante a biossíntese dos AGs, o primeiro passo é catalisado pela acetil-CoA carboxilase (ACCase), que converte acetil-CoA em malonil-CoA, e então um conjunto de β-cetoacil-

ACP sintases (KAS) atuam no alongamento da cadeia (GORNICKI; HASELKORN, 1993).

Com a estratégia utilizada neste trabalho, foi possível identificar 4 enzimas relacionadas à biossíntese de AGs (ACCCase, MCT, KAS e KAR). Apesar de não apresentarem diferença estatística significativa, a espécie *E. pellita* apresentou uma forte tendência de aumento na abundância das enzimas, principalmente da ACCCase e da KAS. Em contrapartida, as outras duas espécies não parecem alterar seu proteoma em função do aumento do CO₂ (Figura 10, Tabela 3).

Em mamíferos, um aspecto chave para o ajuste metabólico em relação a estímulos ambientais é a capacidade de alternar entre o uso de carboidratos e gorduras como fonte de energia. Já foi reportado que a interrupção da síntese de amido resulta em um aumento significativo na síntese de ácidos graxos em *Arabidopsis* e que esses lipídios podem compensar parcialmente a falta de amido durante o crescimento e desenvolvimento normal da planta (YU et al., 2018). Esses resultados indicam que, uma vez que a espécie *E. pellita* não apresenta qualquer tipo de estímulo no Ciclo CB e em consequência, na síntese de amido, ela pode estar alocando o C para a síntese de ácidos graxos como fonte alternativa de energia.

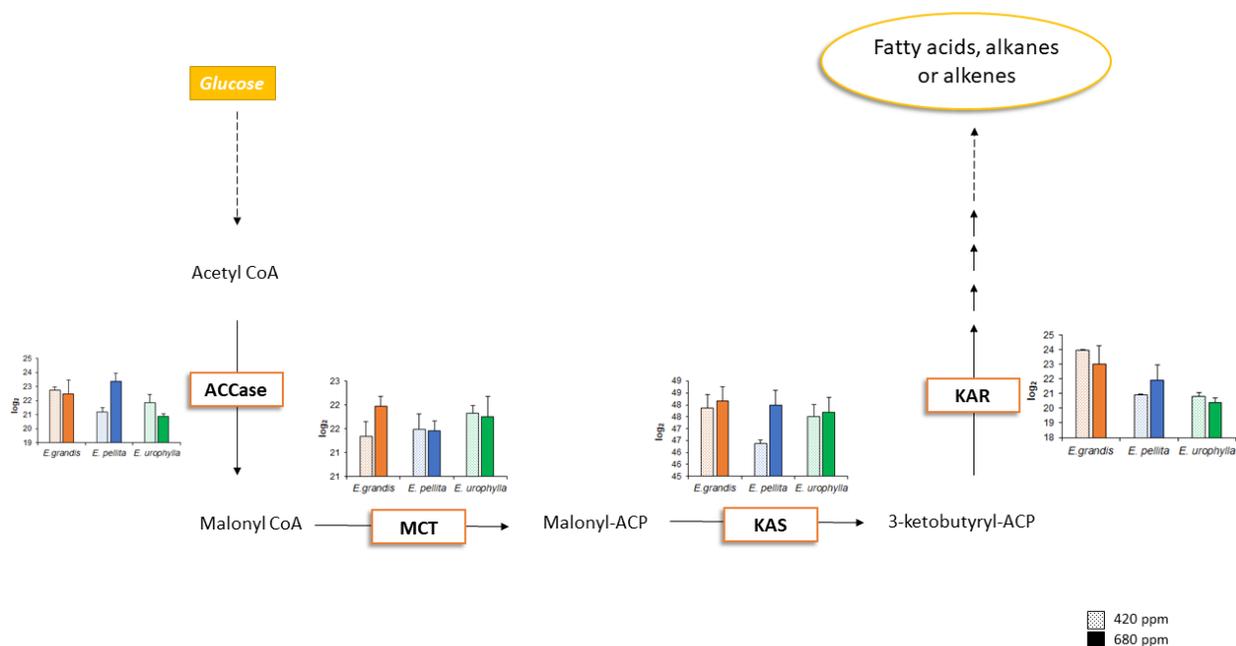


Figura 10. Síntese de ácidos graxos e a abundância relativa das enzimas identificadas em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em

concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm) pelo método DDA. (ACCCase - Acetyl-CoA carboxylase, MCT – Malonyl-CoA ACP transferase, KAS – Ketoacyl-ACP synthase, KAR - Ketoacyl-ACP reductase)

4.3.3. O metabolismo antioxidante

É sabido que fatores ambientais podem induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando a produção de polifenóis, ascorbato, alcalóides e de enzimas antioxidantes como Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e a Superóxido dismutase (SOD) (MISHRA; AGRAWAL, 2014; ZINTA et al., 2014). Neste estudo, foi possível identificar essas 3 enzimas antioxidante que são as principais no sistema de defesa (Figura 11). A enzima SOD, que catalisa a dismutação do superóxido (O₂⁻) em oxigênio (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), tem uma tendência de aumento em sua abundância nas 3 espécies analisadas. Um dos principais caminhos de neutralização de EROs em plantas é o ciclo Ascorbato-Glutationa, onde a APX é a principal enzima por neutralizar o H₂O₂. Nas espécies de *E. pellita* e *E. urophylla*, a ação da SOD pode ter gerado uma quantidade significativa de H₂O₂, o que induziu à um aumento na quantidade da enzima APX mediante ao aumento do CO₂, o que não foi observado para a espécie *E. grandis* (Figura 11, Tabela 3).

