**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca
de *Eucalyptus grandis***

Ilara Gabriela Frasson Budzinski

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2012**

Ilara Gabriela Frasson Budzinski
Bióloga

Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Budzinski, Ilara Gabriela Frasson

Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis* / Ilara Gabriela Frasson Budzinski. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
185 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Eucalipto 2. Fermentação alcoólica 3. Glicólise 4. Melhoramento genético vegetal 5. Metabolômica 6. Proteômica I. Título

CDD 634.9734
B927a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

À minha querida mãe, Sidneia Budzinski por sua força, exemplo de perseverança, luta e por ser essa incrível mulher.

Ao meu querido pai Zigomar Budzinski por ser um grande homem e ter cuidado tão bem da mamãe.

Às minhas queridas tias e avó que estiveram sempre presentes, confiantes e dedicadas nos momentos em que mais precisamos.

À Sí, que abriu mão de algumas coisas e acreditou, por ter estado ao meu lado principalmente quando mais precisei, compartilhando os bons momentos e os meus medos, me ajudando a acreditar também.

Nós conseguimos!

AGRADECIMENTOS

Á Deus;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação e confiança em meu trabalho;

Ao CNPq e FAPESP (Processo nº 2009/00808-2), pela concessão das bolsas;

À empresa Suzano Papel e Celulose pela disponibilização do material biológico e ao José Mateus Wisniewski por toda a ajuda durante as coletas;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da ESALQ;

Ao Prof. Dr. Thomas Moritz, por ter me recebido em seu laboratório e permitido a realização da análise dos metabólitos, sendo sempre simpático e solícito;

Aos técnicos do *Umea Plant Science Centre*: Inga-Britt e Krister, pela excelente convivência, ajuda com o preparo das amostras e análise dos dados. E a Pernilla pela ajuda inicial com os programas de análise.

Aos amigos que fiz em Umea: Kate, Lili, Liudmila, Christian, Mateusz, Dereje e as brasileiras Ilka e Camila. Ter conhecido e estado com vocês foi muito gostoso;

Ao Querido Dr. David Moon, por tooooooooooda a ajuda, conversas, sugestões e cafés e principalmente por me incentivar!

À Livia Franceschini, pela agradável convivência, papos e principalmente por toda a ajuda/ suporte com a bioinformática.

Ao Dr. e Engenheiro Agrônomo Luis Felipe Boaretto, o meu amigo Felipão, com quem aprendi muito. Você sabe que sou sentimental então, obrigada por sua amizade, sinceridade, companheirismo, respeito, desabafos, apoio, nossas conversas farão falta – Sucesso SEMPRE meu caro;

Ao meu amigo e Dr. Faldinha (Thiago Falda Leite). Obrigada pela amizade, idéias, companheirismo, caronas, desabafos, horas de estudo ... saudade das nossas conversas.

À Dani (Danielle Izilda Rodrigues da Silva), minha querida amiga de dentro e fora do lab. Por nossas risadas, bate-papos, desabafos, fofuquinhas (rs). Por ter me dado força quando mais precisei, levarei esses momentos para sempre;

À futura Engenheira Agrônoma Julinha (Júlia Silva Morosini), minha parceira de trabalho, pelas conversas sérias e “não-sérias”, amizade, preocupação, respeito, por sua competência e dedicação, foi muito bom “trabalhar” com você;

À querida Hanazinha (Hana Silva) que é uma pessoa muito especial. Por nossas conversas, momento sérios, risadas e devaneios!!

Aos coleguinhas Ivanzão (Ivan Mozol) e Camilinha (Camila Ribeiro) pela excelente convivência, caronas, conversas. Sucesso meninos!

Ao Felipinho (Felipe Garbelini Marques) por nossas conversinhas, coleguismo, caronas para as quantificações de mRNA e por sua fundamental ajuda durante o experimento de ritmo;

Ao Matheus Bonato e Fernanda Salvato, pelas trocas de idéias e experiências que continuam, sempre que possível, apesar da correria.

Ao amigo Léo (Ganso – Leonardo Ferreira), por me mostrar que eu preciso reler sobre o uso da vírgula (rs). Por sua super ajuda e contribuições e por nossa excelente convivência, valew Léo!

À Carolzinha (Maria Carolina Quecini) por sua preocupação, sempre disposta a ajudar com os assuntos científicos e paralelos!

Ao meu mais novo coleguinha Fabrício Edgar de Moraes, por nossa excelente convivência, papos, idéias, troca de experiências e por toda a sua compreensão com a minha “ausência laboratorial” em função da tese (rs)!

Aos antigos e atuais amigos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas pela convivência agradável: Ana Carolina Murad Lima, Alexander de Andrade, Edenilson Rabelo, Gabriela Lavorente, Gisele Lacerda, Juliano Bragatto, Lilia Barbosa, Luiz Magrini, Ana Paula Silveira, Andressa Bini, Janaína Barbosa, Larissa Prado, Maria Juliana C. Rodrigues, Mônica Labate, Pedro Barreto, Simone Guidetti, Sônia Andrade.

Ao meu feio favorito e único (Tiago B. Santos), meu grande amigo e companheiro. Saber que você está aí (apesar da distância) me faz muito bem.

Aos meus queridos amigos de Londrina e Piracicaba (Éder, Fábio, Luiz, Marcela, Diana, Thays) que sempre estiveram presentes, mesmo que somente por alguns minutos ou através de e-mails boas conversas, baladinhas, risadas e força!

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes."

Marthin Luter King

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	25
LISTA DE SIGLAS	27
1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Revisão Bibliográfica	30
1.1.1 O Setor Florestal, o Eucalipto e sua importância econômica	30
1.1.2 Melhoramento genético florestal	33
1.1.3 Biossíntese da Madeira (Xilogênese)	35
1.1.4 Sazonalidade do Câmbio	40
1.1.5 Formação da Casca	41
1.1.6 Fotossíntese Cortical.....	43
1.1.7 Respiração Vegetal	47
1.1.7.1 Glicólise.....	51
1.1.7.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.....	54
1.1.7.3 Cadeia Transportadora de Elétrons	55
1.1.7.4 Fermentação Alcoólica	55
1.1.8 Fluxo Metabólico	57
1.1.9 As Ômicas: Estudos integrados de Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica.....	58
Referências	59
2 ANÁLISE DO METABOLISMO PRIMÁRIO DA REGIÃO CAMBIAL DE <i>Eucalyptus grandis</i> DURANTE O VERÃO E INVERNO	69
Resumo	69
Abstract	69
2.1 Introdução	70
2.2 Material e Métodos.....	71
2.2.1 Material vegetal e condições experimentais.....	71
2.2.2 Seleção de genes e desenho de <i>primers</i>	72
2.2.3 Extração de RNA total.....	75
2.2.4 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído.....	75
2.2.5 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA	76
2.2.6 PCR quantitativo (qPCR).....	76
2.2.7 Seleção dos genes de referência	78
2.2.8 Extração de proteínas	78
2.2.9 Solubilização e quantificação das proteínas.....	79
2.2.10 SDS-PAGE (Mini-Gel)	79
2.2.11 Eletroforese bidimensional	80
2.2.12 Focalização isoeletrica (primeira dimensão)	80

2.2.12.1 Eletroforese (segunda dimensão)	80
2.2.13 Coloração dos géis	81
2.2.14 Obtenção e análise das imagens.....	81
2.2.15 Digestão <i>In-gel</i> de proteínas.....	82
2.2.16 LC-MS/MS	83
2.2.17 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas	83
2.2.18 Extração e análise de açúcares solúveis da região cambial.....	85
2.2.18.1 Preparo das amostras.....	85
2.2.18.2 Quantificação dos carboidratos solúveis totais (CST).....	85
2.2.18.3 Análise estatística dos dados de carboidratos solúveis	86
2.2.19 Extração de metabólitos	86
2.2.20 Cromatografia Gasosa e espectrometria de massas	87
2.2.21 Identificação dos metabólitos e análise estatística	87
2.3 Resultados e discussão	88
2.3.1 Análise de transcritos da região cambial de <i>E. grandis</i> atuantes no metabolismo primário.....	88
2.3.1.2 Escolha dos genes de referência.....	89
2.3.1.3 PCR quantitativo (qPCR)	90
2.3.1.4 Glicólise e fermentação alcoólica.....	90
2.3.1.5 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA).....	97
2.3.1.6 Fotossíntese: fixação do carbono	99
2.3.2 Perfil protéico da região cambial de <i>E. grandis</i> em dois períodos sazonais: Verão e Inverno	102
2.3.2.1 Extração de Proteínas da Região Cambial	102
2.3.2.2 Géis bidimensionais.....	103
2.3.2.3 Análise de Imagens	105
2.3.2.4 Identificação de proteínas do câmbio e classificação funcional.....	105
2.3.2.5 Proteínas identificadas relacionadas ao metabolismo primário	109
2.3.2.6 Proteínas identificadas relacionadas a diferentes vias metabólicas	113
2.3.3 Carboidratos solúveis presentes na região cambial.....	115
2.3.3.7 Análise do perfil metabólico da região cambial de <i>e. grandis</i>	117
2.3.3.7.1 Identificação dos metabólitos e normalização dos dados	117
2.3.4 Análise integrada do perfil metabólico primário	124
Referências.....	126
3 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PRIMÁRIO DA CASCA DE <i>Eucalyptus grandis</i> EM DOIS PERÍODOS SAZONAIS DISTINTOS.....	135
Resumo	135
Abstract.....	135
3.1 Introdução.....	135
3.2 Material e Métodos	137
3.2.1 Material vegetal e condições experimentais	137
3.2.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA	137
3.2.3 Focalização isoeletrica (primeira dimensão).....	137

3.2.4 Preparo das amostras para extraçãod e açúcares solúveis	138
3.2.5 Remoção dos extrativos da casca.....	138
3.2.6 Quantificação dos carboidratos solúveis totais (CST)	138
3.3 Resultados e discussão.....	138
3.3.1 Análise de transcritos da casca de <i>E. grandis</i> , atuantes no metabolismo primário	138
3.3.2 Escolha dos genes de referência	138
3.3.3 PCR quantitativo (qPCR).....	139
3.3.4 Genes envolvidos na glicólise e fermentação alcoólica	139
3.3.5 Genes envolvidos no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos	142
3.3.6 Genes envolvidos na fotossíntese: fixação de carbono.....	144
3.3.7 Análise do perfil protéico da casca de <i>E. grandis</i> em dois períodos sazonais: Verão e Inverno.....	145
3.3.7.1 Extração de proteínas da casca	145
3.3.7.2 Géis bidimensionais	146
3.3.7.3 Análise de imagens	149
3.3.7.4 Proteínas identificadas na casca e classificação funcional	149
3.3.7.5 Proteínas identificadas relacionadas ao metabolismo primário.....	151
3.3.7.6 Proteínas identificadas relacionadas a diferentes vias metabólicas.....	154
3.3.8 Carboidratos solúveis presentes na casca	156
3.3.9 Análise do perfil metabólico casca de <i>E. grandis</i>	157
3.3.9.1 Identificação dos metabólitos e normalização dos dados.....	157
3.3.10 Análise integrada do perfil metabólico primário.....	163
Referências	165
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	173

RESUMO

Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis*

O gênero *Eucalyptus* é uma das principais espécies arbóreas comercialmente plantadas em todo o mundo. Apresenta inúmeras características favoráveis para a produção e comercialização de sua madeira, tais como o rápido crescimento, rotação de ciclo curto e produção de biomassa renovável, com potencial para geração de biocombustível. Apesar de sua grande importância econômica, pouco é conhecido sobre os processos moleculares que envolvem a formação da madeira e casca, principalmente no que diz respeito ao metabolismo primário. Ademais, não se têm muitas informações sobre mudanças moleculares que ocorrem durante a formação desses tecidos em resposta a variações sazonais. Sabe-se que a região cambial das árvores apresenta maior atividade metabólica durante o verão, quando comparada ao inverno. Deste modo, visando compreender mudanças dinâmicas ao nível transcricional, protéico e metabólico, principalmente em relação ao metabolismo primário, o presente trabalho teve por objetivo comparar os tecidos da região cambial e casca, coletados em diferentes períodos climáticos (verão e inverno). A expressão do padrão transcricional foi analisada por PCR em tempo real, seguido de normalização e análise estatística, usando os programas *NormFinder* e *Rest*, respectivamente. O perfil protéico foi obtido por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), seguido de análise por espectrometria de massas associada a cromatografia líquida (LC-MS/MS) e posterior identificação das proteínas pelo programa *Mascot Daemon*. Já o perfil metabólico foi obtido por espectrometria de massas associada à cromatografia gasosa (GC/MS), com posterior análise dos picos identificados pelo programa *MatLab*. Em seguida, as análises estatísticas foram geradas pelo programa *SIMCA P+* e “R”. Para os transcritos, foi possível observar tanto para a região cambial quanto para a casca padrão diferencial na expressão dos genes analisados, principalmente aqueles atuantes na glicólise, durante os dois períodos sazonais. Quanto ao perfil protéico, foram identificadas um total de 77 e 75 proteínas estatisticamente significativas na região cambial e casca, respectivamente. Proteínas pertencentes ao metabolismo primário foram identificadas em ambos os tecidos. Metabólitos relacionados ao metabolismo de açúcares também foram encontrados.

Palavras-chave: Glicólise; Fermentação alcoólica; qPCR; Proteômica; Metabolômica

ABSTRACT

Evaluation of the primary metabolism of *Eucalyptus grandis* cambial region and bark

Eucalyptus genus is the most widely planted hardwood crop in the world because of its superior growth, broad adaptability and multipurpose wood properties. In today's "new carbon economy", eucalypts are receiving attention as fast-growing, short-rotation, renewable biomass crop for energy production. In spite of its economical importance, little information is available about the molecular changes that occur in primary metabolism in the wood and bark forming tissues. Furthermore, there is less information about molecular changes that occur during wood and bark formation in response to seasonal variation. It's known that *Eucalyptus* cambial region presents higher metabolic activity in summer than in winter. Thus, in order to observe the dynamic changes in transcript, protein and metabolite levels, mainly related to primary metabolism, we compared cambial tissue and bark collected in two different seasons (summer high temp + high rainfall) and winter (lower temp and little rainfall). Transcript expression patterns were analyzed by Real-Time PCR, normalization chosen by NormFinder and statistical analysis carried out using REST. The protein profile was obtained by bidimensional electrophoresis (2D-PAGE) followed by liquid chromatography associated with mass spectrometry (LC-MS/MS) and analyzed by Mascot Daemon. Metabolite profile was obtained by GC-TOF/MS, peaks were analyzed in MatLab and statistical analyses were done using SIMCA and "R". The results obtained with transcripts indicate differential gene expression in the cambial region and bark during summer and winter. A total of 77 and 75 proteins in cambium and bark, respectively, presented statistically significant alterations and were identified and classified into functional categories. We identified many proteins from primary metabolism. Metabolites from carbohydrate metabolism were also identified.

Keywords: Glycolysis; Alcoholic fermentation; qPCR; Proteomics; Metabolomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão esquemática da região cambial (STERKY et al., 1998)	36
Figura 2 - Representação esquemática da região cambial, evidenciando as etapas de diferenciação do xilema (SCHRADER et al., 2004).....	38
Figura 3 - Ilustração evidenciando os principais tecidos que compõem o tronco das árvores. Adaptado de The Columbia Encyclopedia, 2008.....	42
Figura 4 - Esquema ilustrando as três fases do Ciclo de Calvin-Benson: Carboxilação-durante a qual o CO ₂ é covalentemente ligado ao esqueleto carbônico, Redução-durante a qual é formado um carboidrato com gasto de ATP e Regeneração-ocorre a reconstituição do acceptor de CO ₂ a ribulose-1,5-bifosfato. Retirado de Taiz; Zeiger (2006).....	45
Figura 5 - Esquema ilustrando as principais fontes e drenos do CO ₂ no interior do caule das árvores. 1- Difusão do CO ₂ , a partir da casca externa (a), câmbio (b), xilema (c) e seiva (d). 2-Fixação do CO ₂ pela fotossíntese corticular, podendo ser usado CO ₂ de qualquer fonte (a, b, c e d). 3- Difusão de CO ₂ interno pelo fluxo respiratório. Retirado de Teskey et al., (2008)	46
Figura 6 - Visão geral da respiração vegetal aeróbia (TAIZ; ZEIGER, 2004).....	49
Figura 7 - Produção de compostos intermediários na respiração vegetal. Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2006).....	50
Figura 8 - Reações da glicólise e das vias fermentativas (ALVARENGA, 2004).....	53
Figura 9 - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) (ALVARENGA, 2004).....	55
Figura 10 - Coleta da região cambial de <i>E.grandis</i> , com seis anos. (A) Abertura de painel. (B) Coleta da região cambial por raspagem. (C) Secção transversal da madeira de <i>E. grandis</i> antes da remoção da casca. (D) Secção transversal da madeira de <i>E. grandis</i> após remoção da casca. Barras = 100 µm. X = xilema e C = região cambial. Adaptado de Celedon et al. (2007)	72
Figura 11 - Fórmula para o cálculo da concentração de RNA (µg µL ⁻¹). A _{260nm} absorvância a 260 nm, F _c : fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorvância no comprimento de onda de 260 nm correspondente a 40 µg RNA.mL ⁻¹ . F _d é o fator de diluição da amostra. O valor final é dividido por 1000 para expressar a unidade de concentração de RNA em µg µL ⁻¹ . Retirado de Sambrook et al. (1989).....	76
Figura 12 - Histograma apresentado pelo programa Mascot. A área sombreada em verde indica eventos aleatórios de <i>matching</i> , enquanto que o <i>outlier</i> (barra vermelha) fora da área sombreada com score 108 representa o evento não aleatório, ou seja, o <i>match</i> com maior probabilidade de identidade da proteína.....	84
Figura 13 - Parâmetros utilizados no programa MASCOT para identificação das proteínas	85

Figura 14 - Valores de estabilidade para os potenciais genes de referência fornecidos pelo programa *NormFinder*. TUB (tubulina), ACT (actina), MALD (malato desidrogenase) e ISOC (isocitrato desidrogenase) 89

Figura 15 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ALDO* (frutose bifosfato aldolase); *GPI* (glicose 6 fosfato isomerase); *PGK* (fosfoglicerato quinase); *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); *PK* (piruvato quinase); *PEPC* (fosfoenolpiruvatocarboxilase); *PFK* (fosfofrutoquinase-ATP-dependent); *ENO* (enolase); *PGM* (fosfoglicomutase); *PGAM* (fosfoglicerato mutase); *PDH* (piruvato desidrogenase); *SuSy1* (sacarose sintase 1); *SuSy3* (sacarose sintase 3); *PFP* (fosfofrutoquinase-PPI-dependente) 91

Figura 16 - Ilustração esquemática da glicólise e fermentação alcoólica. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão ou inverno, respectivamente 92

Figura 17 - Expressão relativa dos genes atuantes na fermentação alcoólica, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencialmente significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ADH1* (álcool desidrogenase 1); *ADH2* (álcool desidrogenase 2); *ADH3* (álcool desidrogenase 3); *PDC* (piruvato descarboxilase)..... 96

Figura 18 - Expressão relativa dos genes atuantes no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ISOCIT* (isocitrato desidrogenase); *SCL* (succinil CoA ligase); *MDHm* (malato desidrogenase mitocondrial) 97

Figura 19 - Ilustração esquemática do Ciclo dos Ácidos tricarboxílicos (TCA). Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam aqueles mais expressos durante o verão ou inverno, respectivamente 98

Figura 20 - Expressão relativa dos genes atuantes na fotossíntese, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *NADPme* (enzima málica-NADP); *CA* (anidrase carbônica); *RbcS* (rubisco subunidade menor); *RbcL* (rubisco

subunidade maior); *FBAcl* (frutose bifosfato aldolase cloroplastidial); *RPI* (ribose 5-fosfato isomerase) 99

Figura 21 - Ilustração esquemática da fotossíntese. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam aqueles mais expressos durante o verão e o inverno, respectivamente 100

Figura 22 - Análise por SDS-PAGE (mini-gel). Amostras de proteína total da região cambial de *E. grandis* resultante de extração fenólica. 1- marcador molecular (Kaleidoscope Bio-Rad), 2 e 3 – amostras da região câmbial coletadas no verão, 4 e 5 – amostras da região cambial coletadas no inverno. 103

Figura 23 - Géis bidimensionais ilustrando proteínas extraídas da região cambial de *E. grandis*, no período de verão (acima) e inverno (abaixo). Géis preparados na faixa de pH 4-7 e corados com *Coomassie Brilliant Blue* G-250 104

Figura 24 - Classificação funcional das proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*, significativamente e diferencialmente expressas durante o verão e inverno 106

Figura 25 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis* e pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 1. Metabolismo e energia. Os valores encontram-se expressos em função da razão Verão/Inverno. Barras em amarelo indicam proteínas mais expressas durante o verão e barras em roxo indicam as proteínas mais expressas no inverno..... 107

Figura 26 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 5. Vias de informação..... 108

Figura 27 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 4. Estrutura e Organização 109

Figura 28 - Representação esquemática da glicólise e da fermentação alcoólica. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados por qPCR mas não encontrados no gel 2D, na região cambial de *E. grandis*. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada..... 112

Figura 29 - Análise de carboidratos presentes na região cambial de *E. grandis*. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística (Teste Tukey $p < 0.01$) entre os períodos analisados (Janeiro – verão e Agosto – inverno)..... 116

Figura 30 - Ilustração demonstrando o alinhamento dos metabólitos individualmente no programa MatLab. Alinhamento das áreas de todas as amostras (18 no total) referentes ao metabólito Treonina..... 119

Figura 31 - Análise de Componentes Principais (PCA) para as amostras da região cambial coletadas nos períodos: Verão (*Summer*) e Inverno (*Winter*), realizado pelo programa SIMCA 120

Figura 33 - Histograma ilustrando os metabólitos identificados na região cambial de *E. grandis* que mais contribuíram para a separação das amostras, considerando-se os dois períodos de análise 121

Figura 33 - Resultado do teste de significância *HT-self*, executado pelo programa "R". A- metabólitos duas vezes mais abundantes no verão (círculos em verde) e inverno (círculos em preto, vermelho, azul escuro e azul claro). B- metabólitos 0,5 vezes mais abundantes no verão (círculos em azul escuro e rosa) e inverno (círculos em preto, verde, vermelho, azul claro e amarelo). C- metabólitos 0,3 vezes mais abundantes no verão (círculos em azul claro e escuro) e inverno (círculos em preto, amarelo, verde, vermelho, rosa). Diferentes metabólitos são representados pela mesma cor, dentro e entre as análises 122

Figura 34 - Mapa metabólico indicando as principais mudanças ocorridas na região cambial de *E. grandis*, relacionadas ao metabolismo primário. Retângulos coloridos indicam os metabólitos identificados por GC-MS significativamente acumulados no verão (amarelo) e inverno (roxo). Círculos coloridos indicam proteínas identificadas por gel 2D significativamente expressas no verão (amarelo) e inverno (roxo) e quadrados coloridos indicam transcritos analisados por qPCR significativamente acumulados durante o verão (amarelo) e inverno (roxo) 126

Figura 35 - Coleta da casca de árvores de *E. grandis*, com seis anos. (A) Abertura do painel. (B) Remoção da casca 137

Figura 36 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ALDO* (frutose bifosfato aldolase); *GPI* (glicose fosfato isomerase); *PGK* (fosfoglicerato kinase); *PK* (piruvato kinase); *PEPC* (fosfoenolpiruvato carboxilase); *PFK* (fosfofrutoquinase-ATP-dependente); *ENO* (enolase); *PGM* (fosfoglicomutase); *PGAM* (fosfoglicerato mutase); *PDH* (piruvato desidrogenase); *SuSy1* (sacarose sintase 1) *SuSy3* (sacarose sintase 3); *PFP* (fosfofrutoquinase-PPi-dependente) 140

Figura 37 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ADH2* (álcool desidrogenase 2); *ADH3* (álcool desidrogenase 3); *PDC* (piruvato descarboxilase) 141

Figura 38 - Ilustração esquemática da glicólise e fermentação alcoólica. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR, na casca de *E. grandis*. Setas em

amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão e inverno, respectivamente142

Figura 39 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ISOCIT* (isocitrato desidrogenase); *SCL* (succinil CoA ligase)143

Figura 40 - Ilustração esquemática do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA). Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR, na casca de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão e inverno, respectivamente143

Figura 41 - Expressão relativa dos genes atuantes na fotossíntese, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. Cores amarelo e roxo indicam aumento e redução da expressão, respectivamente. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *NADPme*- enzima málica-NADP; *CA*- anidrase carbônica; *RbcS*- rubisco subunidade menor; *RbcL*- rubisco subunidade maior; *FBAcl*- frutose bifosfato aldolase cloroplastidial; *RPI*- ribose 5-fosfato isomerase144

Figura 42 - Ilustração esquemática da fixação de carbono. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR, na casca de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam genes mais expressos durante o verão e o inverno, respectivamente145

Figura 43 - Análise por SDS-PAGE (mini-gel). Amostras proteína total da casca de *E. grandis* resultante de extração fenólica. 1- marcador molecular (Kaleidoscope Bio rad), 2 e 3 – amostras casca período verão e inverno146

Figura 44 - Gel bidimensional ilustrando proteínas extraídas da casca de *E. grandis*. Gel confeccionados na faixa de pH 3-10 e corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. A linha pontilhada indica a região de pH 4-7147

Figura 45 - Géis bidimensionais ilustrando proteínas extraídas da casca de *E. grandis*, no período de verão (acima) e inverno (abaixo). Géis confeccionados na faixa de pH 4- 7 e corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*148