Aumento na expressão da SOD já foi observado em condições de estresse por Cd em *A. thaliana* (SKÓRZYŃSKA-POLIT; DRAŹKIEWICZ; KRUPA, 2004), trigo (BORZOUËI et al., 2012) e também em tomate (GAPIŃSKA; SKŁODOWSKA; GABARA, 2008) e quando submetidos a condições de estresse salino. Chang-Quan e Rui-Chang (2008) analisaram o efeito do estresse hídrico em cloroplastos de *Trifolium repens* L., e um aumento na expressão da SOD foi observado, principalmente na isoforma Fe-SOD. Um aumento na expressão da isoforma Fe-SOD também foi observado em soja sob tratamento com UV-B (YOON et al., 2016).

Um aumento na expressão da APX foi observado em plantas de *Vigna mungo* (SINGH et al., 2008) e *Oryza sativa* (HSU; KAO, 2004) quando submetidas a condição de estresse por Cd e também em *Anabaena doliolum* (SRIVASTAVA; BHARGAVA; RAI, 2005) e tabaco (SUN et al., 2010) sob estresse salino. Aumento na expressão da APX também foi observado em soja durante estresse hídrico (KAUSAR et al., 2012).

Com relação à *Eucalyptus*, já foi reportado que a alta concentração de CO₂ causa pequenas mudanças no sistema antioxidante em cloroplastos de *E. urophylla* (BALDASSI et al., 2018) o que corrobora com os resultados obtidos aqui.

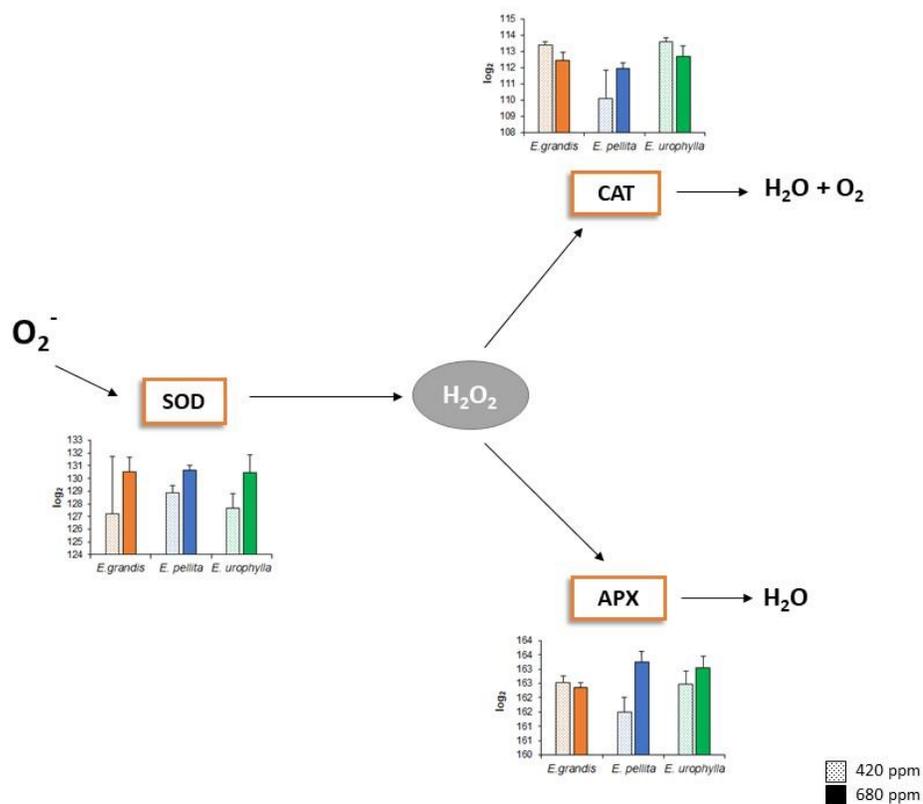


Figura 11. Mecanismo de defesa antioxidante e a abundância relativa das enzimas identificadas em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm) pelo método DDA. (SOD - Superoxide dismutase, CAT - Catalase, APX - ascorbate peroxidase)

Tabela 3. Abundância relativa das enzimas relacionadas ao Ciclo TCA, biossíntese de ácidos graxos, sistema antioxidante e biossíntese de amido e sacarose identificadas pelo método Data-dependente acquisition (DDA) em folhas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus pellita* e *Eucalyptus urophylla* cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ (420 ppm) e concentração enriquecida de CO₂ (680 ppm). A abundância relativa foi dada pelo LFQ intensity em escala log (2). As enzimas foram consideradas a soma da abundância das proteínas com a mesma função.