Figura 46 - Classificação funcional das proteínas identificadas na casca, de *E. grandis*149

Figura 47 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na casca de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 1. Metabolismo e energia150

Figura 48 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na casca de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 5. Vias de Informação151

Figura 49 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 2. Processos Celulares..... 151

Figura 50 - Representação esquemática da glicólise e da fermentação alcoólica. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados com qPCR mas não encontrados no gel 2D. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada por qPCR. As setas indicam transcritos que foram analisados por qPCR. Setas em roxo indicam os transcritos mais abundantes no inverno e setas em amarelo indicam aqueles mais abundantes no verão..... 153

Figura 51 - Representação esquemática do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) na casca de *E. grandis*. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados com qPCR mas não encontrados no gel 2D. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada por qPCR. As setas indicam transcritos que foram analisados por qPCR. Setas em roxo indicam os transcritos mais abundantes no inverno e setas em amarelo indicam aqueles mais abundantes no verão 154

Figura 52 - Análise de carboidratos presentes na casca de *E. grandis*. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística (Teste Tukey $p < 0.01$) entre os dois períodos analisados (Janeiro – verão e Agosto – inverno)..... 156

Figura 53 - Ilustração demonstrando o alinhamento dos metabólitos, individualmente, no programa *MatLab*. Alinhamento das áreas, de todas as amostras (18 no total), referentes ao metabólito Uracil 159

Figura 54 - Análise de Componentes Principais (PCA), para as amostras da região cambial coletadas nos períodos: Verão (Summer) e Inverno (Winter), realizado no programa SIMCA 159

Figura 55. Histograma ilustrando os metabólitos, identificados na região cambial de *E. grandis*, que mais contribuíram para a separação das amostras, considerando os dois períodos de análise 160

Figura 56 - Resultado do teste de significância HT-self, executado pelo programa "R". A- metabólitos duas vezes mais abundantes no verão (círculos em verde) e inverno (círculos em preto, vermelho, azul escuro e azul claro). B- metabólitos 0,5 vez mais abundantes no verão (círculos em azul escuro e rosa) e inverno (círculos em preto, verde, vermelho, azul claro e amarelo). C- metabólitos 0,3 vez mais abundantes no verão (círculos em azul claro e escuro) e inverno (círculos em preto, amarelo, verde, vermelho, rosa). Diferentes metabólitos são representados pela mesma cor, dentro e entre as análises 161

Figura 57 - Mapa metabólico indicando as principais mudanças ocorridas na casca de *E. grandis*, relacionadas ao metabolismo primário. Retângulos coloridos indicam os metabólitos identificados por GC-MS significativamente acumulados no verão (amarelo) e inverno (roxo). Retângulos pontilhados indicam os demais metabólitos identificados não estatisticamente significativos. Círculos coloridos indicam proteínas identificadas por gel 2D significativamente expressas no verão (amarelo) e inverno (roxo) e quadrados coloridos indicam transcritos analisados por qPCR significativamente acumulados durante o verão (amarelo) e inverno (roxo)165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> sintetizados para realização de qPCR	73
Tabela 2 - Ranking de estabilidade dos genes candidatos a genes de referência obtido pelo programa <i>NormFinder</i>	89
Tabela 3 - Metabólitos identificados na região cambial de <i>E. grandis</i> pelo programa <i>ChromaTof</i>	118
Tabela 4 - Metabólitos significativamente abundantes na região cambial de <i>E. grandis</i>	123
Tabela 6 - Metabólitos identificados na região cambial de <i>E. grandis</i> , através do programa <i>ChromaTof</i>	158
Tabela 7 - Metabólitos significativamente abundantes na casca de <i>E. grandis</i>	162
Tabela 8 - Proteínas identificadas na região cambial de <i>E. grandis</i>	179
Tabela 9 - Proteínas identificadas na casca de <i>E. grandis</i>	183

LISTA DE SIGLAS

ACN - acetonitrila
ADH – álcool desidrogenase
ADP-G – ADP-glicose
ADK – adenosine quinase
AFLP – random amplification of polymorphic DNA
AMBIC – bicarbonate de amonio
ATP – adenosina trifosfato
BSA – albumina sérica bovina
CA- anidrase carbônica
CCoAOMT - cafeoil CoA O-metiltransferase
COMT - ácido caféico O-metiltransferase
C_q – ciclo de quantificação
CTAB- *bromuro*cetiltrimetil amônio
DEPC – dietil pirocarbonato
DTT- ditionitrol
EC – Enzyme Commission number for enzymes
EDTA - ácido etilendiaminotetraacético
ENO - enolase
EST – expressed sequence tag
FBA – frutose bisfosfato aldolase
FAD – flavina adenina dinucleotídeo
FADH – flavina adenina dinucleotídeo hidreto
Fru-6-P – frutose-6-fosfato
G-3P – gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Glc-1P – glicose-1-fosfato
Glc-6P – glicose-6-fosfato
GPI- glicose-6-fosfato isomerase
IAA- iodoacetamida
ISO – isocitrato desidrogenase
MDH – malato desidrogenase
miETC – Cadeia transportadora de elétrons

MSTFA - N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NADPme – enzima málica dependente de NAD

PCA – análise de componentes principais

PCR – reação da polimerase em cadeia

PDC – piruvato descarboxilase

PDH – piruvato desidrogenase

PEP – fosfoenolpiruvato

PEPC- fosfoenolpiruvato carboxilase

PFP- fosfofrutoquinase dependente de PPi

PGAM – fosfoglicerato mutase

PGK – fosfoglicerato quinase

PGM - fosfoglicomutase

Pi – ortofosfato

PIB – produto interno bruto

PK – piruvato quinase

PPi - fosfato inorgânico

PVP – polivinilpirrolidona

qPCR – PCR quantitativo

RAPD - amplificação randômica de fragmentos polimórficos de DNA

Rubisco – ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/ oxigenase

RbcL – rubisco subunidade maior

RbcS – rubisco subunidade menor

RPI – ribose-5-fosfato isomerase

SAGE - serial analysis of gene expression

SCL – succinil CoA ligase

SUSY – sacarose sintase

SDS – dodecil sulfato de sódio

TCA – Ciclo do Ácido Tricarboxílico

TMCS – trimetilclorosilano

UDP-G – UDP-glicose

UGPase – UDP-glicose-pirofosforilase

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro contribui com uma importante parcela da geração de produtos, tributos, divisas e empregos. Ademais, o setor é estratégico no fornecimento de matéria-prima para o desenvolvimento da indústria de base florestal. No Brasil, o eucalipto destaca-se como a principal espécie florestal plantada, representando 73% da área ocupada por plantios florestais. As espécies de eucalipto apresentam inúmeras características favoráveis para a produção e comercialização de sua madeira, o que permite sua ampla utilização como matéria-prima na indústria de papel e celulose, marcenaria, construção civil, entre outros. No entanto, apesar de sua grande importância econômica, pouco é conhecido sobre os processos metabólicos que ocorrem durante a formação da madeira e da casca e como estes tecidos respondem às diferenças sazonais do ponto de vista molecular. Trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas identificaram na região cambial de *Eucalyptus grandis* diversos transcritos e proteínas atuantes no metabolismo primário, tais como Rubisco (EC 4.1.1.39), sacarose sintase (EC 2.4.1.13), enolase (fosfopiruvato hidratase – EC 4.2.1.111), piruvato quinase (EC 2.7.1.40), álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1), 3-fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.13) entre outras (CELEDON et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; SALVATO, 2010). Visto que essa região é caracterizada por apresentar alta taxa de crescimento e por realizar metabolismo heterotrófico, estes dados indicam que o metabolismo glicolítico pode ser a principal rota de produção de energia (ATP) para a região cambial durante o desenvolvimento e formação da madeira. Além disso, também indica a provável ocorrência do metabolismo fermentativo e fotossintético, devido principalmente à expressão das enzimas álcool desidrogenase e rubisco. Embora a casca seja resultante do processo de divisão celular do câmbio vascular, poucos trabalhos analisaram este tecido por meio de técnicas moleculares. No entanto, considerando a casca como resíduo lignocelulósico passível de biotransformação, o que vem despertando o interesse da indústria e comunidade científica (BRAGATO, 2010), é de fundamental importância que este tecido seja também estudado do ponto de vista da biologia molecular.

Diante do exposto, e considerando a condição de hipoxia encontrada no tronco das árvores, a hipótese central examinada no presente trabalho propôs que a

glicólise e fermentação alcoólica tem papel fundamental na manutenção do metabolismo primário, da região cambial e casca de *E. grandis*, durante o período de rápido crescimento e intensa atividade metabólica – o verão. Consequentemente haveria uma reconfiguração do metabolismo primário em diferentes períodos sazonais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo geral estabelecer um panorama do metabolismo primário da região cambial e casca de *E. grandis* em resposta a dois períodos sazonais contrastantes: verão (período com maior disponibilidade hídrica) e inverno (período com menor disponibilidade hídrica). Para tanto, os objetivos específicos foram: 1) Identificação do padrão transcricional dos principais genes envolvidos na fotossíntese (fixação de carbono), respiração aeróbica e fermentação alcoólica na região cambial e casca nos dois períodos sazonais contrastantes; 2) Identificação das proteínas diferencialmente e preferencialmente expressas na região cambial e casca, estabelecendo o perfil protéico de ambos os tecidos; 3) Identificação do perfil metabólico primário da região cambial e casca nos dois períodos analisados.

Assim, foi possível estabelecer a correlação dos dados obtidos por diferentes técnicas, gerando uma visão global do metabolismo primário na região cambial e casca de *E. grandis* de maneira ainda não estudada. Ademais, os resultados apresentados servirão de base para a melhor compreensão do metabolismo primário em espécies arbóreas e para estudos mais detalhados a respeito do metabolismo primário em *E. grandis*.

Considerando-se que, no presente trabalho, foram analisados dois tecidos (região cambial e casca) por diferentes técnicas, optou-se por apresentar a tese na forma de capítulos, nos quais serão apresentados uma breve introdução, os protocolos utilizados, resultados e discussão. Para a contextualização dos assuntos abordados, será apresentada neste capítulo introdutório uma revisão de literatura sobre temas relacionados ao gênero *Eucalyptus*, sua importância econômica e metabolismo primário.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 O Setor Florestal, o Eucalipto e sua importância econômica

As florestas podem ser consideradas um modelo de infra-estrutura natural, fornecendo tanto serviços ecológicos quanto matérias para a sociedade. Estima-se que mais de 50% das espécies dependem deste ecossistema (BRAND, 2005), que é responsável também por estocar mais de 650 bilhões de toneladas de carbono (FAO, 2010a). As florestas cobrem 31% da área mundial (4 bilhões de hectares), sendo que Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China detêm mais de 50% deste território. Considerando-se a área florestal total, estima-se que 36% seja ocupada por florestas primárias, 57% por florestas naturalmente regeneradas e 7% por florestas plantadas (FAO, 2010a).

A nível mundial, o setor florestal emprega direta e indiretamente 13,7 milhões de pessoas (1% dos trabalhadores) e é responsável por 0,4% do PIB (ILO, 2011). Entre 2005 e 2010, a área florestal mundial plantada aumentou em 5 milhões de hectares e é principalmente destinada à produção de madeiras, fibras, combustíveis e produtos não madeireiros (FAO, 2010b). No Brasil, o setor florestal contribui com uma importante parcela da geração de produtos, tributos e empregos. Ademais, o setor é estratégico no fornecimento de matéria-prima para o desenvolvimento da indústria de base florestal. Os tributos arrecadados pelos segmentos associados às florestas plantadas corresponderam a R\$ 7,6 bilhões em 2011, o que representa 0,51% da arrecadação nacional. Nesse mesmo ano, o setor manteve 4,7 milhões de empregos diretos (0,6 milhões), indiretos (1,5 milhões) e empregos resultantes do efeito-renda (2,61 milhões) (ABRAF, 2012). Os produtos florestais brasileiros são considerados altamente competitivos no mercado internacional, com as exportações apresentando crescimento contínuo nos últimos anos (SANTIN; REIS; 2007). Em 2011, as exportações atingiram o montante de US\$ 8,0 bilhões, sendo celulose, papel e compensados os principais produtos exportados (ABRAF, 2011). A maior parte da madeira produzida no país é destinada à produção de celulose (36,1%), seguido pela produção de serrados (15,2%), siderurgia (10%), carvão vegetal (7,4%), painéis de madeira industrializada e compensados (3,7%). O restante (26,3%) é destinado à produção de lenha e outros produtos florestais (ABRAF, 2011).

No Brasil, o eucalipto é cultivado em escala comercial e destaca-se como a principal espécie florestal plantada. Em 2011, a área ocupada por plantios florestais totalizou 6.515.844 ha, sendo 74,8% correspondentes ao plantio de *Eucalyptus* spp, com produtividade média de 40,1 m³/ha.ano (ABRAF, 2012). Os maiores plantios de

Eucalyptus spp são encontrados nos estados de Minas Gerais (28,8%), São Paulo (21,2%), Bahia (12,5%), Mato Grosso do Sul (9,8%), Rio Grande do Sul (5,7%), Espírito Santo (4,1%) e Paraná (3,9%). Entre as espécies mais utilizadas estão *E. grandis* (55%), *E. saligna* (17%), *E. urophylla* (9%), *E. viminalis* (2%) e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (11%) (Revista da madeira, 2001).

As espécies de eucalipto apresentam inúmeras características favoráveis para a produção e comercialização de sua madeira, tais como alta produtividade, ampla diversidade de espécies e grande capacidade de adaptação. Deste modo, o eucalipto é empregado para diversas finalidades, como produção de celulose, papel, postes, energia, chapas, lâminas, compensados, aglomerados, carvão vegetal, madeira serrada, móveis e óleos essenciais (MORA; GARCIA, 2000).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, englobando cerca de 700 espécies (MATSUMOTO et al., 2000), com genótipos adaptados a diversas condições climáticas e de solo (PRYOR, 1976). O eucalipto é uma planta perene, originária da Austrália e ilhas próximas, onde ocorre naturalmente desde o nível do mar até as regiões montanhosas (WILLIAMS; WOINARSKI 1997).

As flores do eucalipto são hermafroditas, onde insetos, aves e mamíferos são os principais agentes polinizadores (HOUSE, 1997). As espécies são monóicas, preferencialmente alógamas, com sistema misto de reprodução, podendo ocorrer até 30% de autopolinização. A alogamia é favorecida pela protandria e presença de barreiras pré e pós-zigóticas à autopolinização (PRYOR, 1976; POUND et al., 2003). Geralmente as espécies de eucalipto possuem número cromossômico $2n=22$ (BACHIR; ABDELLAH, 2006).

Após ser descoberto por europeus no século XVIII, o eucalipto foi levado para diferentes países (Índia, França, Chile, África do Sul, Brasil e Portugal), onde foi rapidamente empregado nas plantações florestais (ELDRIGE et al., 1993) devido ao seu rápido crescimento, alta produtividade e grande capacidade de adaptação (MYBURG et al., 2007). Acredita-se que, no Brasil, o eucalipto passou a ser plantado em grande escala para fins comerciais no início do século XX, como uma iniciativa da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (MORA; GARCIA, 2000). Na década de 50, o eucalipto passou a ser usado como matéria-prima no abastecimento das fábricas de papel e celulose. A produção de eucalipto teve um crescimento expressivo durante as décadas de 60, 70 e 80, período marcado pelos incentivos fiscais ao setor florestal, que perdurou até 1986 (DOSSA et al., 2002).

O período de 1980 a 1995 caracterizou-se pelo abandono das estratégias de melhoramento genético, dando-se grande ênfase à propagação clonal. Os híbridos interespecíficos *E. grandis* x *E. urophylla* passaram a receber atenção especial. Neste período em que todos os esforços foram dedicados à estaquia, as empresas buscaram adaptar seus genótipos às novas regiões geográficas (CARVALHO, 2010).

Na última década, houve a substituição da macro-propagação pela micropropagação. As empresas perceberam também o equívoco do abandono dos programas de melhoramento genético e intensificaram os programas de seleção, com grande ênfase à seleção recorrente recíproca, visando melhorar suas populações para a obtenção de híbridos interespecíficos superiores. As técnicas biotecnológicas também passaram a fazer parte dos programas de melhoramento, principalmente o uso de marcadores moleculares (CARVALHO, 2010).

1.1.2 Melhoramento genético florestal

O melhoramento genético florestal é relativamente novo, alcançando o seu maior desenvolvimento a nível mundial a partir de 1950 e nacional a partir de 1967, com a implantação da lei de incentivos fiscais ao reflorestamento (RESENDE, 1999). As espécies perenes possuem aspectos biológicos peculiares, os quais tornam seu melhoramento bastante diferenciado. Diferentes fatores dificultam a execução das técnicas clássicas de melhoramento, tais como sobreposição de gerações, grande período necessário para o ciclo reprodutivo, reprodução sexuada e assexuada e expressão de caracteres ao longo de várias idades (RESENDE, 2001).

As principais características que o melhoramento florestal tem objetivado são referentes ao incremento do crescimento, da produtividade (madeira, fibras, energia renovável), alterações das propriedades químicas da madeira (teor e tipo de lignina e celulose), modificações das propriedades físicas da madeira (ângulo de fibras, espessura de parede), melhoramento visando a resistência a doenças, tolerância a estresses abióticos (geadas, seca, salinidade), melhoria na capacidade fotossintética, dos caracteres fisiológicos; uso em biorremediação, produção de compostos farmacêuticos, alterações na arquitetura da árvore (ramos, nós, interceptação de luz), dentre outros (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

De modo geral, um programa de melhoramento genético florestal parte de uma população-base ou experimental, a partir da qual a seleção será implantada.

Essa população selecionada será utilizada como base para a produção de sementes ou mudas clonais, além de servir para a recombinação em novos cruzamentos (RESENDE, 1999). Neste contexto, uma das dificuldades encontradas é o longo período para a obtenção de um ciclo de melhoramento. Visando contornar este problema, algumas empresas utilizam processos de hibridização *indoor*, onde plantas de eucalipto são cultivadas em vasos e têm seu florescimento estimulado precocemente por meio de técnicas de poda e reguladores de crescimento, como se fossem *bonsais* (GOLLE et al., 2009). O cruzamento entre plantas perenes tem sido utilizado para a obtenção de características de interesse da madeira e polpa, as quais apresentam herdabilidade de média e alta magnitude. No entanto, a baixa variabilidade encontrada nas espécies tradicionalmente plantadas em nosso país torna-se um empecilho para a obtenção de indivíduos superiores no desempenho industrial (ASSIS, 2008). Assim, dentre os métodos mais utilizados para o melhoramento, está a seleção de árvores-elite e a sua propagação por meio de clonagem. Plantios clonais oferecem vantagens para a produtividade devido a seus ganhos genéticos, que podem ser aditivos por meio de seleção massal e propagação de indivíduos-elite (SUTTON, 2002). São construídos os jardins clonais, ou mini-jardins clonais, ou ainda pode ser realizada micropropagação. Antes do plantio, os clones são submetidos a testes clonais, o que consiste em plantá-los em diferentes condições no intuito de confirmar a superioridade existente no material genético (ALFENAS et al., 2004).

Deste modo, a associação de métodos biotecnológicos aos programas de melhoramento clássico de arbóreas facilitaria a seleção e produção de genótipos superiores, resultando no incremento da produtividade do setor. Assim, a biologia molecular insere-se como uma importante ferramenta a ser utilizada dentro dos programas de melhoramento, por exemplo, pelo uso de marcadores moleculares para seleção assistida e pela transformação genética (CAMPBELL et al., 2003). No melhoramento do eucalipto, os marcadores moleculares são principalmente utilizados na identificação de clones, mas também na caracterização da variação genética em bancos de germoplasma e na análise de distância genética. Diversas tecnologias são usadas para esta finalidade, tais como amplificação randômica de fragmentos polimórficos de DNA (RAPD), polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado (AFLP), microarranjos de DNA e microsatélites co-dominantes (GRATTAPLAGLIA; KIRST, 2008). Em relação ao desenvolvimento do eucalipto

transgênico, a principal limitação encontrada se deve à recalcitrância em relação à transformação e à baixa capacidade de regeneração. Transformantes estáveis foram obtidos apenas para algumas espécies: *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. grandis* e híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* (GONZÁLEZ et al., 2002; POKE et al., 2005). No entanto, as informações obtidas com a transformação de *eucalyptus*, até o presente momento, apontam para um futuro promissor, considerando-se tanto o estabelecimento de plantas estáveis quanto os dados biológicos obtidos (GRATTAPLAGIA; KIRST, 2008).

1.1.3 Biossíntese da Madeira (Xilogênese)

A madeira pode ser definida como um conjunto de células do xilema secundário que são acumuladas ao longo do desenvolvimento das espécies lenhosas (LARSON, 1994). É um dos principais constituintes da biomassa vegetal, representando uma importante fonte de energia (DEMURA; FUKUDA, 2007; RENGEL et al., 2009). Diferentes autores creditam à madeira significativo papel no desenvolvimento sustentável como fonte renovável e ambientalmente aceita de fibras e madeira processada (PLOMION, 2001; DEMURA; FUKUDA, 2007). A madeira é basicamente composta por polissacarídeos (celulose (40%-50%) e hemicelulose (25%)), ligninas (25%-35%), proteínas de parede, compostos solúveis (estilbenos, flavonóides, taninos e terpenóides) e compostos insolúveis (pectinas) (HIGUCHI, 1997). Sua complexa composição a torna um excelente material para a chamada “indústria ligno-química”, que poderá substituir a indústria petroquímica no fornecimento não só de plásticos e produtos químicos, mas também produtos alimentícios e têxteis (PLOMION, 2001; SOLOMON, 2010).

Em espécies arbóreas a presença da madeira é determinante, pois confere suporte mecânico e transporte de água e minerais da raiz para a parte aérea através das células do xilema. Sua formação é um processo derivado do crescimento secundário, que se dá pelo câmbio vascular (PLOMION et al., 2001).

O câmbio vascular é um meristema secundário derivado do procâmbio, desenvolvendo-se a partir do meristema apical (LARSON, 1994). Este tecido tem importante função, promovendo o crescimento radial em gimnospermas e angiospermas (PLOMION, 2001). Ademais, a atividade cambial assegura o ciclo de vida perene pela renovação regular de células funcionais do xilema e floema (PLOMION, 2001). O câmbio vascular é geralmente descrito como uma camada

única de células, denominadas células iniciais, que podem ser de dois tipos morfológicos, fusiformes ou radiais (LARSON, 1994). As células iniciais fusiformes dividem-se longitudinalmente, produzindo por divisões periclinais células-mãe do xilema e do floema. Estas células dividem-se originando dois tipos de tecido vascular secundário: o xilema, formado em direção à medula, e o floema, em direção à casca (Figura 1). Já as células iniciais radiais originam camadas celulares essenciais para o transporte de nutrientes entre o xilema e o floema (PLOMION, 2001).

Novas células iniciais, células filhas, são formadas a partir das células iniciais fusiformes por meio de divisões anticlinais subseqüentes, permitindo o aumento em circunferência do câmbio. As células-mãe do xilema dividem-se com maior frequência que às do floema, o que explica a discrepância existente entre a quantidade de células que compõem os dois tecidos (PLOMION, 2001).

Considerando-se a dificuldade em distinguir as células-mãe do xilema e floema das células iniciais radiais e fusiformes, a região ocupada por estes tipos celulares é denominada “região cambial” (LARSON, 1994; SCHRADER et al., 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Visão esquemática da região cambial (STERKY et al., 1998)

A formação da madeira tem início com a diferenciação das células filhas do xilema, processo que pode ser compreendido em quatro etapas (Figura 2): (1) divisão celular/expansão celular, (2) síntese da parede celular, (3) lignificação e (4) morte celular programada (LARSON, 1994; PLOMION, 2001).

Inicialmente, as células expandem-se radial e longitudinalmente até atingirem seu tamanho final, durante a síntese de parede celular primária. Os principais reguladores desta etapa são xiloglicanas, endoglicanases, expansinas, pectinas metil-esterases e pectinases. Uma vez que a expansão celular tenha sido finalizada, tem-se o início da formação da parede secundária, processo coordenado pela expressão de genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos (celulose, hemicelulose), ligninas, proteínas de parede, compostos solúveis (flavonóides, estilbenos, taninos e terpenóides) e compostos insolúveis (pectinas e proteínas de parede). A parede secundária é dividida em três camadas diferentes: S_1 , S_2 e S_3 (TIMELL, 1982). Cada uma dessas camadas é composta por microfibrilas de celulose, alinhadas e ordenadas paralelamente umas às outras. As três camadas podem ser modificadas durante a maturação celular, por exemplo, sofrendo alterações em seu conteúdo de ligninas e celulose depositado na parede secundária (PLOMION, 1991).

Em seguida, inicia-se lignificação da parede celular (HIGUCHI, 1997). A lignina, polímero fenólico complexo, incorpora a matriz de polissacarídeos, fornecendo rigidez à madeira e constituindo uma superfície hidrofóbica necessária ao transporte de água (PLOMION, 2001). Com a finalização desta etapa, os elementos condutores do xilema sofrem morte celular programada pela participação de hidrolases (proteases, nucelases e RNases) (ROBERTS; McCANN, 2000). Durante este processo, há perda de todo o conteúdo celular, levando à formação de uma unidade contínua de vasos condutores do xilema (GROOVER; JONES, 1999).

Figura 2 - Representação esquemática da região cambial, evidenciando as etapas de diferenciação do xilema (SCHRADER et al., 2004)

Durante estas etapas, as células sofrem mudanças em sua estrutura e composição química, propiciando à madeira uma composição celular bastante diversificada, que depende tanto do estágio de desenvolvimento celular quanto das perturbações bióticas, abióticas ou genéticas (MEGRAW, 1985).