Enzima	Descrição	420 ppm			680 ppm		
		<i>E. grandis</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. urophylla</i>
<u>Ciclo TCA</u>							
PDC	Pyruvate dehydrogenase	49,892	48,046	47,660	49,871	47,637	47,162
ACO	Aconitase	53,489	51,755	53,005	53,273	52,109	53,233
CS	Citrate synthase	50,533	48,518	49,210	50,521	48,958	48,992
IDH	Isocitrate dehydrogenase	78,636	75,658	77,423	78,834	76,253	77,920
MDH	Malate dehydrogenase	103,761	104,366	103,555	104,027	104,454	104,436
SDH	Succinate dehydrogenase	49,541	48,520	48,034	48,419	48,284	49,792
OGDC	Oxoglutarate dehydrogenase	26,218	25,986	26,350	26,305	26,175	26,535
FUM	Fumarase	22,944	20,988	21,879	22,822	22,509	23,322
SCS	Succinyl CoA synthetase	25,566	25,156	25,521	25,442	25,237	25,542
<u>Biossíntese de ácidos graxos</u>							
ACCase	Acetyl-CoA carboxylase	22,747	21,191	21,832	22,465	23,352	20,888
KAR	Ketoacyl- <i>acp</i> reductase	23,945	20,899	20,825	23,001	21,905	20,411
MCT	Malonyl-CoA ACP transferase	21,348	21,492	21,831	21,970	21,456	21,754
KAS	Ketoacyl- <i>acp</i> synthase	47,872	46,363	47,497	48,165	47,978	47,683
<u>Antioxidante</u>							
APX	Ascorbate peroxidase	162,521	161,497	162,465	162,366	163,231	163,055
SOD	Superoxide dismutase	127,193	128,832	127,645	130,498	130,628	130,459
CAT	Catalase	113,377	110,074	113,572	112,440	111,943	112,687
<u>Biossíntese amido e sacarose</u>							
SS	Starch synthase	41,908	42,544	44,706	42,043	42,399	43,040
SuSy	Sucrose synthase	80,023	78,312	75,961	79,909	79,473	78,225

O crescimento e desenvolvimento em elevadas concentrações de CO₂ é um novo desafio que os organismos vegetais terão que enfrentar. Ainda não é possível determinar qual a concentração limite a partir da qual o gás CO₂ deixa de estimular o crescimento e passa a atuar como agente inibidor; porém, é evidente que essa condição requer respostas de aclimatação no curto prazo e/ou adaptação no longo prazo das plantas. O conhecimento dos mecanismos gerais de enfrentamento e prevenção ao estresse e mecanismos de tolerância é necessário para entender a regulação do metabolismo das plantas nesse novo cenário.

A partir dos resultados aqui apresentados, nota-se que dentre todas as espécies analisadas, *E. urophylla* é a mais responsiva ao CO₂, tanto no crescimento quanto no metabolismo. Como dito anteriormente, *E. pellita* é a espécie menos responsiva no que diz respeito ao crescimento, já com relação ao metabolismo, ela parece alocar a maior parte do C assimilado na síntese de ácidos graxos como fonte alternativa de energia. A espécie *E. grandis* apresentou crescimento em alguns parâmetros fenotípicos analisados, porém não apresentou muitas mudanças metabólicas mediante ao aumento na concentração de CO₂. O motivo de seu crescimento diferencial na condição de CO₂ elevado pode estar associado ao aumento expressivo na abundância de proteínas relacionadas à estabilidade ribossomal e à síntese de histidina. Além disso, as duas espécies não parecem estar sob estresse oxidativo na condição estudada, por tanto, talvez sejam necessários outros experimentos utilizando concentrações ainda maiores de CO₂ a fim de investigar maiores estímulos no metabolismo dessas espécies.

5. CONCLUSÕES

- O aumento na concentração de CO₂ induz respostas diferenciais no crescimento das espécies de *Eucalyptus* e a concentração de 680 ppm induz maiores respostas nas plantas analisadas;

- Dentre as espécies estudadas, *E. urophylla* é a mais responsiva ao CO₂, tanto no crescimento quanto no metabolismo;

- *E. pellita* parece utilizar a síntese de ácidos graxos como fonte alternativa de energia mediante ao aumento no CO₂;

- A espécie *E. grandis* não apresentou muitas mudanças metabólicas, talvez seu crescimento possa estar associado ao aumento expressivo na abundância de proteínas relacionadas à estabilidade ribossomal e à síntese de histidina;