Como resultado do crescimento radial e diferenciação celular, o tronco de muitas espécies arbóreas tem duas regiões distintas: o alburno, que compreende à porção vascularmente ativa do xilema, e o cerne, definido como a “porção central morta” do eixo lenhoso, fornecendo somente suporte mecânico à árvore (HAN, 2001).

O tecido cambial é uma rica fonte de transcritos e proteínas envolvidos nestes processos (MELLEROWICZ et al, 2001). Ademais, sabe-se que existe uma forte relação entre determinadas classes de genes expressos e os processos de desenvolvimento, associados aos diferentes estádios e tecidos da região cambial (SCHRADER et al, 2004). Tal fato corrobora a hipótese de que a transcrição é um ponto-chave na regulação do crescimento secundário (DU; GROOVER, 2010). Em

trabalho realizado com *Populus tremula* x *P. tremuloides*, a região cambial foi subdividida em seis seções, considerando-se os diferentes estádios de desenvolvimento da xilogênese. Pela análise por microarranjo, foi verificado que a regulação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de ligninas e celulose, fatores de transcrição, expansão celular e biossíntese de parede celular primária está estritamente relacionada com os diferentes estádios da xilogênese (HERTZBERG et al., 2001).

Trabalho similar realizado com *E. grandis* e utilizando a técnica de AFLP (polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados) resultou na análise de 6385 fragmentos de transcritos, dos quais 21% foram diferencialmente expressos, sendo agrupados em clusters. Destes, 71 fragmentos representando diferentes clusters foram analisados e permitiram a identificação de genes envolvidos na transdução de sinais e biossíntese de parede, processos intimamente relacionados à xilogênese (RANIK; CREUX; MYBURG, 2005).

Visando identificar os principais genes envolvidos na formação da madeira em *E. grandis*, Paux et al. (2004) realizaram análise funcional de genes preferencialmente expressos no xilema e verificaram que 25% dos ESTs, que possuíam similaridade com proteínas conhecidas, pertenciam a duas classes: sinalização mediada por auxina e remodelamento da parede celular. Resultados complementares foram gerados por Foucart et al. (2008) que, com base na construção de biblioteca subtrativa de xilema *versus* floema, identificaram 87 unigenes preferencialmente expressos no xilema, pertencentes a diferentes categorias funcionais, tais como hormônios, metabolismo e sinalização, espessamento da parede celular secundária e proteólise. Em trabalho anterior, realizado em nosso grupo de pesquisa, foi analisado o perfil de expressão da região cambial de *E. grandis* de árvores com três e seis anos, utilizando-se a técnica SAGE (análise seriada da expressão gênica). Identificaram-se 445 genes relacionados à biossíntese de celulose, metabolismo de nucleotídeos, de açúcares e ligninas, assim como genes pertencentes a processos metabólicos gerais e à regulação celular (CARVALHO et al., 2008).

A utilização de técnicas de biologia molecular no estudo da xilogênese em arbóreas é recente, sendo os primeiros trabalhos realizados com *Pinus* (ZHANG; CHIANG, 1997) e *Populus* (STERKY et al., 1998) e, mais recentemente, com *Eucalyptus* (PAUX, et al., 2004). Os estudos moleculares da formação da madeira

têm focado em quatro abordagens principais: (1) identificação de novos genes associados a este processo, por meio da indução da xilogênese em *Arabidopsis*, *Zinnia elegans* e *Populus*, (2) uso de mutantes de *Arabidopsis* na caracterização da função de genes sabidamente envolvidos na formação da madeira, (3) caracterização do padrão de expressão gênica em função das etapas específicas do processo de diferenciação e/ou estádios de desenvolvimento da planta, (4) indução da formação do lenho de reação.

1.1.4 Sazonalidade do Câmbio

A atividade cambial é geralmente relacionada à alternância das estações climáticas (verão/ inverno, chuva/ seca) (LACHAUDA, CATESSONB, BONNEMAIN, 1999). Assim como os meristemas apicais, o câmbio pode sofrer dormência durante períodos de estresse (ANGYALOSSY; MARCATI, 2006). Nas regiões de clima temperado, o crescimento secundário ocorre durante a primavera e verão, pois as baixas temperaturas do inverno induzem à dormência do câmbio (OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com a terminologia usada por Coleman; Riding; Little (1984), a dormência inicia-se com a parada da atividade meristemática e continua até que a divisão celular seja reiniciada. Durante as primeiras semanas de dormência, o câmbio deixa de produzir seus derivados, mesmo em condições favoráveis. Este período encerra-se com a recuperação gradual da capacidade do câmbio produzir tecido vascular novo quando as condições climáticas são compatíveis. Assim, o câmbio é considerado um tecido quiescente.

Ainda durante a dormência, há significativa atividade metabólica, onde compostos como açúcares, proteínas, aminoácidos, taninos e amido são acumulados (LACHAUDA; CATESSONB; BONNEMAIN, 1999). Durante este período a divisão celular cessa, resultando em uma região cambial mais estreita em relação ao câmbio formado nos períodos mais favoráveis ao crescimento. Já em regiões tropicais, a disponibilidade hídrica para a planta induz uma sazonalidade cambial. Períodos de dois a três meses contínuos de seca, com precipitações mensais inferiores a 50 mm, levam à redução da atividade cambial, a qual depois é retomada nos períodos em que as precipitações mensais são superiores a 50 mm (ANGYALOSSY; MARCATI, 2006). Oliveira et al. (2011), pela técnica de densitometria de raio X, verificaram correlação positiva entre os dados de precipitação e o incremento anual da madeira em *E. grandis*. Esta correlação

positiva indica que, quando um ano apresenta maior volume de chuvas, o crescimento da árvore é favorecido (OLIVEIRA et al., 2011).

Apesar da influência que a sazonalidade exerce na atividade cambial, estudos moleculares a respeito das mudanças ocorridas nesta região são voltados para espécies de regiões temperadas, enfatizando muitas vezes a aclimação ao frio (SCHRADER et al., 2004; YANG et al., 2004; GRICAR; CUFAR, 2008; LI; WU; SOUTHERTON, 2010).

Embora a madeira tenha fundamental importância econômica e ambiental, existe pouco conhecimento sobre os fatores genéticos envolvidos na formação deste tecido (PLOMION et al., 2001., HAN, 2001). Deste modo, o enfoque atual é compreender como os genes envolvidos na formação do xilema secundário influenciam o fenótipo final da madeira (YANG et al., 2004; SPICER; GROOVER, 2010). Para tanto, é preciso entender como se dá o processo de regulação desses genes, considerando-se que o xilema em diferenciação é uma fonte rica de DNA, RNA e proteínas envolvidas na síntese de diversos compostos da parede (LEV-YADUN; SEDEROFF, 2000).

Resultados obtidos por Schrader et al. (2004) sugerem que a transcrição é o primeiro nível de regulação do crescimento secundário. Em estudo de expressão gênica por microarranjo de seções transversais retiradas do caule de *Populus* spp., os autores encontraram grande correlação entre eventos de desenvolvimento (divisão e expansão celular, síntese de parede celular) e a expressão de genes dos grupos funcionais correspondentes (ciclinas, expansinas, genes relacionados a via da lignina). O seqüenciamento genômico da espécie *Populus trichocarpa* (TUSKAN et al., 2006) vem possibilitando o desenvolvimento de ferramentas moleculares e genômicas específicas para análise do crescimento secundário em arbóreas. Assim, a aplicação destas ferramentas tem possibilitado a identificação de genes-chave, fatores de transcrição, hormônios e mecanismos que circundam o crescimento secundário (revisado em SPICER; GROOVER, 2010; DU; GROOVER; 2010).

1.1.5 Formação da Casca

A casca pode ser, anatomicamente, definida como o conjunto de tecidos situados externamente ao câmbio, podendo incluir tecidos de origem primária e secundária (ANGYALOSSY; MARCATI, 2006).

Após o caule completar seu crescimento, o mesmo é coberto por uma epiderme que recobre o córtex parenquimático. Durante algum tempo, os tecidos da epiderme e córtex podem crescer radialmente por divisão anticlinal e expansão celular. A divisão celular inicia a formação de um novo meristema lateral, o felogênio, cujas células iniciais originam um grande número de células derivadas para o lado externo, formando o súber ou felema, e um número menor de células para o lado interno, formando a feloderme. O felogênio, juntamente com seus dois tecidos derivados, constitui a periderme, tecido de proteção localizado no córtex externo. O felema é um tecido morto que atua protegendo as porções vivas subjacentes dos caules e ramos, sendo um excelente isolante utilizado na manufatura de painéis isoladores. A casca externa, denominada ritidoma, é constituída por uma série de peridermes e uma quantidade variável de tecido (córtex e floema secundário). Já a casca interna refere-se a todos os tecidos da face externa da zona cambial até a periderme mais interna, incluindo o floema funcional e o floema não funcional (Figura 3) (MORA, 2001).

Figura 3 - Ilustração evidenciando os principais tecidos que compõem o tronco das árvores. Adaptado de The Columbia Encyclopedia, 2008

A composição química da casca é muito variável entre as espécies. Dentre seus extratos, substâncias polares como taninos, polifenóis e glicosídeos são geralmente de três a cinco vezes mais abundantes que as não polares, como

gorduras, ceras, terpenos, esteróides entre outros (USDA, 1971). No eucalipto, a casca apresenta alto teor de sais minerais (cálcio, nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio), variando de 3 a 10% da massa seca (LADEIRA, 1999).

Este tecido é de grande importância para a árvore, pois protege o xilema contra danos mecânicos e o preserva contra ações do ambiente. É também pela casca que a seiva, rica em nutrientes, é translocada pelo caule da planta. Esta seiva é composta por açúcares (sacarose, frutose, glicose, manitol e sorbitol), proteínas, extrativos, ácidos graxos, aminoácidos e nutrientes minerais (cálcio, potássio, ferro, manganês, magnésio, fósforo etc.) (USDA, 1971; FOELKEL, 2010).

É importante ressaltar também que, com base no novo cenário energético mundial, a utilização de fontes renováveis para a produção de biocombustível tem sido fortemente incentivada (BRAGATTO, 2010) não só por motivos ambientais (ex. diminuição da poluição do ar atmosférico), mas também devido a riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo por países politicamente instáveis (BASTOS, 2007). A biomassa lignocelulósica vem sendo, também, amplamente estudada quanto a sua capacidade para conversão em biocombustível. Dentro deste contexto, a casca de eucalipto, enquanto resíduo lignocelulósico florestal e por apresentar características químicas favoráveis (ex. carboidratos solúveis), tem alto potencial para ser utilizada como fonte de biomassa para a produção de etanol de primeira geração (BRAGATTO 2010). Tal fato justifica a necessidade de maiores estudos quanto aos aspectos fisiológicos e moleculares deste tecido.

1.1.6 Fotossíntese Cortical

De modo generalizado, organismos fotossintetizantes são aqueles capazes de utilizar a energia solar para converter moléculas simples, tais como CO₂ e água, em compostos de alta energia (ATP e NADPH), os quais são utilizados para a síntese de carboidratos, nas reações de fixação do carbono (TAIZ; ZEIGER, 2006)

Nas plantas superiores, o carbono fixado durante a fotossíntese pode ser prontamente metabolizado, gerando energia e esqueleto carbônico, que serão consumidos durante a respiração celular e crescimento, ou pode ser exportado principalmente como sacarose para outros órgãos, onde irá suprir o desenvolvimento dos tecidos, ou fornecer fotoassimilados para a síntese de compostos de reserva. É importante ressaltar que, nas plantas superiores, os órgãos podem ser classificados em fonte e dreno (TURGEON, 1989). Os órgãos-fonte são

fotossinteticamente ativos e exportam os produtos fotoassimilados, sendo principalmente representados pelas folhas adultas. Já os órgãos-dreno são considerados, na sua maioria, fotossinteticamente inativos e desta forma importam os produtos resultantes da fixação do carbono (SONNEWALD; WILLMITZER, 1992).

A primeira etapa fotossintética, denominada fase fotoquímica, ocorre nos fotossistemas, localizados nos *grana* dos cloroplastos e é responsável pela conversão de energia luminosa em energia química. A luz absorvida é utilizada para impulsionar a transferência de elétrons por uma série de compostos que atuam como doadores e aceptores dessas partículas. Os fotossistemas oxidam a água a O_2 e reduzem $NADP^+$ a NADPH (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Na segunda etapa da fotossíntese, reações de carboxilação, o CO_2 é fixado pelo ciclo de Calvin-Benson, com a utilização do ATP e NADPH gerados na etapa anterior. O CO_2 é convertido a trioses-fosfato, que são transportadas para o citoplasma e destinadas à síntese de sacarose, principal carboidrato translocado, através do floema, dos tecidos-fonte para tecidos-dreno (KONISHI; OHMIYA; HAYASHI, 2004). Parte do carbono reduzido permanece nos cloroplastos para a síntese de compostos de reserva, tal como o amido, que é utilizado no metabolismo foliar durante a noite (MARTIN; SMITH, 1995).

O ciclo de Calvin-Benson ocorre em três etapas (1)- Carboxilação doceptor de CO_2 , ribulose-1,5-bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, o primeiro intermediário estável do ciclo de Calvin; (2)- Redução do 3-fosfoglicerato, formando gliceraldeído-3-fosfato; (3)- Regeneração doceptor de CO_2 , ribulose-1,5-bifosfato, a partir do gliceraldeído 3-fosfato (Figura 4) (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 4 - Esquema ilustrando as três fases do Ciclo de Calvin-Benson: Carboxilação-durante a qual o CO_2 é covalentemente ligado ao esqueleto carbônico, Redução-durante a qual é formado um carboidrato com gasto de ATP e Regeneração-ocorre a reconstituição do aceptor de CO_2 a ribulose-1,5-bifosfato. Retirado de Taiz; Zeiger (2006)

Embora as folhas sejam caracterizadas como os principais órgãos fotossintetizantes, a fixação de CO_2 tem sido observada em outros órgãos vegetais como pecíolos, flores e frutos, caule, casca e até mesmo raiz (ASCHAN; PFANZ, 2003). A atividade fotossintética no caule de arbóreas já foi descrita em 36 famílias NILSEN, 1995) e pode ser subdividida em duas categorias principais: fotossíntese caulinar, que ocorre principalmente em herbáceas, e fotossíntese da casca ou cortical, que ocorre em plantas superiores (ASCHAN; PFANZ, 2003). A fotossíntese cortical desempenha importante papel em recapturar o CO_2 liberado pela respiração, contribuindo para a reciclagem interna de CO_2 e para o balanço anual de carbono (ASCHAN; WITTMANN; PFANZ, 2001; FILIPPOU et al., 2007).

Visto que a fotossíntese cortical segue as mesmas regras da fotossíntese foliar para a assimilação e redução do CO_2 , são requeridos cloroplastos funcionais, enzimas, nutrientes, água, luz e CO_2 (ASCHAN; WITTMANN; PFANZ, 2001). A fotossíntese cortical ocorre em camadas do clorênquima localizadas sob a periderme. No caule, a clorofila é principalmente localizada no córtex, podendo também ser encontrada nas células-raio da madeira e na medula (ASCHAN; WITTMANN; PFANZ, 2001). Como mencionado anteriormente, nas plantas

superiores há a divisão entre tecidos-fonte e tecidos-dreno. No entanto, o tronco, assim como outros órgãos, pode ser considerado de dupla função, atuando tanto como dreno quanto como fonte, pois a fotossíntese que ocorre neste órgão elimina parcialmente o CO_2 produzido durante a respiração (ASCHAN; PFANZ, 2003) (Figura 5).

Figura 5 - Esquema ilustrando as principais fontes e drenos do CO_2 no interior do caule das árvores. 1- Difusão do CO_2 , a partir da casca externa (a), câmbio (b), xilema (c) e seiva (d). 2- Fixação do CO_2 pela fotossíntese corticular, podendo ser usado CO_2 de qualquer fonte (a, b, c e d). 3- Difusão de CO_2 interno pelo fluxo respiratório. Retirado de Teskey et al., (2008)

Parte do CO_2 liberado pelas células durante a respiração é diretamente eliminado para a atmosfera. Porém, 15 a 55% deste gás pode ficar aprisionado nas árvores, diariamente (TESKEY et al., 2008). A alta concentração de CO_2 no interior das arbóreas pode ser atribuída à existência de barreiras à difusão do gás no interior da casca e xilema. A concentração interna de CO_2 no caule varia temporalmente ao longo do dia e do período sazonal, de modo que há maior concentração do gás durante o período de crescimento das árvores, com decréscimo durante a dormência (EKLUND, 1993). Assim, a maior parte do CO_2 acumulado no tronco é originado pela respiração das células da raiz e do caule (TESKEY et al., 2008). Embora a

concentração de CO₂ no interior do caule seja bem maior do que a da atmosfera, a quantidade deste gás que é fixada pela fotossíntese corticular é sempre menor do que a realizada pelas folhas (TESKEY et al., 2008).

Estudos com seiva do xilema de *Juglans Regia* identificaram pH entre 5.2 e 6.8 (ALVES et al., 2004). Este ambiente ácido favorece a predominância de CO₂, com a concentração interna de O₂ variando entre 5 e 21% (PFANZ et al., 2002). Nestas condições, a função carboxilase da Rubisco é mais eficiente do que sua função oxigenase e, deste modo, a fotorrespiração caulinar deve ser muito reduzida ou inexistente. Wittmann et al. (2006) observaram que, no caule de *Betula pendulata*, a fotorrespiração provavelmente não ocorre.

Berveiller e Damesin (2008) encontraram em *Fagus sylvatica* menor atividade da Rubisco no caule, quando comparada a sua atividade na folha. No entanto, a máxima atividade enzimática nos dois órgãos ocorreu em abril, quando o conteúdo de clorofilas e a taxa de assimilação de CO₂ também foi máxima. Os mesmos autores identificaram alta atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e enzima málica dependente de NADP (NADP-ME) no caule. Em relação à PEPC, sua atividade foi 10 vezes maior no caule do que na folha (BERVEILLER; DAMESIN, 2008) e a razão PEPC:Rubisco foi de 2.5, valor intermediário ao encontrado em plantas com metabolismo C3 (0.1) e C4 (10). Uma provável explicação para a alta atividade de PEPC no caule é que esta enzima estaria fornecendo malato para a NADP-ME que, por sua vez, forneceria CO₂ para a Rubisco, processo similar ao encontrado em plantas C4 (BERVEILLER; DAMESIN, 2008).

Experimentos com *imunobloting* detectaram, na região cambial de *E. grandis*, a presença da subunidade maior da Rubisco (CELEDON et al., 2007). A subunidade maior contém o sítio catalítico da enzima, responsável pelas reações de carboxilase/oxigenase. No entanto, a Rubisco só é ativa na presença da subunidade menor, formando um complexo. Devido à ausência da subunidade menor, os autores não puderam inferir sobre a Rubisco estar ou não ativa no câmbio de *E. grandis*, deixando uma lacuna em relação ao estado funcional da enzima na região cambial.

1.1.7 Respiração Vegetal

Durante a fotossíntese as plantas utilizam a energia solar para a oxidação da H₂O, com a liberação de O₂ e simultaneamente a redução de CO₂ a carboidratos,

dos quais uma parte normalmente permanece armazenada na forma de amido (polissacarídeos insolúvel) ou sacarose (dissacarídeo solúvel). Neste contexto, a respiração atua de maneira complementar a fotossíntese, promovendo a oxidação controlada da sacarose, processo que resulta na produção de CO_2 e agentes redutores (NAD(P)H) por reações seqüenciais: glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (FIGURA 6). Durante a respiração aeróbica, há a transferência de elétrons do NAD(P)H, produzido durante a oxidação dos carboidratos, para a cadeia transportadora de elétrons (miETC), resultando no consumo de O_2 e produção de ATP (SIEDOW; DAY, 2000). O movimento de metabólitos através da membrana mitocondrial interna é catalisado por proteínas integrais de membrana, que operam como transportadores ou co-transportadores de fosfato (Pi), nucleotídeos de adenina (mono, dí e tricarboxílicos), aminoácidos e cofatores como o NAD^+ (TEGEDER; WEBER, 2006).

Do ponto de vista químico, a respiração vegetal pode ser expressa como a oxidação da molécula de 12 carbonos da sacarose e a redução de 12 moléculas de H_2O , resultando na seguinte reação líquida (TAIZ; ZEIGER, 2004):

A completa oxidação de uma molécula de sacarose rende energia livre correspondente a 1.380 kcal, a qual é utilizada no metabolismo celular para a biossíntese de inúmeras moléculas essenciais ao desenvolvimento e à produção vegetal.

Figura 6 - Visão geral da respiração vegetal aeróbica (TAIZ; ZEIGER, 2004)

Embora a respiração tenha por função básica gerar energia, alguns de seus compostos intermediários podem ser desviados para vias de biossíntese, servindo como esqueletos carbônicos para polissacarídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas e compostos do metabolismo secundário (Figura 6 e 7). Sabe-se que o controle e a regulação do metabolismo respiratório vegetal é bastante flexível (FERNIE; CARRARI; SWEETLOVE, 2004; PLAXTON; PODESTÁ, 2006). Deste modo, é proposto que tal flexibilidade tenha evoluído como uma adaptação essencial, auxiliando na aclimação a diferentes estresses aos quais as plantas são submetidas em seu ambiente natural (SIEDOW; DAY, 2000; PLAXTON; PODESTÁ, 2006).

Figura 7 - Produção de compostos intermediários na respiração vegetal. Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2006)

A partir de estudo com arbóreas, observou-se que a respiração na região cambial sofre alterações em função da sazonalidade. Altas taxas respiratórias ocorrem no verão, coincidindo com o período de crescimento das árvores (WIESER, 1997). Durante este período, o nível de oxigênio no caule é mínimo (2-8% v/v), aproximando-se do valor atmosférico (15-20%) durante o período de dormência (MUGNAI; MANCUSO, 2010). Sabe-se também que em órgãos jovens a taxa respiratória é maior. Em *Pinus densiflora*, galhos menores e jovens possuem maior taxa de respiração ($5-10 \text{ mg CO}_2 \text{ dm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) do que galhos com diâmetro superior a 10 cm ($2-5 \text{ mg CO}_2 \text{ dm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) (PFANZ et al., 2002).

Devido a sua interação com outros processos metabólicos, a respiração é considerada um dos pontos centrais do metabolismo, podendo ser compreendida sob três etapas principais: a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a cadeia

transportadora de elétrons (PLAXTON; PODESTÁ, 2006). Apesar do conhecimento sobre a organização estrutural desses processos, ainda existem lacunas a respeito dos pontos fundamentais sobre a regulação e controle de tais vias metabólicas (FERNIE; CARRARI; SWEETLOVE, 2004).

1.1.7.1 Glicólise

A glicólise pode ser brevemente definida como o primeiro passo da via glicolítica, ocorrendo tanto no citosol como nos plastídios. Envolve a conversão de carboidratos a hexoses-fosfato, que são posteriormente clivadas em duas trioses fosfato. Em uma fase subsequente e conservadora de energia, as trioses são oxidadas e rearranjadas até a produção de duas moléculas do ácido orgânico piruvato ou também de malato (Figura 8) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além de fornecer substrato para oxidação no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a glicólise também tem por função favorecer a hidrólise do amido, nos plastídios, para produzir estruturas carbonadas, agentes redutores e ATP para processos anabólicos, manutenção celular e síntese de ácidos graxos (MARENCO; LOPES, 2005). A glicólise pode ser considerada uma rota anfibólica, pois pode atuar de maneira reversa, produzindo hexoses a partir de compostos de baixo peso molecular, de maneira dependente de energia, processo conhecido como gliconeogênese (PLAXTON, 1996).

A glicólise é composta por uma complexa rede contendo reações enzimáticas paralelas a nível do metabolismo de sacarose, frutose-6-fosfato (Fru-6-P), gliceraldeído-3-fosfato e fosfoenolpiruvato (PEP). Essa rede glicolítica fornece opções metabólicas para a planta, visando facilitar seu desenvolvimento e aclimação a estresses ambientais como anoxia e limitação de ortofosfato (Pi) (PLAXTON, 1996). A PEP atua como regulador negativo sobre a fosfofrutoquinase-ATP-dependente. No entanto, este efeito inibitório é diminuído pela disponibilidade de fosfato inorgânico (PPi), fazendo da razão citosólica entre PEP e PPi um fator crítico no controle da atividade glicolítica vegetal. Assim, o controle glicolítico é do tipo *bottom up*, com a regulação primária no nível do metabolismo da PEP. Deste modo, um dos desafios da genética e fisiologia vegetal é elucidar as funções e os mecanismos de regulação dessas reações alternativas (PLAXTON, 1996).

Diferentes autores observaram mudanças na composição de carboidratos ao longo das estações do ano (revisado em ASHWORTH; STIRM; VOLENEC, 1993). Em *Cornus sericea*, foi observada alta concentração de amido no outono, chegando

a níveis mínimos no inverno, enquanto para açúcares solúveis a maior concentração ocorreu no inverno, com decréscimo na primavera (ASHWORTH; STIRM; VOLENEC, 1993). Os açúcares solúveis predominantes na casca e na região cambial são glicose, frutose, sacarose e rafinose. Embora o significado fisiológico deste acúmulo ainda não esteja bem estabelecido, evidências indicam que a presença desses açúcares relaciona-se ao aumento da resistência ao frio (ASHWORTH; STIRM; VOLENEC, 1993; KRASENSKY; JONAK, 2012).

Em experimento com microarranjos de cDNA, Solomon, Berger e Myburg (2010) analisaram o padrão transcricional na região cambial de *Eucalyptus*, com amostras coletadas em intervalos de quatro horas ao longo do dia. Os autores observaram que 8% dos genes exibiram padrão de expressão influenciado pelo dia, dentre os quais estão os envolvidos na alocação de carbono, sinalização hormonal, respostas a estresse e na glicólise. Em relação à via glicolítica, os genes da sacarose sintase, aldolase, enolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e piruvato quinase apresentaram flutuações no nível de transcritos em decorrência do ritmo circadiano. Ainda segundo os autores, a presença de relógios biológicos funcionais e a expressão de genes com padrão transcricional rítmico durante a xilogênese sugerem um importante papel para o controle temporal do desenvolvimento do xilema e do metabolismo em árvores de rápido crescimento.

Figura 8 - Reações da glicólise e das vias fermentativas (ALVARENGA, 2004)

1.1.7.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs representa a segunda fase da respiração aeróbia e ocorre na matriz mitocondrial. Consiste de uma série de reações que levam à completa oxidação do ácido pirúvico, com a produção de três moléculas de CO_2 (MARENCO; LOPES, 2005) (Figura 9). As principais funções do TCA são: a redução do NAD^+ e FAD a NADH e FADH_2 , respectivamente, os quais podem ser posteriormente oxidados na cadeia transportadora de elétrons promovendo a produção de ATP; síntese de ATP pela fosforilação a nível de substrato e formação de compostos carbonados intermediários, que podem ser usados pela célula em reações anabólicas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O ciclo inicia-se com a entrada do piruvato citosólico no interior da matriz mitocondrial, através de uma proteína transportadora específica. Na matriz, o piruvato é descarboxilado, passando por uma série de reações oxidativas que liberam NADH , CO_2 e acetil-CoA (TAIZ; ZEIGER, 2006). O TCA requer um *input* de acetil-CoA, que pode ser proveniente da β -oxidação de ácidos graxos, de produtos da glicólise ou da degradação de aminoácidos cetogênicos, dependendo do organismo ou tipo celular (SWEETLOVE et al., 2010).

A entrada contínua de acetil-CoA permite que o TCA mantenha um fluxo cíclico, de modo que os níveis de todos os intermediários permaneçam constantes e NADH e FADH_2 sejam gerados. No entanto, para que o ciclo desempenhe as demais funções, não é necessário que o fluxo seja cíclico, mas é preciso que seus intermediários sejam repostos pela rota anaplerótica para compensar a perda de carbono durante o ciclo (SWEETLOVE et al., 2010). Uma característica do TCA em vegetais é a presença da enzima málica dependente de NAD^+ , que cataliza a descarboxilação oxidativa do malato a piruvato, permitindo às mitocôndrias vegetais operarem rotas alternativas para o metabolismo do PEP, derivado da glicólise. Esta reação possibilita a completa oxidação dos intermediários do TCA (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 9 - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) (ALVARENGA, 2004)

1.1.7.3 Cadeia Transportadora de Elétrons

Na última etapa da respiração tem-se a cadeia transportadora de elétrons, que pode ser considerada o processo pelo qual o nível de energia dos elétrons é reduzido de maneira gradual e conservado na forma de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O oxigênio (O_2) é essencial comoceptor final de elétrons na via da fosforilação oxidativa, a qual fornece ATP para o metabolismo celular pela regeneração de NAD^+ a partir de NADH (FUKAO; BAILEY-SERRE, 2004).

1.1.7.4 Fermentação Alcoólica

As plantas exibem diferentes respostas adaptativas para evitar que seus tecidos sejam submetidos à condição de anoxia ou hipoxia, ausência ou baixa disponibilidade de oxigênio, respectivamente. Como exemplo, elas podem diminuir o

consumo de O_2 em resposta à baixa concentração deste gás. Esta resposta envolve a diminuição da respiração com concomitante decréscimo no consumo de ATP, resultando na inibição de muitos processos biossintéticos (GEIGENBERGER, 2003).

Em plantas superiores, o metabolismo anaeróbico é geralmente considerado um fenômeno transitório decorrente de fatores ambientais ou estruturais como inundações ou tecidos impermeáveis, respectivamente, que limitam o fornecimento de O_2 para a planta. O câmbio vascular de espécies arbóreas apresenta condições favoráveis para que a fermentação alcoólica ocorra. O crescimento secundário ativo nessa região exige grande consumo de energia, ou seja, grande quantidade de O_2 é requerida para a produção de energia pela respiração. No entanto, a região possui tensão de O_2 baixa o suficiente para que a respiração aeróbica seja total ou parcialmente inibida, resultando na produção de etanol (KIMMERER; STRINGER, 1988). A inibição da respiração é rápida e ocorre quando a atividade da citocromo oxidase encontra-se limitada pela disponibilidade de O_2 ($K_m [O_2] = 14 \mu M$, o que equivale a 0,013% de O_2). Nestas condições, a formação de ATP se dá pela fermentação alcoólica (GEIGENBERGER, 2003).

Tecidos vegetais em condições de anaerobiose são caracterizados pela presença da álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1) e piruvato descarboxilase (PDC – EC 4.1.1.1), enzimas responsáveis pela síntese de etanol (KIMMERER; STRINGER, 1988). Trabalhos têm identificado transcritos e proteínas relacionados à fermentação alcoólica em espécies arbóreas, incluindo *E. grandis* (GION et al., 2005, JUAN et al., 2006, CELEDON et al., 2007, CARVALHO et al., 2008). Kimmerer e Stringer (1988) detectaram a presença de ADH e PDC na região cambial de diferentes espécies arbóreas, evidenciando o metabolismo fermentativo no câmbio vascular. No entanto, em *Populus*, a concentração de etanol e ADH na região cambial foi inversamente proporcional, indicando que a ADH possa atuar na degradação do etanol e não só na sua produção (KIMMERER; STRINGER, 1988; HARRY; KIMMERER, 1991). Acredita-se que o etanol produzido resultante da fermentação seja metabolizado pela ADH e PDC, permitindo a eficiência respiratória máxima, com maior aproveitamento do carbono. Ademais, O etanol pode ser convertido a acetaldeído, e posteriormente a acetato e acetil-CoA, que podem retornar ao metabolismo no TCA ou síntese de lipídeos (MACDONALD; DONALD, 1993). Esta possibilidade é importante, pois permite a geração de maior quantidade

de energia a partir do processo fermentativo, a qual poderá ser disponibilizada para o tecido cambial em crescimento.

1.1.8 Fluxo Metabólico

O fluxo de qualquer via metabólica é dependente da atividade individual das enzimas envolvidas (PLAXTON, 1996). No caso da glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de elétrons, que são vias intimamente interligadas, há também uma série de mecanismos metabólicos responsáveis por regular e integrar essas vias (PLAXTON, 2006). Estes mecanismos podem ser divididos em dois grupos principais: controle com resposta a longo prazo e controle com resposta instantânea, com base no tempo necessário para promoverem mudanças na velocidade de reação de uma dada enzima (PLAXTON, 2006).

O controle metabólito abrupto se dá com a alteração de toda população de enzimas pela alteração de sua taxa de biossíntese ou proteólise, ocorrendo mais freqüentemente durante a diferenciação dos tecidos em resposta a mudanças adaptativas. Este controle é uma resposta a longo prazo e energeticamente dispendiosa para o metabolismo, ocorrendo por alterações em toda população de enzimas. Assim, qualquer alteração na taxa de expressão gênica (transcrição, tradução, processamento ou degradação do mRNA) ou proteólise pode ser considerada controle metabólico do tipo abrupto (PLAXTON, 2005).

Já o controle fino atua como um transdutor metabólico capaz de perceber as exigências celulares de modo instantâneo, ajustando então a taxa do fluxo metabólico por diferentes vias (PLAXTON, 1996). Diversos mecanismos de controle fino regulam a interação da glicólise com o TCA e com a cadeia transportadora de elétrons, de forma a coordenarem o fluxo dessas vias com a necessidade celular de moléculas energéticas e precursores anabólicos (PLAXTON; PODESTÁ, 2006). Considerando a grande interconexão entre estas três vias, um ponto de extrema importância no estudo do controle metabólico é a análise do sistema como um todo.

A abordagem tradicional do controle metabólico consiste na identificação das enzimas-chave de uma dada via e dos mecanismos pelos quais a atividade dessas enzimas é controlada. Estas reações são caracterizadas tanto por sua localização estratégica nas vias, sendo deslocadas do seu equilíbrio, quanto por apresentarem mudança no sentido do fluxo da reação (PLAXTON, 1996).

Pelo menos seis mecanismos de controle fino podem modular a atividade das enzimas: (1) variação na concentração dos substratos e cofatores, (2) variação no pH, (3) presença de metabólitos efetores, (4) associação e dissociação de subunidades, (5) modificações covalentes reversíveis e (6) associação reversível de enzimas metabolicamente próximas (PLAXTON, 1996).

1.1.9 As Ômicas: Estudos integrados de Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica

Compreender o sistema metabólico como um todo é essencial, não somente para a determinação da função de genes, enzimas e proteínas, mas também para a elucidação dos mecanismos de coordenação dos diversos processos biológicos (FUKUSHIMA et al., 2010). Nesta abordagem holística, é fundamental que a análise, por exemplo, da resposta de um organismo a diferentes condições ambientais seja realizada em diferentes níveis, tais como transcriptômico, proteômico e metabolômico, gerando diferentes informações (FIEHN; WECKWERTH, 2003), que irão fornecer uma visão completa do metabolismo, permitindo inferir sobre importantes associações entre macromoléculas, identificar ligações funcionais entre genes e fenótipos e construir modelos que descrevam quantitativamente a dinâmica do sistema biológico (BINO et al., 2004). Deste modo, em vez da análise a partir de um pequeno número de variáveis, é possível a investigação por uma abordagem global, a Biologia de Sistemas. A proposta desta abordagem é o estudo biológico como um sistema integrado de eventos genéticos, protéicos, metabólicos e celulares, que estão em constante fluxo e são interdependentes (JONSSON et al., 2005).

Os projetos de seqüenciamento genômico em larga escala e a posterior disponibilização das sequências em bancos de dados com acesso público iniciaram uma nova etapa da pesquisa científica, onde inúmeras espécies vegetais tiveram o seu genoma seqüenciado e liberado: *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000; <http://www.arabidopsis.org>), *Oryza sativa* (YU et al., 2002; <http://www.plantgdb.org/OsGDB>), *Zea mays* (<http://www.plantgdb.org/ZmGDB/>), *Populus trichocarpa* (TUSKAN et al., 2006; <http://genome.jgi.doe.gov>) e *Eucalyptus grandis* (MYBURG et al., 2006; <http://www.eucagen.org>). Contudo, a partir da grande quantidade de dados gerados, percebeu-se que ainda não era possível elucidar a função biológica de uma dada seqüência, visto que, por exemplo, a localização de

uma *ORF* (*open reading frame*) não implica, necessariamente, na existência de um gene funcional (PANDEY; MANN, 2000). Assim, as informações genômicas geradas deram início à era das “ômicas”, caracterizada pela análise de transcritos, proteínas e metabólitos (KANDPAL; SAVIOLA; FELTON, 2009).

A análise do conjunto de transcritos expressos em uma célula ou tecido é denominada transcriptômica e representa a primeira etapa para a caracterização funcional de genes ou famílias gênicas (WANG; LI; BRUTNELL, 2010). Porém, após a transcrição, a expressão gênica pode ser regulada em diferentes níveis (BAERENFALLER, 2008), por exemplo, pelas modificações pós-transcricionais e traducionais, que promovem alteração da conformação protéica e acarretam uma função metabólica diferente daquela esperada (CHEN; HARMON, 2006). Assim, prever a presença/concentração de uma proteína apenas com base no nível de transcritos pode ser uma difícil tarefa, levando a interpretações erradas (BAERENFALLER, 2008). O estudo do perfil protéico é realizado por meio da análise proteômica, a qual tem importante papel na Biologia de Sistemas por ser complementar à análise dos transcritos e metabólitos. Outro ponto importante é o fato da proteômica estar proximamente relacionada à função gênica, visto que é o produto final da regulação gênica (PENNINGTON; DUNN, 2001). No entanto, uma vez traduzida, pode estar ou não ativa (SUMNER et al., 2003). Deste modo, nem sempre as alterações observadas no transcriptoma e proteoma correspondem a alterações fenotípicas. Neste sentido, o estudo do conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados em dado organismo apresenta-se como uma estratégia importante para a determinação da função gênica, fornecendo informação integrativa da função celular a nível molecular, podendo definir o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações ambientais ou genéticas (VILLAS-BOAS et al., 2005).

Referências

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doença do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.
- ALLONA, I.; QUINN, M.; SHOOP, E.; SWOPE, K.; CYR, S. S.; CARLIS, J.; RIEDL, J.; RETZEL, E.; CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R.; WHETTEN, R. W. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 9693-9698, 1998.

ALVARENGA, A.A. **Respiração**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Vegetal, 2004. 22 p.

ANGYALOSSY, S.M; MARCATI, C.R. Câmbio. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2006, chap. 8, p. 205-212.

ASCHAN, G.; WITTMANN, C.; PLFANZ, H. Age-dependent bark photosynthesis of aspen twigs. **Trees**, London, v. 15, p. 431-437, 2001.

ASHWORTH E.N.; STIRM V.E.; VOLENEC J. J. Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Corms sericea* L. **Tree Physiology**. Victoria, v.13, p. 379-388, 1993.

ASCHAN, G.; WITTMANN, C.; PFANZ, H. Age-dependent bark photosynthesis of aspen twigs. **Trees**, Dordrecht, v. 15, p. 431-437, 2001

ASCHAN, G.; PFANZ, H. Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. **Flora**, Dordrecht, v. 198, p. 81-97, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**, Brasília, 2011. 130 p.

_____. **Anuário estatístico**, Brasília, 2010. 145 p.

.BACHIR, O.; ABDELLAH, B. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 59, n. 3, p. 207-212, 2006.

BAERENFALLER, K.; GROSSMANN, J.; GROBEI, MA.; HULL, R.; HIRSCHHOFFMANN, M.; YALOVSKY, S.; ZIMMERMANN, P.; GROSSNIKLAUS, U.; GRUISSEM, W.; BAGINSKY, S. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. **Science**, Washington, v.320, p. 938–941, 2008.

BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p. 5-38, mar. 2007.

BERVEILLER, D.; DAMESIN, E. Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase. **Trees**. Dordrecht, v. 22, p.149–157, 2008

BINO, R.J.; HALL, R.D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B.J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M.H.; TRETHEWEY, R.N.; LANGE, B.M.; WURTELE, E.S.; SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v.9, n.9, 2004.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica

de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BRAND, D. Forest investment and emerging environmental markets. Disponível em: < newforests-us.com/news/pdf/articles/forestinvestment.pdf>. Acesso em: Acesso em 10 nov. 2008.

CAMPBELL, M.M.; BRUNNER, A.M.; JONES, H.M.; STRAUSS, S.H. Forestry's Fertile Crescent: the application of biotechnology to forest trees. **Plant Biotechnology Journal**, London, v.1, p. 141–154, 2003.

CARVALHO, M.C.C.G.; GOMES, D.G.C.; CARNEIRO, R.T.; MOON, D.H.; SALVATIERRA, G.R.; FRANCESCHIN, L.M.; DE ANDRADE, A.; CELEDON, P.A.F.; ODA, S.; LABATE, C.A. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. **Tree Physiology**. Victoria, v. 28, p. 905 -918, 2008.

CELEDON P.A., DE ANDRADE A., MEIRELES K.G., CARVALHO M.C.C.G., CALDAS D.G., MOON D.H., CARNEIRO R.T., FRANCESCHINI L.M., ODA S., LABATE C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomic**, Weinheim v. 13, p. 2258-2274, 2007.

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

DEMURA, T.; FUKUDA, H. Transcriptional regulation in Wood formation. **Trends in Plant Science**, Kidlington v.12, n.2, 2007.

DU, J.; GROOVER, A. Transcriptional Regulation of Secondary Growth and Wood Formation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijin, v. 52, n.1, p. 17–27, 2010.

EKLUND, L. Seasonal variations of O₂, CO₂, and ethylene in oak and maple stems. **Canadian journal of forest research**, Ottawa, v. 23, n.12, 1993.

ELDRIDGE K, DAVIDSON J, HARWOOD C, VAN-WYK G. **Eucalypt domestication and breeding**. Clarendon Press, Oxford , 1993. 308 p.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Bark and its possible uses**. Washington, 1971. 60 p. (USDA. Technical Bulletin FLP-091).

FAO. **Global forest resources assessment**: main report. Rome, 2010a. 340 p.

_____. **Global forest in sustainable forest management**: a statement of principles. Rome, 2010b. 16 p.

FERNIE, A.R.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, L.J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**. London, v. 7, p. 254–261, 2004.

FIEHN, O.; WECKWERTH, W. Deciphering metabolic networks. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 579–588, 2003.

FILIPPOU M., FASSEAS C., KARABOURNIOTIS G. Photosynthetic characteristics of olive tree (*Olea europaea*) bark. **Tree Physiology**, Victoria, v. 27, p. 977–984, 2007.

FOELKEL, C. A **casca da árvore de eucalipto**: aspectos morfológicos, fisiológicos, florestais, ecológicos e industriais, visando à produção de celulose e papel. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, Capítulo 1. Disponível em <http://www.eucalyptus.com.br/>. 2005, 109 p.

FOUCART, C.; PAUX, E.; LADOUCÉ, N.; SAN-CLEMENTE, H.; GRIMAPETTENATI, J.; SIVADON, P. Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, London, v. 170, n. 4, p. 739-752, 2006.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 449-456, 2004.

FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; REDESTIG, H.; ARITA, M.; SAITO, K. Integrated omics approaches in plant systems biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, Amsterdam, v.13, p.532–538, 2009.

GEIGENBERGER P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 247–256, 2003

GION, J. M.; LALLANE, C.; LE PROVOST, G. et al. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 14, p. 3731-3751, Sept., 2005.

GOLLE, D.O.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; BEVILACQUA, A.B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1606-1613, ago, 2009.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFÁVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using sonication assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT). **Australian Journal of Plant Physiology**, Australia, v. 29, p. 97-102, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, London, v. 179, p. 911–929, 2008.

GRICAR, J.; CUFAR, K. Seasonal Dynamics of Phloem and Xylem Formation in Silver Fir and Norway Spruce as Affected by Drought. **Russian Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 55, n. 4, p. 538–543, 2008.

GROOVER, A.; JONES, A.M. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. **Plant Physiology**, Lancaster, v.119, p. 375-384, 1999.

HAN, K.W. Molecular biology of secondary growth. **Journal Plant Biotechnology**, London, v. 3, p. 45–57, 2001.

HERTZBERG, M.; ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; ANDERSSON, A.; ERLANDSSON, R.; BLOMQVIST, K.; BHALERAO, R.; UHLÉN, M.; TEERI, T. T.; LUNDEBERG, J.; SUNDBERG, B.; NILSSON, P.; SANDBERG, G. A transcriptional roadmap to wood formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14732-14737, 2001

HIGUCHI, T. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Wood**. New York: Springer-Verlag, 1997. 362 p.

HOUSE, S.M. Reproductive biology of eucalypts. In: WILLIAMS, J.E. WOINARSKI, J.C.Z (Ed.). **Eucalypt Ecology Individuals to Ecosystems**. Melbourne: Cambridge University Press, 1997 chap. 1, p. 30-55.

INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION. INTERNATIONAL year of forests 2011: What about the labour aspects of forestry? Genova, 2011. 11 p.

JONSSON, P.; JOHANSSON, A.I.; GULLBERG, J.; TRYGG, J.; GRUNG, B.; MARKLUND, S.; SJOSTROM, M.; ANTTI, H.; MORITZ, T. High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses. **Analytical Chemistry**, Washington, v.77, n.17, p. 5635-5642, 2005.

JUAN, D.; HONG-LI, X.; DE-QIANG, Z.; XIN-QIANG, H.; MIN-JIE, W.; YING-ZHANG, L.; KE-MING, C.; MENG-ZHU, L. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. **Proteomics**. Weinheim, n. 6, p. 881–895, 2006.

KANDPAL, R.P.; SAVIOLA, B.; FELTON, J. The era of omics unlimited. **BioTechniques**, Jersey, v. 46, p. 351-355, 2009.

KIMMERER, T.W.; STRINGER, M.A. Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 87, p. 693-697, 1988.

KONISHI, T.; OHMIYA, Y.; HAYASHI, T. Evidence that sucrose loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various glucan synthases in the stem. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, p. 1146-1152, 2004.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**. Lancaster, v. 63, p. 1-16, 2012.

LACHAUDA, S.; CATESSON, A.M.; BONNEMAIN, J.L. Structure and functions of the vascular cambium. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, Amsterdam, v. 322, n. 8, p. 633-650, 1999.

LADEIRA, B.C. **Crescimento, produção de biomassa e eficiência nutricional de *Eucalyptus* spp., sob três espaçamentos, em uma sequência de idades.** Viçosa, 1999. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

LARSON, P.R. **The vascular cambium:** development and structure. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 351p.

LEV-YADUN, S.; SEDEROFF, R.; Pines as model gymnosperms to study evolution, wood formation and perennial growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, London, v. 19, p. 290-350, 2000.

LI, X.; WU, H.X.; Southerton, S.G. Seasonal reorganization of the xylem transcriptome at different tree ages reveals novel insights into wood formation in *Pinus radiata*. **New Phytologist**, London, v.187, p. 764–776, 2010.

MARENCO R.A., LOPES N.F. **Fisiologia Vegetal:** Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: UFV, 2007. 451p.

MEGRAW, R. A. 1985. **Wood quality factors in loblolly pine.** TAPPI Press: Atlanta, 1985, 89 p.

MELLEROWICZ, E.J.; BAUCHER, M.B.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 47, p. 239–274, 2001.

MORA A., GARCIA C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112p.

MUGNAI, S. MANCUSO, S. Oxygen Transport in the Sapwood of Trees. In: MANCUSO, S. SHABALA, S. (Ed.). **Waterlogging Signalling and Tolerance in Plants**, Berlin: Springer, 2010, 292p.

NILSEN, E.T. Stem photosynthesis: extent, patterns, and role in plant carbon economy. In: GARTNER, B. (Ed.). **Plant Stems: Physiology and Functional Morphology.** San Diego: Academic Press, 1995. 429p.

OLIVEIRA, J. M. ; SANTAROSA, E. ; PILLAR, V. D. ; ROIG, F. A. Seasonal cambium activity in the subtropical rain forest tree *Araucaria angustifolia*. **Trees**, Berlin, v. 23, p. 107-115, 2009.

OLIVEIRA, B.R.U.; LATORRACA, J.V.R.; FILHO, M.T.; GARCIA, R.A.; CARVALHO, A.M. Correlações dendroclimatológicas do *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden na região de rio claro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 499-508, 2011.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, London, v. 405, p. 837- 846, 2000.

PAUX, E.; TAMASLOUKHT, M.B.; LADOUCE, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant Molecular Biology**, London, v. 55, p. 263–280, 2004.

PENNINGTON, S.R. DUNN. M.J. **Proteomics**: from protein sequence to function. New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Plubishers, 2000. 313p.
PFANZ H., ASCHAN G., LANGENFELD-HEYSER R., WITTMANN, C., LOOSE M. Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, p. 147-162, 2002.

PLAXTON, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v.47, p. 185-214, 1996.

PLAXTON, W.C. Principles of metabolic control. In: STOREY, K.B. (Ed.). **Functional metabolism: regulation and adaptation**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005, chap. 1, p. 1-24.

PLAXTON, W.C., PODESTÁ, F.E. The functional organization and control of plant respiration. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.25, p.159–198, 2006.

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

POKE, F.S.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; REID, J.B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, Berlin, v.125, p.79–101, 2005.

POUND, L.M.; WALLWORTH, M.A.B.; POTTS, B.M.; SEDGLEY, M. Pollen tube growth and early ovule development following self-and cross-pollination of *Eucalyptus nitens*. Sexual. **Plant Reproduction**, London, v.16, p. 56-69, 2003.

PRYOR L.D. **The biology of Eucalyptus**. London: Edward Arnold, 1796. 82p.

RANIK, M.; CREUX, N.M.; MYBURG, A.A. Within-tree transcriptome profiling in wood-forming tissues of a fast-growing *Eucalyptus* tree. **Tree Physiology**, Victoria, v.26, p. 365–375, 2005.

RENGEL, D.; CLEMENTE, H.S.; SERVANT, F.; LADOUCE, N.; PAUX, E.; WINCKER, P.; COULOUX, A.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. **BioMedCentral Plant Biology**, London, v. 9, n. 36, 2009.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.589-647.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de espécies perenes. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.M.; VALADARES-INGLIS, M.C (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p.357-421.

REVISTA DA MADEIRA. **O eucalipto e suas origens**, Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.revistadamadeira.com.br/artigos.asp>.>. Acesso em 13 Ago. 2009.

RIDING, R.T.; LITTLE, C.H.A. Anatomy and histochemistry of *Abies balsamea* cambial zone cells during the onset and breaking of dormancy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.2570–2579, 1984.

ROBERTS, K.; MCCANN M.C. Xylogenesis: the birth of a corpse. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 517 - 522, 2000.

SALVATO, F. **Identificação de proteínas diferencialmente expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis* durante a indução da formação da madeira de tração**. 2010. 267 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SCHRADER, W.J.; NILSSON, J.; MELLEROWICZ, E.; BERGLUND, A.; NILSSON, P.; HERTZBERG, M.; SANDBERG, G. A High-Resolution Transcript Profile across the Wood-Forming Meristem of Poplar Identifies Potential Regulators of Cambial Stem Cell Identity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2278–2292, 2004.