- Experimentos futuros utilizando concentrações maiores de CO₂ são necessários a fim de investigar maiores estímulos no metabolismo dessas espécies.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELGAWAD, H.; PESHEV, D.; ZINTA, G.; VAN DEN ENDE, W.; JANSSENS, I. A.; ASARD, H. Climate extreme effects on the chemical composition of temperate grassland species under ambient and elevated CO₂: A comparison of fructan and non-fructan accumulators. **PLoS One**, v. 26, n.9 (3), p. e92044, 2014.
- ADAMS, E. L-Histidinal, a biosynthetic precursor of histidine. **J Biol Chem**, v. 217, p. 325–344, 1955.
- AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy. **New Phytol.** v.165, p. 351-372, 2005.
- AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; VODKIN, L. O.; WALTER, A.; SCHURR. U. The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. **Plant Physiol.**, v.142, p. 135-147, 2006.
- ANDEREGG, W. R. L.; TRUGMAN, A. T.; BADGLEYG; et al. Climate-driven risks to the climate mitigation potential of forests. **Science**, v. 368, p. eaaz7005, 2020.
- ANGKAWIJAYA, A. E.; NGO, A. H.; NGUYEN, V. C.; GUNAWAN, F.; NAKAMURA, Y. Expression Profiles of 2 Phosphate Starvation-Inducible Phosphocholine/Phosphoethanolamine Phosphatases, PECP1 and PS2, in *Arabidopsis*. **Front Plant Sci**, v.10, p. 662, 2019.
- AOKI, N.; ONO, K.; SASAKI, H.; SENEWEERA, S.; SAKAI, H.; KOBAYASHI, K.; ISHIMARU, K. Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic carbon metabolism in flag-leaf blades of rice before and after heading. **Plant Prod. Sci.**, v.6, p. 52-58, 2003.
- ARMACHE, J. P.; JARASCH, A.; ANGER, A. M.; VILLA, E.; BECKER, T.; BHUSHAN, S.; JOSSINET, F.; HABECK, M.; DINDAR, G.; FRANCKENBERG, S.; MARQUEZ, V.; MIELKE, T.; THOMM, M.; BERNINGHAUSEN, O.; BEATRIX, B.; SÖDING, J.; WESTHOF, E.; WILSON, D. N.; BECKMANN, R. Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.46, p. 19754-9, 2010.

- AYUB, G.; SMITH, R. A.; TISSUE, D. T.; ATKIN, O. K. Impacts of drought on leaf respiration in darkness and light in *Eucalyptus saligna* exposed to industrial-age atmospheric CO₂ and growth temperature. **New Phytol**, v.190, p.1003-1018, 2011.
- BALDASSI, A. C.; DOS SANTOS, B. M.; BALBUENA, T. S. Carbon dioxide induces minor antioxidant responses in *Eucalyptus urophylla* chloroplasts. **Trees**, v. 32, p. 1481–1485, 2018.
- BARKOVITS, K.; PACHARRA, S.; PFEIFFER, K.; STEINBACH, S.; EISENACHER, M.; MARCUS, K.; et al. Reproducibility, specificity and accuracy of relative quantification using spectral library-based data-independent acquisition. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 19, p. 181–197, 2020.
- BASSHAM, J. A.; KRAUSE, G. H. Free energy changes and metabolic regulation in steady state photosynthetic carbon reduction. **Biochim Biophys Acta**. v. 189, p. 207-221, 1969.
- BELT, K.; HUANG, S.; THATCHER, L. F.; CASAROTTO, H.; SINGH, K. B.; VAN AKEN, O.; MILLAR, A. H. Salicylic Acid-Dependent Plant Stress Signaling via Mitochondrial Succinate Dehydrogenase. **Plant Physiol**. v.173, n.4, p. 2029-2040, 2017.
- BLUM, T.; BRIESEMEISTER, S.; KOHLBACHER, O. MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 274, 2009.
- BORZOUEI, A.; KAFI, M.; AKBARI-GHOGDI, E.; MOUSAVI-SHALMANI, M. Long term salinity stress in relation to lipid peroxidation, super oxide dismutase activity and proline content of salt-sensitive and salt-tolerant wheat cultivars. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 476–482, 2012.
- BRAUN, H. P.; ZABALETA, E. Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants. **Physiol. Plant**, v. 129, p. 114-122, 2007.
- CANTALAPIEDRA, C. P.; HERNANDEZ-PLAZA, A.; LETUNIC, I.; PEERBORK HUERTACEPAS, J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. **Molecular Biology and Evolution**, p. msab293, 2021.
- CERNUSAK, L. A.; HAVERD, V.; BRENDDEL, O.; LE THIEC, D.; GUEHL, J.M.; CUNTZ, M. Robust response of terrestrial plants to rising CO₂. **Trends Plant Sci**. v. 24, p. 578–586, 2019.
- CHANG-QUAN, W.; RUI-CHANG, L. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol induced water stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 841–847, 2008.