SIEDOW, J.; DAY, D.A. Respiration and photorespiration. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biologist, 2000. chap. 4, p. 676-728.

SOLOMON, O.L.; BERGER, D.K.; MYBURG, A.A. Diurnal and circadian patterns of gene expression in the developing xylem of *Eucalyptus* trees. **South African Journal of Botany**, London, v. 76, p. 425-439, 2010.

SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L.. Molecular Approaches to Sink-Source interactions. **Plant Physiology**, Lancasteer, v. 99, p. 1267-1270, 1992.

SPIKER, R.; GROOVER, A. Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. **New Phytologist**, London, v. 186, p. 577-592, 2010.

STERKY, F.; REGAN, S.; KARLSSON, J.; HERTZBERG, M.; ROHDE, A.; HOLMBERG, A.; AMINI, B.; BHALERAO, R.; LARSSON, M.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M.V.; SANDBERG, G.R.; OLSSON, O.; TEERI, T.T.; BOERJAN, W.; GUSTAFSSON, P.; UHLEN, M.; SUNDBERG, B.; LUNDEBERG, J. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Science**. Washington, v. 95, p. 13330–13335, 1998.

SUMNER, L.W.; MENDER, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, Oxford, v.62, p. 817-836, 2003.

SWEETLOVE, L.J.; BEARD, K.F.M.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A.F.; RATCLIFFE, R.G. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, n. 8., p. 462-470, 2010.

TAIZ L.; ZEIGER E. **Fisiologia vegetal**: respiração e metabolismo de lipídeos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEGEDER, M.; WEBER, A. metabolite transporters in the control of plant primary metabolism. In: PLAXTON, W.C. McMANUS, M.T. (Ed.). **Control of Primary Metabolism in Plants**. Oxford: Willey, 2000. chap. 4, p 85–120.

TESKEY, R.O.; SAVEYN, A.; STEPPE, K.; MCGUIRE, M.A. Origin, fate and significance of CO₂ in tree stems. **New Phytologist**, London, v. 177, p. 17-32, 2007.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 14, p. 796-815, 2000.

TIMELL, T.E. The structure of compression wood. In: ____ **Compression wood in gymnosperms**. Berlin: Springer Verlag, 1986. v.1, 288 p.

TURGEON, R. THE SINK-SOURCE TRANSITION IN LEAVES. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p.119-38, 1989.

TUSKAN, A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S.; BOHLMANN, J.; GRIGORIEV, I., HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; RALPH, S.; ROMBAUTS, S.; SALAMOV, A.; SCHEIN, J.; STERCK, L.; AERTS, A.; BHALERAO, R. R.; BHALERAO, R. P.; BLAUDEZ, D.; BOERJAN, W.; BRUN, A.; BRUNNER, A.; BUSOV, V.; CAMPBELL, M.; CARLSON, J.; CHALOT, M.; CHAPMAN, J.; CHEN, G. L.; COOPER, D.; COUTINHO, P. M.; COUTURIER, J.; COVERT, S.; CRONK, Q.; CUNNINGHAM, R.; DAVIS, J.; DEGROEVE, S.; DE'JARDIN, A.; DEPAMPHILIS, C.; DETTER, J.; DIRKS, B.; DUBCHAK, I.; DUPLESSIS, S.; EHLTING, J.; ELLIS, B.; GENDLER, K.; GRIBSKOV, M.; GRIMWOOD, J.; GROOVER, A.; GUNTER, L.; HAMBERGER, B.; HEINZE, B.; HELARIUTTA, Y.; HENRISSAT, B.; HOLLIGAN, D.; HOLT, R.; HUANG, W.; ISLAM-FARIDI, N.; JONES, S.; JONES-RHOADES, M.; JORGENSEN, R.; JOSHI, C.; KANGASJA, J.; KARLSSON, J.; KELLEHER, C.; KIRKPATRICK, R.; KIRST, M.; KOHLER, A.; KALLURI, U.; LARIMER, F.; LEEBENSMACK, J.; LEPLE, J. C.; LOCASCIO, P.; LOU, Y.; LUCAS, S.; MARTIN, F.; MONTANINI, B.; NAPOLI, C.; NELSON, D.R.; NELSON, C.; NIEMINEN, K.; NILSSON, O.; PEREDA, V.; PETER, G.; PHILIPPE, R.; PILATE, G.; POLIAKOV, A.; RAZUMOVSKAYA, J.; RICHARDSON, P.; RINALDI, C.; RITLAND, K.; ROUZE', P.; RYABOV, D.; SCHMUTZ, J.; SCHRADER, J.; SEGERMAN, B.; SHIN, H.; SIDDIQUI, A.; STERKY, F.; TERRY, A.; TSAI, C. J.; UBERBACHER, E.; UNNEBERG, P.; VAHALA, J.; WALL, K.; WESSLER, S.; YANG, G.; YIN, T.; DOUGLAS, C.; MARRA, M.; SANDBERG, G.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSA, D. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**. Washington, v. 313, p. 1596-1604, 2006.

VILLAS-BOAS, S.G.; MOXLEY, J.F.; KESSON, M.A.; STEPHANOPOULOS, G.; NIELSEN, J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. **Biochemistry Journal**, Great Britain, v.388, p. 669–677, 2005.

XUDONG WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; HAO, R.B.; ZHENG, W.; CHEN, S.

GUO, W.; LI, G.; LIU, S.; TAO, M.; WANG, J.; YUAN, L.L.; YANG, H. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, London, v. 296, n. 5565, p. 79-92, 2002.

WANG, L.; LI, L.; BRUTNELL, T.P. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. **Briefings in Functional Genomics**, London, v. 9, n. 2, p. 118 -128, 2010.

WIESER G. Carbon dioxide gas exchange of cembran pine (*Pinus cembra*) at the alpine timberline during winter. **Tree Physiology**, London, v. 17, p. 473-477, 1997.

WILLIAMS, J.E.; BROOKER, M.I.H. Eucalypts: an Introduction. In: WILLIAMS, J.E. WOINARSKI, J.C.Z. (Ed.). **Eucalypt Ecology**. Cambridge: University of Cambridge, 1997. chap. 1, p. 1-15.

WITTMANN, C.; PFANZ, H.; LORETO, F.; CENTRITTO, M.; PIETRINI, F.; ALESSIO, G. Stem CO₂ release under illumination: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 29, n. 6, p. 1149-1158, 2006.

YANG, J.; KAMDEM, D.P.; KEATHLEY, D.E.; HAN, K.H. Seasonal changes in gene expression at the sapwood–heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, p.461–474, 2004.

ZHANG, X.H.; CHIANG, V.L. Molecular Cloning of 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase in Loblolly Pine and the Roles of This Enzyme in the Biosynthesis of Lignin in Compression Wood. **Plant Physiology**, London, v. 113, p. 65-74, 2007.

2 ANÁLISE DO METABOLISMO PRIMÁRIO DA REGIÃO CAMBIAL DE *Eucalyptus grandis* DURANTE O VERÃO E INVERNO

Resumo

O cultivo do eucalipto no Brasil é um dos exemplos de sucesso do setor florestal, ocupando lugar de destaque no comércio mundial. A madeira é um importante recurso renovável para as indústrias de processamento, celulose e papel e bioenergia. Sabe-se que a formação da madeira é decorrente da atividade anual do câmbio vascular. No entanto, pouco se conhece sobre o perfil molecular desse tecido em resposta à sazonalidade em regiões tropicais. Deste modo, visando observar mudanças no metabolismo primário da região cambial de *E. grandis* em resposta a dois períodos sazonais contrastantes, verão e inverno, as análises do presente trabalho associaram três grandes linhas da genômica funcional: análise de transcritos por qPCR, proteômica bidimensional e metabolômica, de maneira integrada e ainda não descrita para *Eucalyptus*. As análises indicaram mudanças significativas no metabolismo da região cambial durante o verão e inverno. Os dados obtidos sugerem que durante o verão a via glicolítica é destinada à produção de piruvato, que é principalmente metabolizado pela fermentação alcoólica. Por outro lado, durante o inverno parece haver um favorecimento da rota no sentido da síntese de carboidratos. Os resultados demonstram também que, embora a diferença sazonal (verão/inverno), no Brasil, não seja tão discrepante como em países de clima temperado, há uma modificação geral no metabolismo primário, na região cambial.

Palavras chave: *Eucalyptus grandis*, Metabolismo primário, qPCR, Proteômica, Metabolômica

Abstract

Eucalyptus cultivation in Brazil is one of the successful examples of the forest sector, occupying a prominent position in the world trade. Wood is an important renewable resource to the processing industries, pulp and paper and bioenergy. It is known that wood formation is due to the annual activity of the vascular cambium. However, little is known about the molecular profile of this tissue in response to seasonality in subtropical regions. Thus, in order to observe the changes in the *E. grandis* cambial region, mainly related to primary metabolism, we compared cambial tissue collected in two different seasons (summer and winter). So we used three different approaches of functional genomics: qPCR, proteomics (2D) and metabolomics, in an integrated manner and not yet described for Eucalyptus. Analyses indicated significant changes in the metabolism of the cambial region during summer and winter. The data suggest that during the summer glycolysis is used to produce pyruvate, which is metabolized primarily by fermentation. On the other hand, during the winter there seems to be a change towards the synthesis of carbohydrates. These results also demonstrate that, although the seasonal difference (summer / winter) in Brazil is not so great in terms of the negative temperatures experienced in temperate countries, there is however, a general modification in the primary metabolism of the cambial region.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; Primary metabolism; qPCR; Proteome; Metabolome

2.1 Introdução

Devido ao seu longo ciclo de vida, as espécies arbóreas desenvolveram mecanismos adaptativos de acordo com as mudanças climáticas sazonais, que alternam entre crescimento ativo e redução da atividade metabólica, em regiões de clima tropical/ subtropical, ou dormência vegetativa, em regiões de clima temperado. As árvores utilizam diferentes sinais ambientais como duração do dia e noite, temperatura e disponibilidade hídrica, para coordenarem seu crescimento e desenvolvimento com as mudanças climáticas (KO et al., 2011). De modo geral, as células cambiais iniciais dormentes são ativadas no início da primavera e então passam por divisões celulares e rápida expansão, período no qual há predominância da síntese de parede celular primária. Posteriormente, durante o período de crescimento, ocorre a síntese de parede secundária, lignificação e morte celular programada (LI et al., 2010).

Os estudos a respeito dos mecanismos moleculares que regulam a resposta das árvores às mudanças sazonais estão apenas iniciando e o maior número de artigos que abordam este tópico vem sendo realizado com árvores em regiões de clima temperado (GRICAR; CUFAR, 2008; LI et al., 2010; REGIER et al., 2010; KO et al., 2011). Enquanto para essas árvores é apontado um período de dormência, para as árvores de clima tropical o que ocorre é uma redução da atividade cambial, também em decorrência da menor temperatura e disponibilidade hídrica, que depois é retomada durante o verão (ANGYALOSSY; MARCATI, 2006). Essa alternância sazonal apresentada pelo câmbio vascular está intimamente relacionada com o metabolismo primário.

Celedon et al. (2007) e Carvalho et al. (2008) identificaram proteínas e transcritos atuantes na glicólise, fermentação alcoólica, ciclo do ácido cítrico e fotossíntese, na região cambial de *E. grandis*, com diferentes idades. Visto que essa região é caracterizada por apresentar alta taxa de crescimento e por realizar metabolismo heterotrófico, estes dados indicam que o metabolismo glicolítico pode ser a principal rota de produção de energia (ATP) para a região cambial durante o desenvolvimento e formação da madeira. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer um panorama geral do metabolismo primário da região cambial de *E. grandis* em resposta a dois períodos sazonais contrastantes, verão e inverno, por meio da análise do padrão transcricional dos principais genes

envolvidos no metabolismo primário (fixação de carbono, respiração aeróbica e fermentação alcoólica), perfil protéico e metabólico.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal e condições experimentais

O material vegetal foi obtido a partir de árvores com 6 anos, de uma população comercial de clones de *Eucalyptus grandis* provenientes da Suzano Papel e Celulose, Estação de Itapetininga (23°35'30" S e 48°03'11"), São Paulo. As coletas foram realizadas em dois períodos sazonais: verão (caracterizado por chuvas constantes) e inverno (caracterizado por ser um período seco). As amostras de verão foram coletadas em janeiro (2009), com temperatura média de 23.7°C (máxima de 29.3°C e mínima de 18.0°C) e precipitação média de 213.2 mm. Já as amostras de inverno foram coletadas em julho (2009), com temperatura média de 16.8°C (máxima de 23.7°C e mínima de 9.8°C) e precipitação média de 47.4 mm. Em ambos os períodos, as amostras foram coletadas durante o início da manhã (entre 9 e 10 hrs). Cinquenta indivíduos foram selecionados aleatoriamente para a coleta de tecido da região cambial, como descrito em Celedon et al. (2007) e ilustrado na figura 10. No entanto, os indivíduos foram coletados em cinco *bulks* de 10 plantas cada. Imediatamente após a coleta e congelamento rápido em nitrogênio líquido, as amostras foram armazenadas a -80°C.

É importante destacar que, no estado de São Paulo, região de clima subtropical, durante o verão há maior luminosidade e disponibilidade hídrica, consequentemente o metabolismo das arbóreas é bastante intenso. Já durante o inverno tanto a luminosidade quanto a disponibilidade hídrica são menores, assim as arbóreas tem o seu metabolismo reduzido durante esse período, no entanto, por se tratar de clima tropical/subtropical, períodos de dormência não são claramente definidos.

Figura 10 - Coleta da região cambial de *E. grandis*, com seis anos. (A) Abertura de painel. (B) Coleta da região cambial por raspagem. (C) Secção transversal da madeira de *E. grandis* antes da remoção da casca. (D) Secção transversal da madeira de *E. grandis* após remoção da casca. Barras = 100 µm. X = xilema e C = região cambial. Adaptado de Celedon et al. (2007)

2.2.2 Seleção de genes e desenho de *primers*

Com base em dados da literatura, genes envolvidos nas vias metabólicas de interesse (glicólise, fermentação alcoólica, TCA e fotossíntese) foram selecionados para o desenho de *primers* (Tabela 1) e conseqüente análise transcricional. Inicialmente, para a obtenção destes genes foram utilizados dois bancos de dados distintos, o banco de *Populus trichocarpa*, disponível em http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home, e um banco de dados local, composto por *tags* de *Eucalyptus grandis* provenientes de árvores com 3 e 6 anos, resultante de estudo de expressão gênica por SAGE (Análise Seriada da Expressão Gênica) (CARVALHO et al., 2007). As *tags* foram identificadas por meio do alinhamento com *ESTs* de *E. grandis* disponíveis no NCBI. Em seguida, as sequências de interesse foram reanalisadas para confirmação da função, presença de domínios e presença de peptídeo sinal pelas plataformas *BlastX* e *BlastP* (NCBI), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), *SignalP* 3.0 Server e *ChloroP* 1.1 Prediction Server, ambos disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk>.

Posteriormente, 25 pares de *primers* foram desenhados para os genes de interesse pelo programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), considerando os seguintes parâmetros: tamanho do produto amplificado (100 a 200 pares de bases - pb) e *primers* (18 a 22 pb) e a quantidade de GC (40% a 60%). Foram utilizados também 5 pares de *primers* já disponíveis no laboratório (Tabela 1), sintetizados para trabalho anterior (CARVALHO et al., 2008). O desenho de *primers* para as isoformas incluiu o alinhamento destas sequências no programa ClustalW

(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para obtenção de *primers* específicos para cada isoforma. A qualidade dos *primers* foi verificada individualmente pela ferramenta *Oligo Analysis Tools* (<http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx>), visando evitar a formação de estruturas secundárias (*self-dimer* e *primer-dimer*).

Tabela 1 - *Primers* sintetizados para realização de qPCR

(continua)		
Gene	gi (NCBI)	Pares de Primers
Sacarose sintase 1 (SUSY 1)	80973755	F TTCAACCGCTATCTATGAAG R GACTGGTCAATCTTGCACTTG
Sacarose sintase 3 (SUSY 3)	80973757	F AGTGAAGGAGCATTTGGAGAA R CAACAACAAGGGCGTGAATA
Fosfoglicomutase (PGM)	103476469	F GGGCAACCATTCGTCTTTAC R GATGACCGTGGGAGCAGAT
Glicose 6 -P isomerase (GPI)	32163526	F ACTGGGTGGGTGGTAGAACA R AGTTGCCTCATCCATCAAGG
Fosfofrutoquinase PPI-dependente (PFP)	103479799	F CAAGAAGGCAATGGTGGAG R AACAAAAGGGTGTGGTTGAC
Fosfofrutoquinase ATP-dependente (PFK)	224124853	F TGGAAGGAGAAGGAGGATTG R AACCACGCACCAAAGTCTAA
*Frutose bifosfato aldolase (FBA)	103475644	F CAAGCTCAAGGGCAAGAAAC R AGAAAAATACGCCAGCAAAA
Gliceraldeído 3-P desidrogenase cit. (GAPDH)	103477585	F ATGGGCTTCCGTGTTCTTAC R GCCTTTCAGTTTGCCTTCAG
Fosfoglicerato quinase (PGK)	171592412	F CATCCATCCATCCATCCTTC R AACACCCGCTTCCCCTTC
Fosfoglicerato mutase (PGAM)	103479105	F GCTTGGCACCTGGAGTTAG R TTATCAATCGCCCACTTTTT
Enolase (ENO)	171552784	F CTGTGTCCCTTGCGGTCT R ATACTTCCACGCCCATCTTC
Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC)	167024003	F TTCGTGACCCTGATTACCAT R ATAGAGCATAAGCCTCAACCAG

Tabela 1 - *Primers* sintetizados para realização de qPCR

(continuação)

Gene	gi (NCBI)	Pares de Primers
*Malato desidrogenase cit. (MALD)	103481294	F TTGTGACCACATCCGTGACT R TCCTCGCTAAGTTCCTCTGC
Piruvato quinase (PK)	103477494	F TATGTGGGAGAGCCAATGAG R TCCATCGCAGTTGATTGTCTC
Piruvato descarboxilase (PDC)	103479823	F ACAATGGCGAGGGCAAGT R GAGGATTAGGAGGGCGACTATT
Álcool desidrogenase 1 (ADH 1)	103474654	F ATGTTGCGAAGCCAAAGAAG R ACAAACTCGGTGACTCCAAA
Álcool desidrogenase 2 (ADH 2)	103481320	F GGGAGTGCCCCATAAAGATG R TACGACGGAGGGAATGTCTG
Álcool desidrogenase 3 (ADH 3)	171575052	F GGACTTCAACATTCAGCGAGT R GCAGCAGATAACCCAACAGC
Piruvato desidrogenase (PDH)	103477166	F AATCTCTGGTGCTGATGTTCC R GTTTTTCTCCCGTCGTTTCA
*Isocitrato desidrogenase (ISO)	1922271	F CTGTTGAGTCTGGCAAGATGAC R CATTTAATTCTCCCCAACAAA
*Succinil CoA ligase (SCL)	103481045	F CCCGGTGAATGTAAAATTGG R ATGCAGCAGCATCCTCTTCT
Malato desidrogenase mit. (MDH)	CAA55383.1	GGGAGTGACAACCCTTGATG ACGGCTTGAGAAAACAGAGG
Enzima málica (NADPme)	103475915	F CGCTATCCGTGTGAATGATG R GGACGAGGAAGGTGGGAAG
Anidrase carbônica (CA)	167029713	F GGGAAGTTGCTGACTTACCC R TTGAGAGTGGTGGAGAGAGG
Rubisco subunidade menor (RbcS)	162328177	F ACCTCTCTCCCCAGCAACG R GGTCCAGTATCTCCCATCGTA
*Rubisco subunidade maior (RbcL)	108802622	F GACAACTGTGTGGACCGATG R TCTCAACTTGGATGCCATGA

Tabela 1 - *Primers* sintetizados para realização de qPCR

Gene	gi (NCBI)	(conclusão)	
		Pares de Primers	
Frutose bisfosfato aldolase clp (FBA)	162321789	F	GAAGCCAGCCCAGGAAAC
		R	CACATAGCCCTTGACGAACA
Ribose 5-fosfato isomerase (RPI)	103476045	F	TAGCAGCGGGGAAGGAAATA
		R	CCAGGGAAAATCACTTGGAT

* primers previamente disponíveis no laboratório para uso.
cit= citoplasmático, mit = mitocondrial e clp = cloroplastidial

2.2.3 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo de Zeng e Yang (2002). Visando maior rendimento, foi realizada micro-extração partindo-se de 200 mg por amostra de material macerado em nitrogênio líquido. Ao macerado foi adicionado 1 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH=8; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% v/v 2-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C. Após homogeneização, as amostras foram mantidas por 15 min. a 65°C, sob agitação a cada 5 min. Em seguida, adicionou-se um volume de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000xg por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, repetindo-se a extração com CIA mais duas vezes. A fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 0,25 volumes de LiCl (10M) para precipitação do RNA total. Após homogeneização, as amostras foram mantidas durante 16 h a 4° C. Após centrifugação (14.000xg) durante 30 min a 4° C, os *pellets* de RNA total resultantes foram lavados três vezes com etanol 75% (v/v), secos à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min e ressuspensos em 50 µL de água DEPC 0,01%.

A qualidade das amostras de RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2%.

2.2.4 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à pureza e quantificadas em espectrofotômetro (Hitachi U3300) a 260 e 280nm. A razão entre as absorbâncias (A_{260nm}/A_{280nm}) é utilizada como uma medida de qualidade das amostras. Valores entre 1,6 a 2,0 indicam boa qualidade de RNA extraído. Já a absorbância a 260 nm

($A_{260\text{nm}}$) é utilizada para a quantificação do RNA total extraído, segundo a fórmula (Figura 11):

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260\text{nm}} \times F_c \times F_d}{1000}$$

Figura 11 - Fórmula para o cálculo da concentração de RNA ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). $A_{260\text{nm}}$ absorvância a 260 nm, F_c : fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorvância no comprimento de onda de 260 nm correspondente a $40 \mu\text{g RNA.mL}^{-1}$. F_d é o fator de diluição da amostra. O valor final é dividido por 1000 para expressar a unidade de concentração de RNA em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Retirado de Sambrook et al. (1989)

2.2.5 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA

O RNAm foi isolado a partir de alíquotas de $50 \mu\text{g}$ de RNA total pelo *kit Dynabeads[®] mRNA purification* (Invitrogen), que tem como princípio a separação magnética. Deste modo, microesferas contendo Oligo (dT)₂₅, covalentemente ligado à sua superfície, capturam e purificam RNAs poliadenilados. Outros RNAs desprovidos de cauda poli-A e DNA genômico são imediatamente eliminados. De acordo com as normas do fabricante, até $2 \mu\text{g}$ de mRNA podem ser obtidos a partir de $75 \mu\text{g}$ de RNA total e utilizando-se $200 \mu\text{L}$ de solução contendo as microesferas. Assim, as purificações do material vegetal foram conduzidas seguindo as instruções do fabricante.

A fita do cDNA de cada gene foi sintetizada com o auxílio do *kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR Platinum[®] Taq* (Invitrogen), em uma reação contendo $6,25 \mu\text{L}$ de Tampão 2X concentrado ($0,4 \text{ mM}$ de cada dNTP e $2,4 \text{ mM}$ de MgSO_2), $0,625 \mu\text{L}$ de cada *primer* específico (10 mM), $0,25 \mu\text{L}$ de RT/Platinum[®]Taq e $3,5 \mu\text{L}$ de RNAm, totalizando um volume final de $12,5 \mu\text{L}$. Os tubos contendo as misturas de reação foram colocados em termociclador (*Gene Amp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems*), com a seguinte programação: 1 ciclo de 50°C por 30 min e 94°C por 2 min, para síntese de cDNA e pré-desnaturação da enzima transcriptase reversa; e 10 ciclos de 94°C durante 45 s, $55^\circ\text{C}/57^\circ\text{C}/60^\circ\text{C}$, dependendo do *primer*, durante 1 min, 72°C durante 2 min e 30 s para amplificação dos fragmentos.

2.2.6 PCR quantitativo (qPCR)

As reações foram realizadas em triplicatas biológicas, com três repetições técnicas, para cada um dos genes analisados (Tabela 1). Para o preparo das reações, adicionaram-se $10 \mu\text{L}$ de *SYBR Green* (*SYBR Green real-time RT-PCR*

SuperMix – UDG); 2,4 µL de cDNA diluído (10^{-1}); 0,8 µL de cada *primer* (10 µM), em um volume final de 20 µL. Controles negativos, sem a adição de cDNA, foram utilizados para confirmar a ausência de qualquer contaminante na reação ou problemas com os pares de *primers*. As reações de qPCR foram realizadas em equipamento IQTM 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad), com a seguinte programação: 1 ciclo de 95 °C por 15 min, para desnaturação da amostra e ativação da enzima; 50 ciclos de: 95 °C por 20 s, 55 °C/57 °C/60 °C (dependendo dos *primer*) por 30 s e 72 °C por 30 s para amplificação dos fragmentos, com leitura da fluorescência a 72 °C, 1 ciclo de 95 °C por 30 s e 1 ciclo de 55 °C por 30 s. Para analisar a especificidade dos produtos amplificados, foram geradas curvas de dissociação dos *primers* (curva de *melting*), adicionando-se às reações 1 ciclo, com a temperatura elevando-se de 55 a 95 °C com leitura da fluorescência a cada minuto. Para obtenção dos valores da eficiência de cada reação e do C_q , os dados brutos (sem correção da linha de base) referentes aos níveis de fluorescência de cada amostra foram analisados no programa *LinReg* 11.0 (disponível em <http://LinRegPCR.HFRC.nl>) (REMAKERS et al., 2003). Este método tem por princípio que a eficiência da reação da qPCR para um dado gene não é a mesma que para os demais genes, ou seja, não é constante. Assim, propõe o cálculo da eficiência com base na regressão linear da fluorescência (Log) para cada amostra. Deste modo, o valor de inclinação da reta é utilizado para o cálculo da eficiência individual ($E = 10^{\text{slope}}$).

Os valores de expressão relativa e testes estatísticos foram calculados pelo programa *REST* (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002).

Este *programa* considera os valores de C_q do tratamento e controle para calcular a expressão gênica e posteriormente calcula a expressão relativa aos genes de referência, de acordo com a seguinte equação:

$$ER = \frac{(E_{\text{Alvo}})^{\Delta C_q \text{ Alvo (Média Controle – Média tratamento)}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_q \text{ Ref. (Média Controle – Média tratamento)}}$$

Onde: **ER** = Expressão Relativa, **E** = Eficiência média dos genes, **Ref** = gene de referência.

2.2.7 Seleção dos genes de referência

Para obtenção do par de genes mais estável entre as amostras de verão e inverno, quatro candidatos a genes de referência (α -tubulina, β -actina, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase citoplasmático) foram analisados no aplicativo *NormFinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (ANDERSEN et al., 2004). O *NormFinder* calcula o valor de estabilidade para cada um dos possíveis genes de referência, fornecendo um *ranking* de estabilidade onde os genes mais estáveis são aqueles que apresentam os menores valores. O programa fornece também a melhor combinação entre dois genes a serem usados como referência.

Os genes α -tubulina, β -actina, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase citoplasmático foram previamente selecionados com base em dados da literatura e em trabalhos anteriormente desenvolvidos no laboratório (CARVALHO et al., 2008; SALVATO, 2010).

2.2.8 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada segundo Hurkman e Tanaka (1986), com modificações. Aproximadamente 2 g de material vegetal, macerados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados em 15 mL de tampão de extração (0,7 M sacarose, 0.5 M Tris HCl pH, 0,1 M KCl, 50 mM EDTA, 2 mM PMSF e 2% β -mercaptoetanol) e mantido sob agitação durante 30 min a 4°C. Adicionaram-se 15 mL de fenol saturado em Tris HCl (pH 8,5) e os tubos foram novamente mantidos sob agitação por 30 min a 4 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 min, 10.000xg a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para tubos novos e o material precipitado foi descartado. Com a finalidade de eliminar impurezas da amostra, duas lavagens adicionais com tampão de extração, contendo o mesmo volume de fenol saturado em Tris-HCL, foram realizadas, seguindo os mesmos passos de agitação e centrifugação descritos acima. Em seguida, as proteínas foram precipitadas a -20° C por 16 h pela adição de 5 volumes de acetato de amônio (0,1 M) preparado em metanol. Após a precipitação, o material foi centrifugado a 10.000xg por 30 min a 4°C. O precipitado recuperado foi lavado 2 vezes com acetato de amônio (0,1 M) em metanol, seguido de mais uma lavagem com metanol (100%) e outra com acetona (100%). Entre cada lavagem, o material permaneceu por 2h a -20°C e em seguida

foi centrifugado a 10.000xg por 30 min a 4 °C. O precipitado resultante foi submetido à secagem em dessecador a 4 °C.

2.2.9 Solubilização e quantificação das proteínas

As proteínas extraídas foram solubilizadas em 1 mL de tampão de solubilização (7M Uréia, 2M Tiouréia, 0,4% de Triton-X 100 e 50mM ditiotretol e armazenadas a -80 °C.

Para quantificação das proteínas totais, foi utilizado o Kit BioRad Protein Assay (BioRad), de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Inicialmente, para estabelecimento da curva padrão, foram obtidas as absorbâncias de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA), em espectrofotômetro (U-3300 - Hitachi®), a 595 nm. Em seguida, foram preparadas triplicatas contendo 5 µL do extrato protéico, 800 µL de reagente de Bradford diluído em água milliQ (1:4) e 1 mL de água milliQ. Os volumes foram transferidos para cubetas de vidro, seguindo-se de leitura das absorbâncias (595 nm). A concentração das proteínas totais, foi obtida mediante uma curva-padrão.

2.2.10 SDS-PAGE (Mini-Gel)

Após a quantificação, o extrato protéico foi submetido à verificação da qualidade das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). Para tanto, foram utilizados 10 µg de proteínas totais e duas vezes o volume de tampão de desnaturação (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10% Glicerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoetanol e 1% azul de bromofenol). As amostras foram mantidas a 100 °C por 1 min e aplicadas em gel de poliacrilamida 10 cm x 8,5 cm (Mini- PROTEAN II Cell, BioRad), juntamente com um marcador de peso molecular (Kaleidoscópio, BioRad). Para realização da eletroforese, o gel foi preparado com duas concentrações diferentes de poliacrilamida. O *stacking* gel (gel de empilhamento), equivalente aos primeiros 2 cm junto as canaletas, foi preparado na concentração de 4% (p/v) de Bis-acrilamida e as amostras foram submetidas a uma voltagem fixa de 50 V. Já o *running* gel (gel de corrida), referente a porção inferior, foi preparado na concentração de 12,5% (p/v) de acrilamida e as amostras submetidas a uma voltagem de 80 V até atingirem o limite inferior do minigel. Para a corrida foram utilizados tampões Laemmli inferior (25 Mm Tris, 192 Mm Glicina) e superior (25 Mm Tris, 192 Mm Glicina, 01% p/v SDS).

2.2.11 Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975) consiste de duas etapas: separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) pela focalização isoelétrica (primeira dimensão) e separação por peso molecular pela eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão).

2.2.12 Focalização isoelétrica (primeira dimensão)

A focalização isoelétrica (IEF) foi conduzida em sistema *Ettan IPGPhor 3* (GE Healthcare) a 20 °C utilizando-se fitas de 10 cm com gradiente pré formado de pH 4-7 (*IPG strips*, GE Healthcare). Quinhentos microgramas de proteínas totais da região cambial foram submetidos a este processo.

As fitas foram reidratadas por 12h a 20 °C com solução contendo as proteínas dissolvidas em tampão de solubilização (descrito no item 4.3) acrescido de 10 mM DTT, 4% p/v CHAPS e 1% de anfólito (*IPG buffer 4-7*, GE Healthcare). Sobre as fitas, foi adicionado 1 mL de óleo mineral (*Fluid Cover*, Amersham Pharmacia Biosciences) para evitar a evaporação dos reagentes durante a focalização.

A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 12h de hidratação, 100 V por 1 h, 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 5000 V por 1 h e 8000 V até atingir a voltagem acumulada de 80.000 Vh. Após a focalização, as fitas foram lavadas com água MilliQ e estocadas a -80°C até o momento de uso.

2.2.12.1 Eletroforese (segunda dimensão)

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio (0,5 M Tris pH 8,8, 6 M Uréia, 2% SDS e 30% Glicerol). Para a redução, as fitas foram imersas em solução de equilíbrio acrescida de 2 % (p/v) de DTT, por 15 min. Em seguida, realizou-se a alquilação e as fitas foram imersas em solução de equilíbrio contendo 4% (p/v) de Iodoacetamida (IAA) e traços do corante azul de bromofenol por 15 min.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical homogêneo (180 X 160 X 1,5 mm), preparado com 12,5% Acrilamida/ Bis-acrilamida, 0,5 M Tris HCl pH 8,8, 0,5% (v/v) persulfato de amônio e 0,075% (v/v) TEMED. Após a redução e alquilação, as fitas foram dispostas sobre o gel de acrilamida e fixadas com 0,8% (p/v) agarose. A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 4 °C em cuba modelo PROTEAN II XI 2-D Cell (BioRad, Hercules, Califórnia). No primeiro estágio

(30 min), utilizou-se uma corrente fixa de 16 mA por gel e, no segundo estágio, 30 mA por gel.

2.2.13 Coloração dos géis

Após a eletroforese, tanto os mini-géis quanto os géis bidimensionais foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* G-250, de acordo com Candiano et al. (2004). Os géis foram mantidos por 1 h em solução fixadora (40% v/v Etanol, 10% v/v Ácido acético em água MilliQ). Em seguida, esta solução foi removida e adicionou-se a solução de coloração (0,1% p/v *Coomassie* G-250, 10% v/v Ácido fosfórico, 10% p/v Sulfato de Amônio e 20% v/v Metanol), que permaneceu em contato com os géis por no mínimo 12 h. Todas estas etapas foram realizadas sob leve agitação, com auxílio de um agitador de mesa horizontal. O excesso de corante foi removido com água MilliQ e os géis mantidos em 5 % (v/v) de ácido acético a 4 °C, até a análise das imagens e retirada dos *spots* (proteínas identificadas no gel).

2.2.14 Obtenção e análise das imagens

A digitalização das imagens dos géis foi realizada por meio de um *scanner* (Image scanner III-GE Healthcare), com resolução de 300 dpi, pelo programa LabScan versão 7.0 (GE Healthcare). Para a análise das imagens, utilizou-se o programa *Image Master 2D Platinum* 7.0 (GE Healthcare).

As imagens dos géis bidimensionais foram primeiramente trabalhadas no sentido da detecção automática dos *spots*, adotando-se os seguintes parâmetros: *smooth*= 8, área mínima= 15 e *saliência*= 40. Após a detecção, foram realizadas correções com a adição, remoção e arranjo manual dos *spots*. Numa primeira etapa, o *Image Master* compara os géis da triplicata em um nível hierárquico denominado *Match*. O objetivo desta análise é verificar a reprodutibilidade entre as triplicatas. Deste modo, o programa avalia a variação de volume entre os *spots*, disponibilizando uma tabela contendo os coeficientes de variação. Assim, *spots* que apresentaram variação maior que 30% foram desconsiderados da análise. Num segundo momento, o programa compara os tratamentos em um nível denominado *Classes*. O objetivo desta comparação é informar quais *spots* foram diferencialmente ou preferencialmente expressos, mediante teste ANOVA ($p < 0,05$).

Dentro de cada triplicata (verão e inverno) foi efetuado o *Match Gels*, que promove a comparação e normalização entre os *spots* das triplicatas. Após esta etapa, foi iniciada a análise em *Classes*, onde há o confronto entre os tratamentos, visando à identificação de proteínas diferencialmente expressas ou exclusivas. Para esta determinação foram considerados os volumes normalizados dos *spots*, prosseguindo-se automaticamente com a análise de variância (ANOVA) a 5% de significância.

2.2.15 Digestão *In-gel* de proteínas

Os *spots* selecionados foram retirados de cada repetição dos géis em segmentos de aproximadamente 1 mm³ com auxílio de um bisturi e acondicionados em tubos de microcentrífuga. Em seguida, foi adicionada solução de descoloração (50% v/v Acetonitrila (ACN) e Bicarbonato de Amônio (AMBIC, 25 Mm) até a total remoção do corante.

Após desidratação com 100% de ACN, foi realizada redução e alquilação dos *spots*. Para tanto, os fragmentos de gel foram reidratados com DTT (20 mM) em AMBIC (50 Mm) e incubados por 40 min a 55 °C. O líquido excedente foi removido e substituído por iodoacetamida (IAA, 55 mM) em AMBIC (50 Mm). Os fragmentos de gel foram mantidos no escuro por 30 min à temperatura ambiente. O líquido excedente foi novamente removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com 100% de ACN, os fragmentos foram reidratados com solução de 10 ng μL^{-1} de tripsina (Promega V5111) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0. Após reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com AMBIC (25 Mm) e a digestão realizada a 37 °C por 16h.

A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (50% ACN, 5% ácido fórmico, Água Milli-Q 45%) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas com solução de eluição I (60% metanol, 1% ácido fórmico, 39% Água Milli-Q) e solução de eluição II (50% ACN, 1% ácido fórmico, 49% Água Milli-Q), seguidas da lavagem final com 100% de ACN. Em cada uma das etapas de eluição, os fragmentos de gel foram sonicados por 20 min a 45 °C (sonicador Ultra Som modelo Thronton, IPE Eletrônica Ltda, Vinhedo, Brasil), o sobrenadante de cada *spot* transferido para tubo de microcentrífuga e o volume reduzido em concentrador a vácuo (modelo 5301, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à

temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram purificadas utilizando-se Zip-Tips (modelo C18, Millipore, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.16 LC-MS/MS

Os peptídeos foram solubilizados em 1% (v/v) de ácido fórmico e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas.

Uma alíquota de cada amostra (3 μL) foi injetada para separação cromatográfica dos peptídeos no equipamento nano-Acquity UPLC (Waters®), equipado com coluna analítica BEH130 C18 (150 μm x 100mm, 1.7 μm , Waters®), pré-coluna XBridge C18 (300 μm x 50 mm, 5 μm) e coluna de retenção C18 (Symmetry® C18, 180 μm x 20 mm, 5 μm). O sistema foi configurado para 2D, com método de diluição usando dois sistemas binários de bombas. Os analitos foram carregados na pré-coluna com 97% do tampão A₁ (20 mM formiato de amônio, pH10), com fluxo de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 10.5 min. O gradiente de corrida iniciou-se com 3% do tampão B₁ (100% acetonitrila), aumentando para 65% B₁ por 5 min, seguido de equilíbrio com 97% A₁. Os peptídeos foram eluídos da coluna de retenção por meio de um gradiente linear iniciado com 10% de tampão B₂ (100% acetonitrila, 0.1% ácido fórmico), aumentando para 40% por 26 min, seguido de 85% por 10 min para eluição dos peptídeos através da coluna analítica. O fluxo foi ajustado para 400 nL min⁻¹, com tempo de corrida total de 45 min. As colunas foram então reequilibradas com as condições iniciais 90% A₂ (100% água, 0,1% ácido fórmico) e 10% B₂. O seqüenciamento das proteínas foi conduzido na plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas híbrido quadrupolo/ “time of flight” (Q-TOF) Ultima API (Waters®), acoplado a um sistema on-line de nanoAcquity UPLC liquid chromatograph (Waters®). As variações de calibração que ocorrem durante a aquisição dos espectros foram corrigidas com o sistema *Nanolock Spray* (Waters®). Todas as aquisições foram calibradas com um peptídeo padrão GFP (GLU1-fibrinopeptide B; Sigma), em concentração igual a 100 fmol μL^{-1} e injeção automática de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$.

2.2.17 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas

Os espectros de massas das amostras foram processados utilizando-se os programas *MassLynx NT BioLynx V.4.0* e *ProteinLynx V.2.1* (Waters). A interpretação dos espectros MS/MS foi realizada pelo programa *Mascot Daemon* (PERKINS et al., 1999). Mediante a aquisição da licença deste programa é possível que bancos de dados específicos/ de interesse sejam adicionados localmente. Assim, os espectros processados foram contrastados com os bancos *Eucalyptus*, cujas sequencias protéicas foram provenientes do genoma do eucalipto – disponível em www.phytozome.net/eucalyptus.php, *SwissProt* e NCBI.

O *Mascot Daemon* trabalha com algoritmo do tipo aproximação probabilística, de modo que é calculada a probabilidade com que o *match* (alinhamento) observado entre o dado experimental e os dados do banco escolhido seja um evento randômico. Assim, o *match* que apresentar a menor probabilidade de ser um evento aleatório é considerado o melhor (PERKINS, et al., 1999; KÖCHER et al., 2010), indicando a proteína predita para o dado experimental. Como resultado, é fornecido um histograma e um valor de *score* (Figura 12), que é proporcional à probabilidade logarítmica negativa ($-10 \cdot \log(P)$) de uma proteína encontrada (*match*) ser aleatória (PERKINS et al., 1999). O valor do *score* é dependente do número de *matchs* e do tamanho do banco de dados, sendo considerado um evento significativamente aceitável se ocorrer a uma frequência menor que 5% ($p < 0,05$). Um *match* significativo deve possuir *score* maior ou igual a 70 (PERKINS et al., 1999).

Figura 12 - Histograma apresentado pelo programa *Mascot*. A área sombreada em verde indica eventos aleatórios de *matching*, enquanto que o *outlier* (barra vermelha) fora da área sombreada com *score* 108 representa o evento não aleatório, ou seja, o *match* com maior probabilidade de identidade da proteína

A escolha dos parâmetros (Figura 13) utilizados no *Mascot Daemon* tem grande influência na precisão da identificação das proteínas. Além da escolha

correta do banco de dados, outros parâmetros são muito importantes, tais como taxonomia, modificações fixas e variáveis, tolerância de massas, carga dos peptídeos, formato dos dados e instrumento. Dessa maneira, como as amostras foram reduzidas e alquiladas, selecionou-se a carbamidometil (C) como modificação fixa. Também selecionaram-se a oxidação da metionina como modificação variável e tolerância de massa de 50 ppm. Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores *scores*, área de cobertura e número de peptídeos, verificando-se também a correspondência entre massa molecular e ponto isoelétrico dos *spots* com as proteínas encontradas nos bancos de dados.

The screenshot displays the MASCOT search interface with the following parameters:

- Your name:** ilarafrass
- Email:** ilarafrass@gmail.com
- Search title:** (empty)
- Database(s):** SwissProt, NCBI nr, contaminants, cRAP, MSDB
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Quantitation:** None
- Taxonomy:** . . . Viridiplantae (Green Plants)
- Fixed modifications:** Carbamidomethyl (C)
- Variable modifications:** Oxidation (M)
- Display all modifications:** ☐
- Peptide tol. ±:** 50 ppm
- # 13C:** 0
- MS/MS tol. ±:** 0.6 Da
- Peptide charge:** 2+, 3+ and 4+
- Monoisotopic:** ☒ Average ☐
- Data file:** (empty) Procurar...
- Data format:** Micromass (.PKL)
- Instrument:** ESI-QUAD-TOF
- Decoy:** ☐
- Precursor:** (empty) m/z
- Error tolerant:** ☐
- Report top:** AUTO hits
- Buttons:** Start Search ..., Reset Form

Figura 13 - Parâmetros utilizados no programa MASCOT para identificação das proteínas

2.2.18 Extração e análise de açúcares solúveis da região cambial

2.2.18.1 Preparo das amostras

Para completa remoção da umidade, aproximadamente 5g de material, macerado em nitrogênio líquido, foi liofilizado por 24h.

2.2.18.2 Quantificação dos carboidratos solúveis totais (CST)

A extração dos carboidratos solúveis totais (glicose, frutose e sacarose) foi realizada como descrito em Bragatto (2010).

Para o tecido da região cambial, foi adicionado 1 mL de água milliQ em 20 mg do material liofilizado e mantido em banho-maria a 80°C por 1h, com agitação a cada 10 min. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min a 16.000xg e

acondicionado a 4 °C até o momento do uso. As quantificações foram realizadas no equipamento ICS 2500, HPLC Dionex[®] equipado com DS50 gradiente; detector amperométrico ED50 com eletrodo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste foi H₂O milliQ e o eluente de limpeza 200mM de NaOH. O fluxo foi de 0,25 mL min⁻¹ e a pressão no sistema foi de aproximadamente 2500 psi. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250 mm), com coluna-guarda CarboPac PA10 (4 x 50mm).

2.2.18.3 Análise estatística dos dados de carboidratos solúveis

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste Tukey de comparação múltipla (P<0,05), com auxílio do programa SAS.

2.2.19 Extração de metabólitos

A análise do perfil metabólico (extração, identificação e análise estatística inicial) da região cambial de *E. grandis* foi desenvolvida na Universidade de Umea (*Umea Plant Science Centre* – Umea, Suécia), sob a supervisão do professor Thomas Moritz.

Metabólitos da região cambial foram extraídos a partir de 5 mg de material seco. Para tanto, o tecido foi macerado em nitrogênio líquido e liofilizado por 24 h em equipamento Modulyod-230 (*Thermo Scientific*). Em seguida, o material foi acondicionado em tubos criogênicos e mantido à temperatura ambiente até o momento da extração.

As amostras foram pesadas e armazenadas em tubos de 1,5 mL. A extração foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Gullber et al. (2004), com algumas modificações. Foi adicionado 1 mL de tampão de extração (20% clorofórmio (v/v), 20% água (v/v) e 60% metanol (v/v)), contendo 11 isótopos estáveis como padrões internos: (¹³C₃)-ácido mirístico, (¹³C₄)-ácido hexanodecanóico, (²H₄)-ácido succínico, (¹³C₅, ¹⁵N)-ácido glutâmico, (²H₇)- colesterol, (¹³C₅)-prolina, (¹³C₄)-α-cetoglutarato, (¹³C₁₂)-sacarose, (²H₄)- putrescina, (²H₆)-ácido salicílico e (¹³C₆)-glicose. Visando aumentar a eficiência da extração, foi adicionada uma esfera magnética de tungstênio (Retsch GmbH & Co. KG) por tubo e as amostras foram levadas para agitador (MM 301 *vibration mill*, Retsch GmbH & Co. KG), com frequência de 30 Hz s⁻¹, por 3 min. As esferas magnéticas foram removidas e as amostras centrifugadas por 10 min, 14.000xg a 4 °C.

Posteriormente o sobrenadante foi transferido para tubos *vials* e, desses tubos, alíquotas de 100 μL foram retiradas e acondicionadas em tubo *vial* específico para GC-MS. As amostras foram então levadas para concentrador a vácuo à temperatura ambiente por 2 h. Na etapa seguinte, as amostras foram derivatizadas. Inicialmente, foram adicionados 30 μL de metoxiamina (15 mg mL^{-1}) em pirimidina, as amostras foram agitadas por 10 min e em seguida mantidas em repouso por 16h à temperatura ambiente. A sililação foi realizada com a adição de 30 μL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras foram mantidas em repouso por 1 h. Posteriormente, foram adicionados 30 μL de Heptano, com 15 ng/g de metil-esterato.

As amostras foram analisadas de acordo com Gullberg et al. (2004), por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/TOFMS). Nesta etapa, foram utilizadas também amostras controle (brancos) e uma série de alcanos ($\text{C}_{12} - \text{C}_{40}$), o que possibilita o cálculo dos índices de retenção (SCHAUER et al., 2005).

2.2.20 Cromatografia gasosa e espectrometria de massas

A amostra derivatizada (1 μL) foi automaticamente injetada no modo *split* (1:20) e *splitless* em cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A), equipado com coluna de 30 m $\times$ 0.25 (J&W Scientific, Folsom, CA). A temperatura de injeção foi 260 $^{\circ}\text{C}$, com fluxo de 20 mL min^{-1} , iniciado após 75 s. O fluxo de gás pela coluna foi 1 mL min^{-1} , com temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, aumentando 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 320 $^{\circ}\text{C}$, por 4 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do equipamento *Pegasus HT time-of-flight mass spectrometer*, GC/TOFMS (Leco Corporation). A temperatura da fonte de íons foi 200 $^{\circ}\text{C}$, feixe de elétrons 70-eV, corrente de ionização de 2.0 mA e 20-30 espectros s^{-1} sendo registrados na faixa de 50-800 m/z . A voltagem de aceleração foi ligada após 290 s e a voltagem do detector foi 1450-1490 V.

2.2.21 Identificação dos metabólitos e análise estatística

Os cromatogramas gerados foram exportados para o programa *ChromaTOF*, versão 4.32. Neste programa foi realizada a identificação dos metabólitos com base na comparação do índice de retenção, massa e cromatograma das amostras com bibliotecas internas (gcms_std_100817, artefacts, maxplanck, metabolomics_081121 e mpi_public_06). Posteriormente, as

informações (massa e índice de retenção) referentes aos metabólitos identificados foram exportadas para o programa *Matlab*, versão 7.11, onde foi realizado o processamento dos dados (correção da linha de base e alinhamento dos cromatogramas) e obtenção da área calculada de cada metabólito. Para a execução do *MatLab* é necessário a utilização de *scripts*. Deste modo, foram utilizados dois *scripts*, desenvolvidos na universidade de Umea, para identificação da série de alcanos e alinhamento. Posteriormente, foi realizada a normalização dos dados. Para tanto, foi encontrado um fator de correção, através do programa *SIMCA*, considerando os valores das áreas de cada padrão interno. A normalização dos dados procedeu da seguinte maneira:

Área Metabólito/ peso (mg)/ Fator de normalização

As análises estatísticas foram realizadas nos programas: SIMCA-P+ 12.0.1 (análise de componentes principais (PCA e *Loading Plot*)) e “R” (identificação dos metabólitos significativos). Para a análise no “R” foi desenvolvido um *script in-house* a partir do trabalho de Papini-Terzi et al. (2005), onde é determinado um limiar para a seleção dos metabólitos diferenciais, baseando-se na análise HT-self (VENCIO; KOIDE, 2005). Para o estabelecimento do limiar considera-se a variância conjunta de metabólitos arbitrários com intensidades de magnitudes semelhantes e estima-se testes não paramétricos de significância, que consiste uma alternativa para experimentos com amostragem em triplicatas biológicas (VENCIO; KOIDE, 2005). Para as análises foram estabelecidos três limiares, 100%, 50% e 30%. Assim como nos demais protocolos apresentados no presente trabalho para a identificação dos metabólitos mais ou menos abundantes, as amostras referentes ao inverno foram utilizadas como referência. Deste modo, os limiares de 100%, 50% e 30% indicam metabólitos, no mínimo, uma vez, 0,5 vezes e 0,3 vezes mais abundantes durante o verão ou inverno, respectivamente.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análise de transcritos da região cambial de *E. grandis* atuantes no metabolismo primário

O PCR quantitativo foi realizado para verificar diferenças sazonais no perfil transcricional de genes atuantes no metabolismo primário na região cambial de *E. grandis*.