- CONDORI-APFATA, J. A.; BATISTA-SILVA, W.; MEDEIROS, D. B.; VARGAS, J. R.; VALENTE, L. M. L.; HEYNEKE, E.; PÉREZ-DIAZ, J. L.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESE, A. The *Arabidopsis* E1 subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex modulates plant growth and seed production. **Plant Mol Biol**, v.101, n.12, p.183-202, 2019.
- CURTIS, P. S. A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. **Plant, Cell & Environment**, v. 19, p. 127–137, 1996.
- DELUCIA, E. H.; HAMILTON, J. G.; NAIDU S. L.; THOMAS, R. B.; ANDREWS, J. A.; FINZI, A.; LAVINE, M.; MATAMALA, R.; MOHAN, J. R.; HENDREY, G. R.; SCHLESINGER, W. R. Net primary productivity of a forest ecosystem with experimental CO₂ enrichment. **Science**, v. 284, p.1177–1179, 1999.
- DIOS V. R.; MEREED T. E.; FERRIO, J. P.; TISSUE, D. T.; VOLTAS, J. Intraspecific variation in juvenile tree growth under elevated CO₂ alone and with O₃: a meta-analysis, **Tree Physiology**, v. 36, n. 6, 682–693, 2016.
- DIT FREY, N. F.; MULLER, P.; JAMMES, F.; KIZIS, D.; LEUNG, J.; PERROT-RECHENMANN, C.; et al. RNA binding protein Tudor-SN is essential for stress tolerance and stabilizes levels of stress-responsive mRNAs encoding secreted proteins in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 22, p.1575–1591, 2010.
- DRIEVER, S. M.; SIMKIN, A. J.; ALOTAIBI, S.; FISK, S. J.; MADGWICK, P. J.; SPARKS, C. A.; JONES, H. D.; LAWSON, T.; PARRY, M. A. J.; RAINES, C. A. Increased SBPase activity improves photosynthesis and grain yield in wheat grown in greenhouse conditions. **Philos. Trans. R. Soc. B.**, v. 372, p. 20160384, 2017.
- DYSON B. C.; MILLER M. A. E.; FEIL, R.; RATTRAY, N.; BOWSHER C. G.; GOODACRE, R.; LUNN, J. E.; JOHNSON, G. N. FUM2, a Cytosolic Fumarase, Is Essential for Acclimation to Low Temperature in *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 118–127, 2016.
- ELLSWORTH, D. S.; ANDERSON, I. C.; CROUS, K. Y.; COOKE, J.; DRAKE, J. E.; GHERLEND, A. N.; GIMENO, T. E.; MACDONALD, C. A.; MEDLYN, B. E.; POWELL, J. R.; TJOELKER, M. G.; REICH, P. B. Elevated CO₂ does not increase eucalypt forest productivity on a low-phosphorus soil. **Nat Clim Chang**, v.7, p. 279–283, 2017.
- FOYER, C. H.; RUBAN, A. V.; NIXON, P. J. Photosynthesis solutions to enhance productivity. **Phil. Trans R Soc B.**, v. 372, p. 20160374, 2017.
- GAPIŃSKA, M.; SKŁODOWSKA, M.; GABARA, B. Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 1, p. 11–18, 2008.

- GESCH, R.W.; VU, J.C.; BOOTE, K.J.; HARTWELL ALLEN L.; BOWES, G. Sucrose-phosphate synthase activity in mature rice leaves following changes in growth CO₂ is unrelated to sucrose pool size. **New Phytol.**, v. 154, p. 77-84, 2002.
- GORNICKI, P.; HASELKORN, R. Wheat acetyl-CoA carboxylase. **Plant Mol. Biol.** v. 22, p. 547–552, 1993.
- GRAF, A.; SMITH, A. M. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. **Trends Plant Sci**, v. 16, p. 169–175, 2011.
- GRAW, S.; TANG, J.; ZAFAR, M. K.; BYRD, A. K.; BOLDEN, C.; PETERSON, E. C.; BYRUM, S. D. proteiNorm - A User-Friendly Tool for Normalization and Analysis of TMT and Label-Free Protein Quantification. **ACS Omega**, v. 30, n. 5(40), p. 25625-25633, 2020.
- GRIFFIN, K. L.; TURNBULL, M. H. Light saturated RuBP oxygenation by Rubisco is a robust predictor of light inhibition of respiration in *Triticum aestivum* L. **Plant Biol.**, v.15, p. 769-775, 2013.
- GUTIERREZ-BELTRAN, E.; DENISENKO, T. V.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOVA, P. V. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions. **Cell Death Differ**, v. 23, p. 1739–1748, 2016.
- GUTIERREZ-BELTRAN, E.; ELANDER, P. H.; DALMAN, K.; DAYHOFF, G. W. II; MOSCHOU, P. N.; UVERSKY, V. N.; et al. Tudor staphylococcal nuclease is a docking platform for stress granule components and is essential for SnRK1 activation in *Arabidopsis*. **EMBO J.**, v. 40, p. e105043, 2021.
- HANCHI, M.; THIBAUD, M. C.; LEGERET, B.; KUWATA, K.; POCHON, N.; BEISSON, F.; et al. The Phosphate Fast-Responsive Genes PECP1 and PPsPase1 Affect Phosphocholine and Phosphoethanolamine Content. **Plant Physiol.**, v. 176, n. 4, p. 2943–62, 2018.
- HAWORTH, M.; MOSER, G.; RASCHI, A.; KAMMANN, C.; GRÜNHAGE, L.; MÜLLER, C. Carbon dioxide fertilisation and suppressed respiration induce enhanced spring biomass production in a mixed species temperate meadow exposed to moderate carbon dioxide enrichment. **Functional Plant Biology**, v. 43, p. 26–39, 2015.
- HSU, Y. T.; KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 227–238, 2004.
- IPCC - Summary for Policymakers [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, M. Tignor, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem (eds.)]. In: **Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability**. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S.

Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.]. Cambridge University Press. In Press, 2022.

IPCC Summary for policymakers. In: MASSON-DELMOTTE, V.; ZHAI, P.; PÖRTNER, H. O et al. (eds) Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. World Meteorological Organization, **Geneva, Switzerland**, p 32, 2018.

JOHNSON, D. C.; DEAN, D. R.; SMITH, A. D.; JOHNSON, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. **Annu. Rev. Biochem.**, v.74, p. 247–281, 2005.

JUNG, H. J.; KIM, M. K.; KANG, H. An ABA-regulated putative RNA-binding protein affects seed germination of *Arabidopsis* under ABA or abiotic stress conditions. **J Plant Physiol**, v.170, n.2, p.179-84, 2013.

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

LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ROGERS, A.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 2859–2876, 2009.

LEZHNEVA, L.; AMANN, K.; MEURER, J. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. **Plant J.** v. 37, p. 174–185, 2004.

LI, C.; LI, K.; ZHENG, M.; LIU, X.; DING, X.; GAI, J.; YANG, S. Gm6PGDH1, a Cytosolic 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, Enhanced Tolerance to Phosphate Starvation by Improving Root System Development and Modifying the Antioxidant System in Soybean. **Front. Plant Sci.**, v. 12, p. 704983, 2021.

LIDDER, P.; GUTIÉRREZ, R. A.; SALOMÉ, P. A.; MCCLUNG, C. R.; GREEN, P. J. Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. **Plant Physiol.**, v. 138, n. 4, p. 2374-85, 2005.

MARKELZ, R. J. C., VOSSELER, L. N.; LEAKEY, A. D. B. Developmental stage specificity of transcriptional, biochemical and CO₂ efflux responses of leaf dark respiration to growth of *Arabidopsis thaliana* at elevated [CO₂]. **Plant Cell Environ.**, v.37, p. 2542-2552, 2014.

MARTIN, V.; VILLARREAL, F.; MIRAS, I.; NAVAZA, A.; HAOUZ, A.; GONZÁLEZ-LEBRERO, R. M.; KAUFMAN, S. B.; ZABALETA, E. Recombinant plant gamma

carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 3425-3430, 2009.

MENEZES-SILVA, P. E.; LORAM-LOURENÇO, L.; ALVES, R. D. F. B.; SOUSA, L. F.; ALMEIDA, S. E. D. S.; FARNESE, F. S. Different ways to die in a changing world: consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. **Ecol Evol**, v. 9, p.11979–11999, 2019.

MISHRA, A. K.; AGRAWAL, S. B. Cultivar specific response of CO₂ fertilization on two tropical mung bean (*Vigna radiata L.*) cultivars: ROS generation, antioxidant status, physiology, growth, yield and seed quality. **J. Agron. Crop Sci.**, v. 20, p. 273–289, 2014.

MURALLA, R.; SWEENEY, C.; STEPANSKY, A.; LEUSTEK, T.; MEINKE, D. Genetic dissection of histidine biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 144, p. 890–903, 2007.

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration - Earth System Research Laboratory, **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**, 2022. Disponível em: <<https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>> Acesso em: 04 jul. 2022.

NORBURY, R. J.; DELUCIA, E. H.; GIELEN, B.; CALFAPIETRA, C.; GIARDINA, C. P.; KING, J. S.; LEDFORD, J.; MCCARTHY, H. R.; MOORE, D. J.; CEULEMANS, R.; DE ANGELIS, P.; FINZI, A. C.; KARNOSKY, D. F.; KUBISKE, M. E.; LUKAC, M.; PREGITZER, K. S.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G. E.; SCHLESINGER, W. H.; OREN, R. Forest response to elevated CO₂ is conserved across a broad range of productivity. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 120, p.18025–18056, 2005.

NUCCIO, M. L.; POTTER, L.; STIEGELMEYER, S. M.; CURLEY, J.; COHN, J.; WITTICH, P. E.; TAN, X.; DAVIS, J.; NI, J.; TRULLINGER, J.; HALL, R.; BATE, N. J. Strategies and tools to improve crop productivity by targeting photosynthesis. **Phil Trans R Soc B.**, v. 372, p. 20160377, 2017.

PENG, L.; MA, J.; CHI, W.; GUO, J.; ZHU, S.; LU, Q.; LU, C.; ZHANG, L. LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2006, 18(4):955-69. doi: 10.1105/tpc.105.037689. Epub 2006 Mar 10. Erratum in: **Plant Cell**, v.30, n.1, p.245-248, 2018.

PINO, L. K.; SEARLE, B. C.; BOLLINGER, J. G.; NUNN, B.; MACLEAN, B.; MACCOSS, M. J. The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. **Mass Spectrom Rev.** v. 39, n.3, p. 229-244, 2020.