2.3.1.2 Escolha dos genes de referência

Conforme já descrito no item 2.2.7 (material e métodos) os genes α -tubulina, β -actina, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase citoplasmático foram selecionados como possível genes de referência e foram analisados no aplicativo *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004). Com base nesse programa, a α -tubulina foi o gene mais estável, com valor de estabilidade igual a 0,49 (Tabela 2) e a combinação dos genes α -tubulina e malato desidrogenase representou o par mais estável, com o valor de 0,322 (Figura 14). Deste modo, os genes α -tubulina e malato desidrogenase foram estabelecidos como genes de referência para normalização dos demais genes-alvo.

Tabela 2 - Ranking de estabilidade dos genes candidatos a genes de referência obtido pelo programa *NormFinder*

Gene	Valor da Estabilidade
TUB	0,494
ACT	0,935
MALD	0,679
ISOC	0,666

Figura 14 - Valores de estabilidade para os potenciais genes de referência fornecidos pelo programa *NormFinder*. TUB (tubulina), ACT (actina), MALD (malato desidrogenase) e ISOC (isocitrato desidrogenase)

Para estabelecer a melhor combinação de genes de referência para estudos com *Eucalyptus* spp, Oliveira et al. (2012) realizaram experimentos de qPCR utilizando três tecidos (flor, folha e xilema) provenientes de seis espécies (*E. grandis*, *E. globulus*, *E. dunni*, *E. saligna*, *E. pellita* e *E. urophylla*). Os autores encontraram oito genes potencialmente estáveis, onde a combinação *Eucons04* (proteína Cdk8) +

Eucons08 (fator de alongamento *sll*) foi o par mais estável para folha e xilema. Dentre os genes apresentados pelos autores, encontra-se uma α -tubulina. Porém, a malato desidrogenase não foi detectada. Trabalho semelhante com *E. grandis* x *E. urophylla* buscou a identificação de genes de referência para estudos de expressão gênica de folhas infectadas pelo fungo *Puccinia psidii* e com a adição de acibenzolar-S-metil, um indutor de resistência (BOAVA et al., 2010). Além disso, Almeida et al. (2010) estabeleceram a alfa-tubulina (*TUA*) e a histona H2B (*H2B*) como genes de referência para estudos da formação de raízes adventícias em *E. globulus*.

2.3.1.3 PCR quantitativo (qPCR)

Para a apresentação e discussão dos resultados obtidos por qPCR, cada via metabólica estudada encontra-se apresentada separadamente. Considerando-se que durante o inverno as arbóreas apresentam menor atividade metabólica, este período foi usado como referência em relação ao verão. Assim, os dados de expressão relativa exibem a razão verão/inverno.

2.3.1.4 Glicólise e fermentação alcoólica

A partir da observação da expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, verificou-se a expressão diferencial de oito transcritos, dos quais cinco foram mais expressos durante o inverno, sacarose sintase (*SuSy1* – EC 2.4.1.13), glicose-6-fosfato isomerase (*GPI* – EC 5.3.1.9), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH* – EC 1.2.1.12), fosfoglicomutase (*PGM* – EC 5.4.2.2) e fosfoenolpiruvato (*PFP* – EC 2.7.1.90); e três apresentaram maior acúmulo de transcritos durante o verão fosfoglicerato quinase (*PGK* – EC 2.7.2.3), piruvato quinase (*PK* – EC 2.7.1.40) e fosfoglicerato mutase (*PGAM* – EC 5.4.2.1) (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como controle. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ALDO* (frutose bifosfato aldolase); *GPI* (glicose 6 fosfato isomerase); *PGK* (fosfoglicerato quinase); *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); *PK* (piruvato quinase); *PEPC* (fosfoenolpiruvatocarboxilase); *PFK* (fosfofrutoquinase-ATP-dependente); *ENO* (enolase); *PGM* (fosfoglicomutase); *PGAM* (fosfoglicerato mutase); *PDH* (piruvato desidrogenase); *SuSy1* (sacarose sintase 1); *SuSy3* (sacarose sintase 3); *PFP* (fosfofrutoquinase-PPi-dependente)

Figura 16 - Ilustração esquemática da glicólise e fermentação alcoólica. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão ou inverno, respectivamente

Estes resultados sugerem que, a nível transcricional, o metabolismo glicolítico é regulado de modo diferencial nos dois períodos analisados. Durante o inverno, há o favorecimento da rota de acúmulo de sacarose e, durante o verão, o fluxo é no sentido da formação de piruvato, corroborando com a hipótese apresentada no trabalho. Tais resultados vão ao encontro com o fato das espécies arbóreas perenes terem desenvolvido mecanismos adaptativos, que alternam entre períodos de crescimento ativo e períodos de atividade metabólica reduzida, de modo a coordenarem seu crescimento e desenvolvimento às mudanças sazonais (PARK; KEATHLEY; HAN; 2008).

Dentre os genes mais expressos no inverno, *Susy1*, *GPI*, *PFP* e *GAPDH* atuam em reações reversíveis da via glicolítica, enquanto o *PGM* catalisa reação

irreversível (Figuras 15 e 16). É interessante notar que *PPF*, *GPI* e *PGM* atuam em etapas subseqüentes. Assim, estes três genes podem estar atuando no sentido da formação de glicose-6-fosfato (Glc-6P), enquanto a *Susy1* e o *GAPDH* estariam promovendo a formação de UDP-glicose (UDP-G) e gliceraldeído-3-fosfato (G-3P), respectivamente, sendo todos os “produtos” gerados metabólitos classificados como açúcares.

A UDP-G atua como doador de resíduos de glicose em reações de glicosilação, síntese de glicoproteínas e glicolipídeos. Este metabólito é essencial para formação de sacarose no citosol, síntese de celulose e calose nos plastídeos e está envolvida na formação de polissacarídeos de parede como hemicelulose e pectina (KLECZKOWSKI; KUNZ; WILCZYNSKA, 2010). O G-3P é uma triose fosfato e, a partir do momento em que este metabólito é formado no citoplasma, a rota glicolítica pode começar a consumir energia, que será utilizada nas etapas subseqüentes da via (fase de conservação de energia) (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A sacarose sintase (SuSy) é uma das principais enzimas do metabolismo da sacarose, sendo a única capaz de atuar tanto em seu catabolismo quanto em seu anabolismo (ROMER et al., 2004), mobilizando este carboidrato para diferentes vias (processos metabólicos, estruturais e de armazenamento) (SUBBAIAH et al., 2007). A SuSy catalisa a interconversão da sacarose e NDP a UDP-G e frutose, onde N pode ser uma uridina, adenosina, guanosina, citidina, timidina ou inosina (BAROJA-FERNANDEZ et al., 2003). Apesar de o UDP ser considerado o principal nucleosídeo metabolizado pela SUSY, o ADP também pode ser utilizado para a produção de ADP-glicose (ADP-G) (ZERVOSSEN; ROMER; ELLING, 1998; BAROJA-FERNANDEZ et al., 2003).

Embora a presença da SuSy na membrana plasmática indique a atuação da enzima no direcionamento do fluxo de carbono para a biossíntese de parede celular (AMOR et al., 1995), uma das principais funções atribuídas a essa enzima nos órgãos-dreno é a conversão da sacarose UDP-G, a qual é então transformada em hexoses-fosfato (glicose 1-fosfato e Glc- 6P) e ADP-G, que é requerida na biossíntese de amido (BAROJA-FERNANDEZ et al., 2012). Embora catalise uma reação reversível, os altos níveis da SuSy encontrados em tecidos não-fotossintetizantes indicam que esta enzima atua primeiramente degradando sacarose e produzindo UDP-G (AMOR et al., 1995).

Das duas isoformas analisadas, apenas a *SuSy1* foi significativamente transcrita. Os *primers* utilizados, para amplificação das *SuSys* foram desenhados com base nos dados apresentados por ZHOU (2005). O autor isolou os transcritos das duas isoformas da região cambial de *E. grandis*. A partir de análise por qPCR, foi verificada expressão significativa das duas isoformas no xilema, xilema imaturo, flores e folhas jovens. No entanto, a *SuSy1* foi mais expressa em todos os tecidos. O autor propõe que ambas as isoformas atuam na biossíntese de celulose durante o crescimento da parede secundária. No trabalho de Carvalho et al. (2008), a *SuSy* foi um dos genes mais expressos na região cambial de *E. grandis* e apresentou expressão diferencial neste tecido, quando comparado à expressão observada em folha e hipocótilos.

A fosfofrutoquinase P_{Pi}-dependente (*PFP*) catalisa a fosforilação reversível da frutose-6-fosfato (Fru-6P) a frutose-1,6-bisfosfato (Fru-1,6BP), utilizando pirofosfato (P_{Pi}) como doador de fosfato (WINKLER et al., 2007) (Figura 18). Esta enzima é regulada alostericamente pela hexose frutose-2,6-bisfosfato. Quando os níveis da hexose são altos, há a inibição da enzima gliconeogênica frutose-1,6-bisfosfatase e, conseqüentemente, tem-se o estímulo da *PFP* (MERTENS, 1991; SZOKE; 2006). Quando a *PFP* atua em direção à formação de Fru-1,6P₂, a produção de piruvato é favorecida. No entanto, quando a reação reversa ocorre (formação de Fru-6P), a síntese de sacarose passa a ser favorecida. A direção da reação da *PFP* depende da concentração dos produtos e substratos (FERNIE, 2001; SKOZE, 2006).

Em plântulas de *Pinus*, foi encontrada alta correlação entre a atividade da *SuSy* e da *PFP* após determinações da atividade enzimática ao longo do ano, de modo que ambas as enzimas tiveram sua atividade rapidamente alterada em resposta a variações sazonais (SUNG et al., 1993). Assim, os autores propuseram que a presença conjunta da *SUSY* e *PFP* em plântulas pode ser utilizada como um indicador de estresse, como por exemplo o frio. Esta mesma correlação foi citada por Plaxton e Podestá (2006). Situações de estresses ambientais como anoxia, hipoxia, escassez de Pi e/ou frio podem diminuir a disponibilidade de ATP para as plantas, com indução ou aumento da atividade da *SuSy*, UDP-Glicose-pirofosforilase (UGPase), *PFP* e H⁺P_{Pi}ase (pirofosfatase inorgânica) (PLAXTON; PODESTÁ, 2006).

A glicose 6-fosfato isomerase (*GPI*) tem função essencial tanto no processo glicolítico quanto no gliconeogênico (GRAUVOGEL; BRINKMANN; PETERSEN; 2007). A enzima catalisa a isomerização reversível da Glc-6P e Fru-6P, reação que nas plantas precede a biossíntese de sacarose (LAL; SACHS; SUBBAIAH; SAAB, 1996).

A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) é considerada uma enzima chave na partição de energia e poder redutor nas células vegetais (BUSTOS; IGLESIAS, 2003). Ela catalisa a oxidação reversível da G3-P a 1,3 bifosfoglicerato, com a redução NAD^+ a NADH (PLANXTON, 1996). Transcritos da *GAPDH* foram identificados no xilema em desenvolvimento de *Pinus pinaster* (PAIVA et al., 2008) e na região cambial de *Populus tremula P. x tremuloides* (PILATE et al., 2004).

A fosfoglicomutase (*PGM*) também atua em um ponto importante do metabolismo de carboidratos. Em uma direção, a Glc-1P produzida a partir da sacarose é convertida a Glc-6P, o primeiro intermediário da glicólise. Na direção oposta, a converção da Glc-6P à Glc-1P fornece substrato para a síntese de UDP-G, a qual é requerida para a síntese de constituintes celulares, incluindo polímeros da parede celular e glicoproteínas (MANJUNATH et al., 1998).

Quanto aos genes mais abundantes no verão, *PGK* (fosfoglicerato quinase) e *PGAM* (fosfoglicerato mutase) catalisam reações reversíveis em etapas subseqüentes da glicólise, enquanto a *PK* (piruvato quinase) atua de modo irreversível. A *PGK* pode atuar na glicólise/gliconeogênese e no Ciclo de Calvin, catalisando a interconversão reversível do 1,3 bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato, com o consumo ou regeneração do ATP (KOPKE-SECUNDO; MOLNAR; SCHNARRENBARGER, 1990). A *PGAM* catalisa a conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. Um dos seus substratos, o 3-fosfoglicerato, não está envolvido apenas na glicólise, participando em outras importantes vias como o Ciclo de Calvin e a biossíntese de amido e carboidratos (WESTRAM et al., 2002). A *PK* promove a transferência de P_i proveniente do fosfoenolpiruvato para uma adenosina di-fosfato (ADP), resultando na formação de piruvato, com liberação de ATP (TURNER; KNOWLES; PLAXTON, 2005).

Como mencionado anteriormente, a maior expressão desses genes durante o verão indica que, neste período de maior atividade metabólica, a via glicolítica é bastante requerida para que ocorra a respiração celular, gerando poder energético e redutor para a célula. Para tanto, a PK catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato

(PEP) a piruvato, o qual é descarboxilado pela piruvato desidrogenase (*PDH*), na matriz mitocondrial, dando sequência ao TCA e à cadeia transportadora de elétrons. No entanto, pode-se observar nas Figuras 15 e 16 que, enquanto a *PK* foi mais expressa durante o verão, contribuindo para a formação de piruvato, o acúmulo de transcritos da *PDH* não foi estatisticamente significativo.

O processo de regeneração do NAD é realizado via fermentação alcoólica, com participação das enzimas piruvato descarboxilase (*PDC* – EC 4.1.1.1) e álcool desidrogenase (*ADH* – EC 1.1.1.1) e redução do piruvato a etanol (HARRY; KIMMERER, 1991). Em condições anaeróbias há o aumento da expressão gênica e atividade enzimática da *ADH* e *PDC* (KIMMERER; STRINGER, 1988; HARRY; KIMMERER, 1991). Tal fato corrobora os dados observados no presente trabalho, onde os genes que participam da fermentação alcoólica, *PDC* e *ADH*, foram mais expressos no verão, indicando a necessidade do metabolismo fermentativo para suprir a demanda energética celular durante o período de rápido crescimento (Figuras 16 e 17).

Figura 17 - Expressão relativa dos genes atuantes na fermentação alcoólica, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencialmente significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ADH1* (álcool desidrogenase 1); *ADH2* (álcool desidrogenase 2); *ADH3* (álcool desidrogenase 3); *PDC* (piruvato descarboxilase)

Analisou-se o padrão transcricional de três isoformas da *ADH*, nomeadas *ADH1*, *ADH2* e *ADH3*. Destas, apenas a isoforma 3 apresentou expressão estatisticamente significativa, sendo mais abundante durante o verão. A isoforma 2 apresenta uma tendência de também ser mais abundante no verão, enquanto a isoforma 1 possui tendência contrária, sendo mais abundante durante o inverno.

Estes dados sugerem que a *ADH3* é a isoforma requerida durante o processo fermentativo, no verão. No trabalho de Carvalho et al. (2008), foi identificado um *EST* correspondente a *ADH* (gi 103447114) na região cambial de *E. grandis* com três anos. Esta sequência tem alta identidade (97%) com aquela utilizada para o desenho do *primer* da *ADH2*. Os autores observaram o nível de expressão deste gene no xilema em desenvolvimento e na folha e não encontraram expressão diferencial entre os dois tecidos. O gene foi diferencialmente expresso em hipocótilos de *E. grandis* com 30 dias, germinados em ambiente com baixa disponibilidade de O_2 (CARVALHO et al., 2008). Ko et al. (2011) analisaram o perfil transcricional da região cambial de *Populus trichocarpa* nos períodos de inverno e verão. Os autores verificaram a expressão preferencial de genes envolvidos no metabolismo e modificação da parede celular, regulação transcricional e remodelamento da cromatina durante o inverno.

2.3.1.5 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA)

Dentre os três genes do TCA analisados no presente trabalho, succinil-CoA ligase (*SCL* – EC 6.2.1.5) e malato desidrogenase mitocondrial (*MDHm* – EC 1.1.1.37) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em sua expressão. A *SCL* teve maior número de transcritos durante o verão, enquanto a *MDHm* foi mais expressa durante o inverno (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Expressão relativa dos genes atuantes no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ISOCIT* (isocitrato desidrogenase); *SCL* (succinil CoA ligase); *MDHm* (malato desidrogenase mitocondrial)

Figura 19 - Ilustração esquemática do Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam aqueles mais expressos durante o verão ou inverno, respectivamente

A *SCL* catalisa a interconversão do succinil-CoA a succinato. O acúmulo do succinato é um processo conhecido em plantas expostas a hipoxia (ROCHA et al., 2010; VAN-DONGER et al., 2008). Este acúmulo pode explicar no presente estudo a maior expressão do *SCL* durante o verão, quando a região cambial é exposta a condição de hipoxia. Apesar da importância do TCA para o metabolismo vegetal, pouco é conhecido sobre a expressão dos genes que participam desta via (FERNIE; CARRARI; SWEETLOVE, 2004; SWEETLOVE et al., 2010), principalmente em arbóreas.

A *MDHm* catalisa a conversão reversível do malato em oxaloacetato, com a redução ou oxidação do NAD. Embora a reação seja reversível, o principal fluxo da via é em direção à redução do malato e depende da razão substrato/produto e do estado redox do NAD (TOMAZ et al., 2010). No presente trabalho, foi observada baixa expressão do *MDHm* durante o verão, sugerindo acúmulo de malato na região cambial durante este período. Citrato e malato são os ácidos orgânicos predominantes no xilema e floema. Ademais, o malato é um importante substrato para a respiração mitocondrial, podendo ser oxidado a piruvato, com redução de NAD e liberação de CO₂ por ação da enzima NAD-málica, presente na matriz mitocondrial (HELDT; HELDT, 2005). O malato mitocondrial pode ser também transportado para o citosol através da válvula do malato, a qual permite a

transferência de equivalentes redox entre a matriz mitocondrial e o citosol (ZOGLOWEK; KROMER; HELDT, 1988).

2.3.1.6 Fotossíntese: fixação do carbono

Em relação ao metabolismo fotossintético, três genes apresentaram expressão diferencial: anidrase carbônica (*CA* – 4.2.1.1), Rubisco subunidade maior (*RbcL* EC 4.1.1.39) e Frutose-1,6-bisfosfato aldolase cloroplastidial (*FBAcl* – 4.1.2.13), sendo todos mais expressos durante o inverno (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Expressão relativa dos genes atuantes na fotossíntese, na região cambial de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *NADPme* (enzima málica-NADP); *CA* (anidrase carbônica); *RbcS* (rubisco subunidade menor); *RbcL* (rubisco subunidade maior); *FBAcl* (frutose bisfosfato aldolase cloroplastidial); *RPI* (ribose 5-fosfato isomerase)

Figura 21 - Ilustração esquemática da fotossíntese. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR na região cambial de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam aqueles mais expressos durante o verão e o inverno, respectivamente.

A CA catalisa a interconversão reversível de HCO_3^- a CO_2 . A biossíntese da enzima é regulada pela densidade de fluxo de fótons, concentração de CO_2 e disponibilidade de zinco (KUMAR; SINGH; ANSARI, 2005). Nas plantas C3, a CA encontra-se principalmente distribuída no estroma dos cloroplastos, onde atua mediando a difusão do CO_2 até o seu sítio de descarboxilação pela rubisco. Assim, a principal função da CA nos órgãos fotossintéticos é favorecer a assimilação de carbono inorgânico para as reações de carboxilação (AIVALAKIS et al., 2004). Evidências bioquímicas e citológicas também apontam uma função metabólica da CA na lipogênese, de modo que há maior expressão gênica durante o período de armazenamento de lipídios (HOANG; CHAPMAN, 2002).

Quanto à rubisco é interessante observar que no presente estudo foi possível encontrar transcritos para as duas subunidades da enzima. No entanto, apenas a *rbcL* foi significativamente abundante, durante o inverno. A rubisco é uma enzima bifuncional, catalisando a etapa inicial da fixação de CO_2 , no ciclo de Calvin-Benson,

e atuando como oxigenase na fotorrespiração (ELLIS, 1981). Nas plantas superiores, a rubisco é composta por oito subunidades maiores (*RbcL*), codificadas pelo genoma cloroplastidial, e oito subunidades menores (*RbcS*), codificadas pelo genoma nuclear (ELLIS, 1981). A subunidade maior contém o sítio catalítico da enzima e é responsável pelas funções oxigenase e carboxilase. A função da subunidade menor ainda é incerta, mas sugere-se que esta atue na determinação da eficiência da carboxilação e especificidade pelo CO_2 (FUKAYAMA, 2011). Ademais, há uma correlação positiva entre a capacidade fotossintética das folhas e a concentração de nitrogênio foliar, pois as proteínas do ciclo de Calvin-Benson e dos tilacóides contêm a maior parte do N disponível nas folhas (EVANS, 1989). Tal relação também foi observada no caule de diferentes arbóreas (BERVEILLER; KIERZKOWSKI; DAMESIN, 2007). É interessante notar que, no presente trabalho, apenas a *RbcL* teve expressão significativa, sendo mais expressa no inverno, justamente o período em que maior quantidade de CO_2 seria liberado no interior do câmbio como resultado da alta taxa respiratória.

Diversos autores têm estudado a fotossíntese cortical. No entanto, estes trabalhos abordam aspectos fisiológicos (FOOTE; SCHAEDELE, 1976; PFANZ et al., 2002; BERVEILLER et al., 2007; CERASOLI et al., 2009; SAVEYN et al., 2010), bioquímicos (BERVEILLER et al., 2007; BERVEILLER; DAMESIN, 2008; EYLES et al., 2009) e, mais recentemente, o perfil protéico (JUAN et al., 2006; CELEDON et al., 2007; DURAND et al., 2011). No entanto, há pouquíssimos trabalhos que reportam a identificação de transcritos relacionados à fotossíntese cortical. Como exemplo, tem-se o trabalho de Carvalho et al. (2008), no qual foram encontrados 62 transcritos (*tags*) para a *RbcS*, não sendo encontrados transcritos para a *RbcL*.

Considerando-se que no caule das arbóreas as altas taxas de crescimento e respiração, associadas à ausência de estômatos e à baixa permeabilidade à difusão de gases, favorecem a concentração de CO_2 , a função carboxilase da rubisco é favorecida em relação a sua função oxigenase (BERVEILLER; DAMESIN, 2008). Deste modo, não é necessário que a subunidade menor da rubisco atue auxiliando na especificidade por CO_2 , fato que corrobora o resultado encontrado no presente trabalho. Também é interessante observar que os genes *CA* e *RbcL*, que atuam em etapas subseqüentes, foram mais abundantes no mesmo período (inverno), indicando que ambos podem estar atuando na fixação do CO_2 .

Outro gene significativamente expresso durante o inverno foi o *FBAcI* (Figuras 20 e 21) que, no cloroplasto, participa da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (Figura 20) e gera metabólitos para a biossíntese de amido (SONNEWALD et al., 1994). Não foi observada expressão diferencial para o gene *RPI* (ribose 5-fosfato isomerase – E.C. 5.3.1.6) (Figuras 21 e 22).

2.3.2 Perfil protéico da região cambial de *E. grandis* em dois períodos sazonais: Verão e Inverno

2.3.2.1 Extração de Proteínas da Região Cambial

No presente trabalho, a extração fenólica (HURKMAN; TANAKA, 1986) e a solubilização das proteínas foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Celedon et al. (2007), resultando em amostras de excelente qualidade, sem sinais de degradação ou impurezas (Figura 22). Conforme descrito na literatura, a extração fenólica de proteínas resulta na obtenção de extrato protéico com maior pureza e, conseqüentemente, melhor resolução das proteínas nos géis bidimensionais (2D) (HURKMAN; TANAKA, 1986). Este método resulta na remoção de compostos secundários, sais, carboidratos e ácidos nucléicos, que interferem na eletroforese bidimensional, levando ao aparecimento de manchas nos géis após a coloração (HURKMAN; TANAKA, 1986; SARAVANAN; ROSE, 2004; FAUROBERT et al., 2007). Esses compostos são facilmente removidos da amostra por aderirem-se à fase solúvel do tampão de extração. Outro aspecto positivo deste método é o fato da proteólise ser minimizada na presença de fenol (HURKMAN; TANAKA, 1986).

Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias de alta resolução/desempenho para a separação e identificação protéica, é importante ressaltar que a principal etapa para que o estudo proteômico seja bem sucedido refere-se à extração e preparo das amostras (ROSE et al., 2004). A análise proteômica de materiais vegetais é normalmente mais trabalhosa em relação a outros organismos. Isto se deve ao fato das plantas possuírem menor concentração relativa de proteínas, além de serem ricas em componentes que interferem negativamente na estabilidade, separação e análise das proteínas, tais como proteases, polissacarídeos de parede e reserva, lipídeos, compostos fenólicos e metabólitos secundários (GEGENHEIMER, 1990; TSUGITA; KAMO, 1999).

Figura 22 - Análise por SDS-PAGE (mini-gel). Amostras de proteína total da região cambial de *E. grandis* resultante de extração fenólica. 1- marcador molecular (Kaleidoscope Bio-Rad), 2 e 3 – amostras da região câmbial coletadas no verão, 4 e 5 – amostras da região cambial coletadas no inverno.

2.3.2.2 Géis bidimensionais

De acordo com os resultados obtidos por Celedon et al. (2007) e Salvato (2010), a maior parte das proteínas da região cambial possuem pI (ponto isoelétrico) na faixa de 4-7. Deste modo, visando obter boa resolução dos *spots*, os géis bidimensionais obtidos no presente estudo foram preparados dentro desta faixa de pH (Figura 23). Todos os géis foram preparados em triplicata, onde cada réplica originou-se de uma extração fenólica independente, a partir do material de cada *bulk*. A utilização deste tipo de amostragem reduz a variação residual entre o material coletado, aumentando o poder de detecção de mudanças no padrão de expressão (KARP et al., 2005). Os géis apresentaram boa resolução e perfil eletroforético semelhante (Figura 23).