PUGH, T. A. M.; LINDESKOG, M.; SMITH, B.; POULTER, B.; ARNETH, A.; HAVERD, V.; CALLE, L. Role of forest regrowth in global carbon sink dynamics. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 116, p. 4382–4387, 2019.

R STUDIO TEAM. R Studio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, 2015. <http://www.rstudio.com/>.

- RODEN, J. S.; BALL, M. C. Growth and photosynthesis of two eucalypt species during high temperature stress under ambient and elevated [CO₂]. **Global Change Biology**. v. 2, p. 115-128, 1996.
- ROGERS, A.; ALLEN, D. J.; DAVEY, P. A.; MORGAN, P. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; CORNIG, G.; DERMODY, O.; DOHLEMAN, F. G.; HEATON, E. A. et al. Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under free-air carbon dioxide enrichment. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, p. 449–458, 2004.
- SANTOS, B. M.; BALBUENA, T. S. Carbon assimilation in *Eucalyptus urophylla* grown under high atmospheric CO₂ concentrations: A proteomics perspective. **J Proteomics**, v. 150, p. 252-257, 2017.
- SEARLE, B. C., PINO, L. K., EGERTSON, J. D. et al. Chromatogram libraries improve peptide detection and quantification by data independent acquisition mass spectrometry. **Nat Commun**, v. 9, p. 5128, 2018.
- SIMKIN, A. J.; LOPEZ-CALCAGNO, P.E.; DAVEY, P. A.; HEADLAND, L. R.; LAWSON, T.; TIMM, S.; BAUWE, H.; RAINES, C. A. Simultaneous stimulation of sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase and the photorespiratory glycine decarboxylase-H protein increases CO₂ assimilation, vegetative biomass and seed yield in *Arabidopsis*. **Plant Biotechnol. J.**, v.15, p. 805–816, 2017.
- SINGH, S.; KHAN, N. A.; NAZAR, R.; ANJUM, N. A. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo L. Hepper*) under cadmium stress. **American Journal of Plant Physiology**, v. 3, n. 1, p. 25–32, 2008.
- SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; DRAŹKIEWICZ, M.; KRUPA, Z. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 1, p. 71-78, 2004.
- SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme, **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 449-475, 2002.
- SRIVASTAVA, A. K.; BHARGAVA, P.; RAI, L. C. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 1291–1298, 2005.
- STINCONE, A.; PRIGIONE, A.; CRAMER, T.; WAMELINK, M. M. C.; CAMPBELL, K.; CHEUNG, E.; OLIN-SANDOVAL, V.; GRUNING, N. M.; KRUGER, A.; ALAM, M. T.; KELLER, M. A.; BREITENBACH, M.; BRINDLE, K. M.; RABINOWITZ, J. D.; RALSER, M. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biol Rev**, v. 90, n. 3, p. 927–963, 2015.

- STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Curr Opin Plant Biol**, v.15, p. 282–292, 2012.
- STÖCKEL, J.; OELMULLER, R. A novel protein for Photosystem I biogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 10243–10251, 2004.
- SUN, W. H.; DUAN, M.; SHU, D. F.; YANG, S.; MENG, Q. W. Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 8, p. 917–926, 2010.
- TAMOI, M.; HIRAMATSU, Y.; NEDACHI, S.; TABUCHI, T.; OTORI, K.; SHIGEOKA, S. Effects of Cytosolic FBPase on Photosynthetic Carbon Metabolism Under High CO₂ Conditions. In: Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B. (eds) Photosynthesis. Energy from the Sun. **Springer, Dordrecht**, 2008.
- TANNERT, M.; MAY, A.; DITFE, D.; BERGER, S.; BALCKE, G. U.; TISSIER, A.; et al. Pi starvation-dependent regulation of ethanolamine metabolism by phosphoethanolamine phosphatase PECP1 in *Arabidopsis* roots. **J Exp Bot**. v. 69, n.3, p. 467–81, 2018.
- TAYLOR, G.; CEULEMANS, R.; FERRIS, R.; GARDNER, S.D.; SHAO, B.Y. Increased leaf area expansion of hybrid poplar in elevated CO₂. From controlled environments to open-top chambers and to FACE. **Environmental Pollution**, v. 115, n. 3, p. 463-472, 2001.
- TJOELKER, M. G.; OLEKSYN, J.; LORENC-PLUCINSKA, G.; REICH, P. B. Acclimation of respiratory temperature responses in northern and southern populations of *Pinus banksiana*. **New Phytologist**, v. 181, p. 218–229, 2009.
- TOMAZ, T.; BAGARD, M.; PRACHAROENWATTANA, I.; LINDÉN, P.; LEE C. P.; CARROLL, A. J.; STRÖHER, E.; SMITH, S. M.; GARDESTRÖM, P.; MILLAR A. H. Mitochondrial Malate Dehydrogenase Lowers Leaf Respiration and Alters Photorespiration and Plant Growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1143–1157, 2010.
- TYANOVA, S.; TEMU, T.; COX, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. **Nat Protocols**, v.11, p. 2301–2319, 2016a.
- TYANOVA, S.; TEMU, T.; SINITYN, P.; CARLSON, A.; HEIN, M. Y.; GEIGER, T.; MANN, M.; COX, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nat Methods**. v. 13, p. 731–740, 2016b.
- WANG, D.; HECKATHORN, S.A.; WANG, X.; PHILPOTT, S. M. A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂. **Oecologia**, v.169, p.1–13, 2012.

- WATANABE, C. K.; SATO, S.; YANAGISAWA, S.; UESONO, Y.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. **Plant Cell Physiol.** v. 55, p. 341-357, 2014.
- WATSON-LAZOWSKI, A.; LIN, Y.; MIGLIETTA, F.; EDWARDS, R.J.; CHAPMAN, M.A.; TAYLOR, G. Plant adaptation or acclimation to rising CO₂? Insight from first multigenerational RNA-Seq transcriptome. **Global Change Biol.**, v. 22, p. 3760-3773, 2016.
- WEI, H.; GOU, J.; YORDANOV, Y.; ZHANG, H.; THAKUR, R.; JONES, W.; BURTON, A. Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. **J. Plant Res.**, v. 126, p. 305-320, 2013.
- YOON, M. Y.; KIM, M. Y.; SHIM, S.; KIM, K. D.; HA, J.; SHIN, J. H.; KANG, S.; LEE, S. H. Transcriptomic Profiling of Soybean in Response to High-Intensity UV-B Irradiation Reveals Stress Defense Signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1917, 2016.
- YU, L.; FAN, J.; YAN, C.; XU, C. Starch Deficiency Enhances Lipid Biosynthesis and Turnover in Leaves. **Plant Physiol.** v.178, n.1, p.118-129, 2018.
- ZABALETA, E.; MARTIN, M. V.; BRAUN, H. P. A basal carbon concentrating mechanism in plants? **Plant Sci.**, v. 187, p. 94-104, 2012.
- ZINTA, G.; ABDELGAWAD, H.; DOMAGALSKA, M. A.; VERGAUWEN, L.; KNAPEN, D.; NIJS, I.; et al. Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels. **Global Change Biol.** v. 20, p. 3670–3685, 2014.

CAPÍTULO 4 - Considerações Finais

A proteômica é uma tecnologia chave para o estudo de sistemas biológicos dinâmicos e complexos pois, permite medições qualitativas e quantitativas em larga escala de proteína em respostas a estímulos internos e/ou externos. Neste trabalho, essa ferramenta se mostrou muito eficiente para a identificação e mapeamento de vias metabólicas nos tecidos foliares e também a nível organelar mediante a alterações de fatores ambientais.

Nossa estratégia de extração e enriquecimento cloroplastidial foram eficazes na redução da abundância de contaminantes cruzados e permitiram uma investigação profunda das mudanças que ocorrem no proteoma do cloroplasto ao longo do desenvolvimento das folhas e das estações do ano. O proteoma do cloroplasto de *Eucalyptus grandis* parece aumentar os metabolismos relacionados aos processos catabólicos e redox à medida que as folhas envelhecem, enquanto o acúmulo de proteínas envolvidas nos processos biossintéticos é diminuído. As mudanças proteômicas mais pronunciadas ocorreram nas estações de transição (primavera e outono) com um aumento de proteínas relacionadas à fotossíntese durante as estações chuvosas.

O aumento na concentração de CO₂ induziu respostas diferenciais no crescimento de diferentes espécies de *Eucalyptus* e a concentração de 680 ppm induziu maiores respostas. Dentre todas as espécies analisadas, *E. urophylla* foi a mais responsiva ao CO₂, tanto no crescimento quanto no metabolismo. *E. pellita* é a espécie menos responsiva no que diz respeito ao crescimento, já com relação ao metabolismo, ela parece alocar a maior parte do C assimilado na síntese de ácidos graxos como fonte alternativa de energia. A espécie *E. grandis* não apresentou muitas mudanças metabólicas mediante ao aumento na concentração de CO₂, porém seu crescimento pode estar associado ao aumento expressivo na abundância de proteínas relacionadas à estabilidade ribossomal e à síntese de histidina.

Uma compreensão mais profunda das redes biológicas associadas à idade é importante para o desenvolvimento de estratégias para maximizar a produção de biomassa. Além disso, a análise da dinâmica sazonal desvenda os mecanismos moleculares subjacentes à plasticidade do metabolismo e à adaptação das plantas em

redes espaço-temporais. O conhecimento dos mecanismos gerais de enfrentamento e prevenção aos diversos estresses abióticos, como o CO₂, e mecanismos de tolerância também é necessário para entender a regulação do metabolismo das plantas nesse novo cenário.

Este estudo contribui para uma compreensão mais abrangente sobre os mecanismos de adaptação e de enfrentamento ao estresse em espécies de *Eucalyptus* para melhor entendimento da regulação metabólica das plantas em cenários de mudanças ambientais.