Figura 23 - Géis bidimensionais ilustrando proteínas extraídas da região cambial de *E. grandis*, no período de verão (acima) e inverno (abaixo). Géis preparados na faixa de pH 4-7 e corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

2.3.2.3 Análise de Imagens

Para a identificação nos géis 2D, de proteínas diferencialmente e preferencialmente expressas entre os tratamentos, as imagens foram analisadas pelo programa *Image Master Platinum 7.0*. É importante especificar que, no presente trabalho, consideraram-se proteínas preferencialmente expressas aquelas cujos *spots* foram detectados, via análise de imagens, em apenas um dos períodos sazonais estudados.

No período verão, foram encontrados 348 *spots* com coeficiente de variação inferior a 30%, no inverno este número foi de 330 *spots*. Destes, 186 foram diferencialmente expressos ($p < 0,05$) e 24 preferencialmente expressos (20 durante o verão e 4 durante o inverno). Com base na intensidade, 122 *spots* diferencialmente expressos e todos os *spots* preferencialmente expressos foram submetidos à análise por espectrometria de massas.

2.3.2.4 Identificação de proteínas do câmbio e classificação funcional

Ao total, 146 *spots* (122 diferenciais e 24 preferenciais) foram submetidos à avaliação por espectrometria de massas. Dentre as proteínas diferencialmente expressas, foi possível identificarmos 72,13% dos *spots* (ANEXO A). Já para as proteínas preferencialmente expressas, foi possível a identificação de 70,83% (ANEXO A). Os demais *spots* foram desconsiderados por apresentarem similaridade com duas ou mais proteínas ou por apresentarem *score* inferior a 70 ou ainda por não apresentarem similaridade com as sequências presentes nos bancos de dados.

Com base nos bancos selecionados para a identificação das proteínas (*Eucalyptus*, *SwissProt* e *NCBI*), apenas dois *spots* (1,51%) foram identificados com base exclusivamente no *SwissProt*, por apresentarem *score* abaixo do limite considerado nos demais bancos.

Para se ter uma visão global das duas condições estudadas (verão e inverno) e uma melhor interpretação dos resultados obtidos, as proteínas identificadas foram classificadas individualmente (Figura 24), de acordo com o processo biológico ao qual estão relacionadas, em seis categorias funcionais: 1) Metabolismo e Energia, 2) Processos Celulares, 3) Transporte e Sinalização, 4) Estrutura e Organização, 5) Vias de Informação e 6) Miscelânea, como proposto por Rison et al. (2000) e modificado por Carvalho et al. (2008).

Figura 24 - Classificação funcional das proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*, significativamente e diferencialmente expressas durante o verão e inverno

A partir desta classificação, pode-se observar que as proteínas pertencentes à categoria “1. Metabolismo e Energia” foram as mais abundantes (41,6%) e encontram-se distribuídas nas seguintes subcategorias (Figura 25): 1.1.2 Metabolismo Energético, 1.1.3 Transferência de Energia, 1.2.1 Metabolismo de Aminoácidos, 1.2.3 Metabolismo de Nucleotídeos, 1.2.4 Metabolismo fosfórico e 1.2.8 Metabolismo secundário. A subcategoria 1.2.4 Metabolismo fosfórico não está representada nos gráficos abaixo, pois possui apenas um representante, a proteína Pirofosforilase.

1. Metabolismo e Energia

Figura 25 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis* e pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 1. Metabolismo e energia. Os valores encontram-se expressos em função da razão Verão/Inverno. Barras em amarelo indicam proteínas mais expressas durante o verão e barras em roxo indicam as proteínas mais expressas no inverno

A segunda categoria com maior número de proteínas encontradas foi a “5. Vias de Informação” (39%), composta pelas subcategorias 5.2 Proteínas Relacionadas ao RNA, 5.3.2 Aminoacil-transferases, 5.3.3 Proteínas Relacionadas à Tradução, 5.3.4 Modificação de Proteínas/fosforilação, 5.3.5 Dobramento de Proteínas e 5.3.6 Quebra de Proteínas e *Turnover* (Figura 26). As subcategorias 5.2 Proteínas Relacionadas ao RNA e 5.3.2 Aminoacil-transferases não foram

representadas nas figuras abaixo, pois ambas são representadas por apenas uma proteína, Glicina-RNA-binding e aminoacil-tRNA sintetase, respectivamente.

5. Vias de Informação

Figura 26 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 5. Vias de informação

Em sequência, tem-se a categoria “4. Estrutura e Organização” (11,1%), representada pelas subcategorias 4.1.2.4 Metabolismo de Ligninas, 4.1.2.5 Expansinas, Xiloglicanas e Extensinas, 4.3 Citoesqueleto e 4.5 Proteínas Relacionadas aos Cromossomos (Figuras 26).

As subcategorias 4.1.2.5 Expansinas, Xiloglicanas e Extensinas e 4.5 Proteínas Relacionadas aos Cromossomos não foram representadas nas figuras pois são representadas por apenas uma proteína cada, proteínas-MLP e histona, respectivamente.

4. Estrutura e Organização

Figura 27 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias da categoria 4. Estrutura e Organização

As categorias com o menor número de proteínas encontradas foram 6. Miscelânea (4,1% - subcategoria 6.2 Proteínas Putativas), 3. Transporte e Sinalização (2,8% - subcategorias: 3.1.1 Transporte de Proteínas e Peptídeos e 3.4 Fatores de Transporte) e 2. Processos Celulares (1,4% - subcategoria 2.2.2 Transdução de Sinais).

Em algumas categorias foram encontrados múltiplos *spots* de uma mesma proteína, o que indica a ocorrência de modificações pós-traducionais, variações alélicas, variações isoenzimáticas e eventos de *splicing* alternativo, resultando em isoformas de uma mesma proteína (KHOUDOLI et al., 2004, JORGE et al., 2005) ou ainda devido à manipulação durante o preparo das amostras (HEBERT et al., 2001). A ocorrência destes *spots* é comumente observada nos trabalhos proteômicos (MIJNSBRUGGE et al., 2000; GION et al., 2005, CARVALHO et al., 2008 DAFOE et al., 2009).

2.3.2.5 Proteínas identificadas relacionadas ao metabolismo primário

Como já descrito acima, a análise do perfil protéico dos períodos verão e inverno permitiu a identificação de proteínas diferencialmente e preferencialmente expressas na região cambial de *E. grandis*, envolvidas em diferentes processos metabólicos, com destaque para aquelas relacionadas ao metabolismo primário.

Dentre as proteínas identificadas, pode-se encontrar na subcategoria 1.1.2 Metabolismo Energético cinco proteínas atuantes na glicólise (frutose bisfosfato aldolase 1 e 2, fosfoglicose isomerase, fosfoglicerato quinase, enolase, gliceraldeído

3-fosfato) e duas na via fermentativa (álcool desidrogenase 1, 2 e 3 e piruvato descarboxilase) (Figura 25). Apenas a fosfoglicose isomerase e uma das prováveis isoformas de ADH (ADH3) foram mais expressas durante o inverno. Na categoria 1.1.3 Transferência de Energia, foram identificadas proteínas que participam do TCA (citrato sintase, piruvato desidrogenase e isocitrato desidrogenase 1 e 2), todas mais expressas durante o verão. Foram também encontradas duas prováveis isoformas de UGPase na subcategoria 1.2.3 Metabolismo de Nucleotídeos (Figura 25). Estes resultados indicam que há diferenças no metabolismo da região cambial em função da sazonalidade também em nível protéico (Figura 28). É possível observar que , assim como nos dados obtidos por qPCR, durante o verão a região cambial tem seu metabolismo favorecendo a produção de piruvato, que é então destinado a fermentação alcoólica. Durante o inverno, os dados sugerem que há o direcionamento da rota no sentido da formação de carboidratos.

É importante considerar que as arbóreas têm o metabolismo bastante ativo durante o verão, com redução da atividade durante o inverno. Esta alternância fisiológica é um importante mecanismo adaptativo, principalmente das árvores de clima temperado (KO et al., 2011). Durante o inverno, mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorrem na região cambial, com o acúmulo de amido, carboidratos solúveis, lipídios e proteínas (SAUTER; MARTIN, 1994). Durante o período de menor atividade metabólica (inverno), o amido é degradado a carboidratos solúveis, promovendo a manutenção da respiração. Já os demais carboidratos solúveis (sacarose, rafinose, estaquiose), além de serem compostos de reserva, também atuam protegendo as árvores em resposta ao frio, mantendo o balanço osmótico celular (MORIN et al., 2007; REGIER et al., 2010).

Gonzalez et al. (2012) analisaram os processos que ocorrem no caule de plântulas de *Picea glauca* em resposta à transição entre o período de alta atividade metabólica e o período de dormência. Para tanto, os autores correlacionaram dados gerados por microarranjos com dados de proteômica e observaram a expressão significativa de transcritos e proteínas atuantes em vias centrais do metabolismo de carbono que contribuem para o *status* energético das plantas, tais como metabolismo de sacarose, amido, glicólise, TCA, ciclo do glioxalato e via das pentoses fosfato. Os autores também observaram que, entre os transcritos e proteínas significativamente expressos em resposta à baixa temperatura, aqueles relacionados a vias anabólicas ou vias que geram substratos para outras vias

tendem a ser mais expressos, enquanto aqueles transcritos e proteínas atuantes no catabolismo são menos expressos.

Com base nesses resultados e considerando-se que a via glicolítica não é linear, permitindo que o fluxo de carbono seja desviado para diferentes rotas, GONZALEZ et al. (2012) propõem que as enzimas participantes da glicólise e TCA que atuam na síntese de precursores biossintéticos são reguladas diferencialmente daquelas enzimas que atuam principalmente na produção de energia. A identificação de proteínas da via fermentativa e TCA é bastante interessante, pois estão envolvidas em uma série de reações enzimáticas responsáveis por suprirem os tecidos da região cambial com ATP, NADH e piruvato, permitindo a respiração (CARVALHO et al., 2008). A via glicolítica também fornece ao metabolismo quantidades de carbono que não foram oxidadas e podem ser utilizadas na biossíntese de diferentes compostos, tais como metabólitos secundários, isoprenóides, aminoácidos, ácidos nucleicos e lipídeos (PLAXTON, 2001).

Celedon et al. (2007) também encontraram na região cambial de *E. grandis* proteínas diferencialmente expressas atuantes no metabolismo primário, tais como UGPase, triose fosfato isomerase, PGK e ADH. A identificação de três prováveis isoformas de ADH no presente trabalho é bastante interessante, pois corrobora os dados obtidos por qPCR (Figura 17), sugerindo que a região cambial realizou fermentação alcoólica para obtenção de poder redutor. Assim como nos dados de qPCR, duas potenciais isoformas de ADH foram mais expressas durante o verão (Figura 28), indicando maior necessidade de atividade energética para a formação da madeira. Devido à condição de hipoxia do tecido cambial, a glicólise não pode continuar operando sozinha e o piruvato resultante desta via precisa ser desviado para a rota fermentativa. Assim, a produção de etanol confere tolerância à condição de baixa concentração de O₂, regenerando NAD⁺ na ausência de respiração mitocondrial (MACDONALD; KIMMERER, 1991). A nível protéico foi possível identificar, também, uma ADH significativamente mais abundante no inverno.

Outro dado importante foi a identificação de duas possíveis isoformas de UGPase, ambas mais expressas no verão. Esta enzima catalisa a interconversão de Glc-1P a UDP-G, tendo o magnésio como cofator. A atividade da UGPase está relacionada à síntese da parede celular e, em tecidos de reserva, promove o acúmulo de carboidratos sob baixas temperaturas (KLECZKOWSKI, 2001). Proteínas do metabolismo primário também foram encontradas na região cambial de

Pinus pinaster (MARC-GION et al., 2005), *Populus* spp (PLOMION et al., 2006 e KALLURI et al., 2009) e na seiva xilemática de *Populus trichocarpa* x *P.deltoides* (DAFOE; CONSTABEL, 2009).

Figura 28 - Representação esquemática da glicólise e da fermentação alcoólica. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados por qPCR mas não encontrados no gel 2D, na região cambial de *E. grandis*. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada por qPCR. As setas indicam transcritos que foram analisados por qPCR. Setas em roxo indicam os transcritos mais abundantes no inverno e setas em amarelo indicam aqueles mais abundantes no verão

Diferentemente do observado nos resultados obtidos por qPCR, não foi possível a identificação de proteínas relacionadas à fixação de carbono (Figura 28).

Tal fato pode ser explicado por limitações da técnica 2D ou ainda por *spots* referentes a proteínas atuantes na fotossíntese não terem preenchido os parâmetros estatísticos estabelecidos para as análises, como por exemplo ausência de diferenças estatísticas entre os dois períodos avaliados. Deste modo, tais *spots* não foram selecionados para análise por espectrometria de massas.

Diferentes proteínas associadas à fixação de carbono (sedoheptulose bifosfatase, ribose 5-fosfato isomerase, rubisco subunidade maior e menor) foram encontradas no caule de *Picea glauca*, sendo todas mais expressas aos 70 dias de exposição a dias com fotoperíodo curto (8 horas de luz/ 16 horas no escuro), com exceção da subunidade menor da rubisco, que foi menos expressa (GONZALEZ et al., 2012). Os autores propõem que a maior expressão da subunidade maior em relação à menor indica que a primeira pode estar desempenhando função de reserva durante a exposição das plantas a baixas temperaturas (GONZALEZ et al., 2012). A rubisco é considerada por alguns autores uma proteína de reserva não convencional (Revisado por COOKE; WEIH, 2005). No entanto, é importante mencionar também que a condição de hipoxia presente no câmbio das arbóreas favorece a função carboxilase da rubisco (BERVEILLER; DAMESIN, 2008). A subunidade maior da rubisco também foi encontrada por Celedon et al. (2007) na região cambial de *E.grandis* via LC-MS/MS, de modo que a presença desta proteína foi confirmada positivamente por *westernblot*. No entanto, devido à ausência da subunidade menor, os autores não puderam inferir sobre a atividade da enzima (CELEDON et al., 2007). Ambas as subunidades foram encontradas na região cambial de *Populus tomentosa* (JUAN et al., 2006).

2.3.2.6 Proteínas identificadas relacionadas a diferentes vias metabólicas

Visto que a análise proteômica reflete o perfil global do conjunto protéico expresso em um dado momento ou tecido, muitas proteínas não relacionadas diretamente ao metabolismo primário foram identificadas na região cambial (ANEXO A) e são discutidas abaixo.

Quanto ao Metabolismo de Nucleotídeos, foram encontradas duas prováveis isoformas de adenosina quinase (ADK), uma mais abundante no verão e outra preferencialmente expressa no mesmo período. A ADK é uma enzima-chave na regulação dos níveis intracelulares de adenilatos, adenina e adenosina e acredita-se também que são responsáveis pela conversão de ribosídeos de citocininas em sua

forma inativa, exercendo papel regulatório durante a formação da madeira pelo controle dos níveis de citocininas e da proliferação celular (KWADE et al., 2005). A reciclagem de adenosina na região cambial ocorre, principalmente, a partir da hidrólise de S-adenosil-L-homossisteína (SAH), o subproduto das reações de metilação dependentes de S-adenosil-L-metionina. Se a adenosina não for reciclada, a atividade da S-adenosil-L-homocisteína hidrolase é inibida, levando ao acúmulo de SAH e limitação na utilização da metionina (MOFFAT et al., 2002). Nas análises do presente estudo, foi encontrado apenas um *spot* referente à S-adenosil-L-homocisteína hidrolase, preferencialmente expressa no verão.

Em relação as proteínas de transdução de sinais foram identificadas três prováveis isoformas da proteína 14-3-3, todas com expressão preferencial no verão. As 14-3-3 são proteínas de ligação à fosfoserina, que atuam regulando a atividade de outras proteínas pela interação direta proteína-proteína. Atuam principalmente na regulação das H⁺ ATPases presentes na membrana plasmática e na regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio (ROBERTS, 2003). Essas proteínas também se ligam a fatores de transcrição e a proteínas de sinalização, desempenhando papel na regulação do desenvolvimento da planta em resposta a estresses (ROBERTS, 2003). A 14-3-3 também foi encontrada na região cambial de *E. grandis* em plantas com seis meses (CELEDON et al., 2007) e no lenho de reação (SALVATO, 2010), indicando a relação destas proteínas com o controle do desenvolvimento durante a xilogênese.

Durante as análises na região cambial, foi encontrado um número considerável de proteínas responsivas a estresses, incluindo 11 proteínas *heat-shock* (sete mais expressas durante o verão), três ATPases (todas mais abundantes no verão) e duas chaperonas (cada isoforma mais expressa em um dos períodos analisados), todas pertencentes à subcategoria 5.3.5 Proteínas de Dobramento/Chaperonas, que é responsável pelo dobramento, junção, translocação e degradação de proteínas, visando à manutenção de sua conformação funcional (WANG et al., 2004).

O estresse celular pode ser causado por fatores bióticos e abióticos que normalmente danificam macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos. Quando um sinal de estresse é percebido pelo organismo, o nível de proteínas envolvidas em sua defesa aumenta ou estas tornam-se ativas (KÜLTZ, 2005). Deste modo,

todos os organismos apresentam proteínas de resposta a estresses bióticos e abióticos, as quais compõem o proteoma mínimo de estresse (KULTZ, 2005).

As proteínas *heat shock* (HSPs) desempenham importante papel na proteção das plantas a estresses pelo restabelecimento da conformação nativa da proteína e de sua homeostase. A maior abundância dessas proteínas no período de verão provavelmente pode ser atribuída ao estado fisiológico da planta, visto que a região cambial é caracterizada por apresentar condição de hipoxia, o que pode ser interpretado pelo metabolismo celular como situação de estresse. LE e PROVOUST (2003) propuseram que algumas HSPs podem desempenhar funções específicas durante a formação da madeira, mostrando que estas proteínas são importantes para que o crescimento secundário ocorra normalmente. No trabalho de CELEDON et al. (2007), foram encontradas seis HSPs expressas na região cambial nas três idades analisadas (6 meses, 3 anos e 6 anos). No entanto, houve expressão diferencial somente para duas prováveis isoformas, com maior abundância em árvores com 6 anos.

A lignina, considerada o segundo biopolímero mais abundante do planeta, resulta da união de subunidades monoméricas denominadas monolignóis, que são sintetizados no citoplasma e liberadas na parede celular por vesículas (JONES et al., 2001). Este polímero é essencial na formação da parede secundária do xilema. No presente estudo, foram detectadas na região cambial duas proteínas relacionadas à biossíntese desse polímero: ácido cafeico O-metiltransferase (COMT) e cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT). Estas são enzimas-chave na síntese de monolignóis e ambas foram mais expressas durante o verão, indicando a ocorrência da lignificação. Estas proteínas foram encontradas no proteoma de xilema em formação de *Pinus* (GION et al., 2005), na região cambial de *E. grandis* em diferentes idades (CELEDON et al., 2007) e na madeira de reação (SALVATO, 2010).

2.3.3 Carboidratos solúveis presentes na região cambial

A disponibilidade de glicose, frutose e sacarose, importantes carboidratos solúveis, foi analisada na região cambial de *E. grandis* nos dois períodos analisados. Com base nos resultados apresentados na figura 29, nota-se que não houve diferenças significativas na concentração dos três açúcares analisados entre os períodos de verão e inverno. Estes dados indicam que na região cambial de *E. grandis* a distribuição de glicose, frutose e sacarose provavelmente não foi

influenciada pela temperatura e disponibilidade hídrica. No entanto, verifica-se também que a sacarose foi o principal açúcar acumulado na região cambial em ambos os períodos. Esse acúmulo pode ser explicado pelo fato de a sacarose ser o principal açúcar translocado pelas plantas (GEIGER, 2011).

Figura 29 - Análise de carboidratos presentes na região cambial de *E. grandis*. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística (Teste Tukey $p < 0.01$) entre os períodos analisados (Janeiro – verão e Agosto – inverno)

As árvores armazenam grandes quantidades de carboidratos nos tecidos parenquimáticos do xilema e casca, como por exemplo, amido (WITT; SAUTER, 1994; BARBAROUX; BREDÁ, 2002). As reservas de carboidratos são mobilizadas nas árvores para manutenção da respiração durante o inverno (OGREN, 2000), desenvolvimento de folhas, crescimento durante o verão, fornecimento de energia para respostas adaptativas à deficiência hídrica do solo, ataques de patógenos e herbivoria (CANHAM et al., 1999). A proporção desses carboidratos alocados para os mais diferentes fins muda ao longo dos períodos sazonais e ambientais (TERZIEV et al., 1991). Eles desempenham importante papel na manutenção do metabolismo vegetal, podendo ser usados nos tecidos heterotróficos e quando a taxa fotossintética não é suficiente para fornecer todo o carbono necessário para o crescimento (CHANTUMA et al., 2009).

Em relação ao acúmulo de carboidratos, muitos autores associam as mudanças sazonais a mecanismos bioquímicos de respostas à aclimação ao frio (TRAVERT et al., 1997; LEBORGNE et al., 1995; HOCH; RICHTER; KÖRNER, 2003; PAGTER et al., 2008; BONHOMME et al., 2009; TURHAN; ERGIN, 2012). Tais respostas bioquímicas incluem a expressão de proteínas relacionadas ao estresse causado pelo frio (*cold stress*), como as desidrinas, o acúmulo de açúcares,

principalmente a sacarose, acúmulo de alcoóis de açúcar (manitol e inositol) e acúmulo de outros crioprotetores como glicinabetaína e prolina, além de mudanças na composição de lipídeos, de enzimas que metabolizam açúcares e aumento na produção de antioxidantes (TURHAN; ERGIN, 2012).

Embora no presente estudo os dados de qPCR e proteômica indiquem que durante o inverno parece ter havido um favorecimento do metabolismo primário da região cambial (Figura 28), no sentido da formação de carboidratos, estes dados não são complementares aos resultados obtidos com a análise de carboidratos solúveis, onde não foi identificada diferença estatística na concentração de glicose, frutose e sacarose entre as amostras de verão e inverno (Figura 28).

Resultado semelhante foi observado no câmbio de *Populus trichocarpa*, com amostras coletadas também durante o verão e inverno (KO et al., 2011). Os autores quantificaram a concentração de cinco carboidratos solúveis (galactinol, glicose, frutose, sacarose e rafinose) e observaram acúmulo diferencial apenas para a rafinose, que foi encontrada somente nas amostras de inverno. Os autores explicam esse resultado relacionando-o com a maior expressão dos genes da biossíntese de rafinose também no inverno, uma isoforma da rafinose sintase foi 30 vezes mais expressa nesse período.

2.3.3.7 Análise do perfil metabólico da região cambial de *e. grandis*

2.3.3.7.1 Identificação dos metabólitos e normalização dos dados

A análise do perfil metabólico por GC/MS foi realizada visando identificar mudanças na abundância dos metabólitos primários nos dois períodos de coleta. Pelo programa *ChromaTof*, 53 metabólitos diferentes foram identificados e classificados em seis categorias: açúcares (39,62%), ácidos orgânicos (18,86%), aminoácidos (15,09%), ácidos graxos (7,5%), outros (11,32%) e desconhecidos (7,5%) (Tabela 3). A categoria “outros” foi composta pelas classes que apresentaram dois ou menos representantes, alcoóis (inositol e mio-inositol), ácido inorgânico (ácido fosfórico), base nitrogenada (uracil), fenol (taxifolin) e vitamina (tocoferol). Os metabólitos classificados como “desconhecidos” já foram encontrados em outros organismos, porém não se sabe a quais compostos se referem.

Tabela 3 - Metabólitos identificados na região cambial de *E. grandis* pelo programa *ChromaTof*.
(continua)

Metabólito	RI	m1	m2	m3	Classificação
Ácido oxálico	1122.7	190	219		Ácidos orgânicos
Acido benzóico	1242.7	105	135	179	Ácidos orgânicos
Ácido maléico	1290.0	245	170	215	Ácidos orgânicos
Ácido itacônico	1328.5	215	259		Ácidos orgânicos
Ácido fumárico	1336.4	245	143	217	Ácidos orgânicos
Ácido pipecólico	1354.1	156	230	184	Ácidos orgânicos
Ácido málico	1469.1	233	189	335	Ácidos orgânicos
Ácido shiquímico	1784.9	204	255	357	Ácidos orgânicos
Ácido cítrico	1796.4	273	211	347	Ácidos orgânicos
Ácido quínico	1835.2	345	255	435	Ácidos orgânicos
Ácido glucárico	2019.7	333	189	292	Ácidos orgânicos
Ácido glicólico	1071.0	148	177	205	Açúcares
Ácido glicérico	1313.1	133	189	292	Açúcares
Ácido treonico-1,4-lactona	1361.8	247	217	189	Açúcares
Treonina	1368.6	117	219	291	Açúcares
Eritrose	1459.2	234	205	162	Açúcares
Ácido treonico	1537.8	117	292	220	Açúcares
Ácido tartárico	1578.7	292	219	189	Açúcares
Ácido 2,4,5-Trihidroxipentanoico	1625.3	245	231	189	Açúcares
Xilose	1631.7	103	217	307	Açúcares
Xilitol	1695.8	217	205	307	Açúcares
Hexose	1753.9	117	205	319	Açúcares
Frutose	1846.6	103	217	307	Açúcares
Maltose	1868.2	205	319	103	Açúcares
Glucoronolactona	1919.4	189	133		Açúcares
Ácido glucurônico	1971.4	217	292	319	Açúcares
Frutose-6-fosfato	2276.2	315	459		Açúcares
Glicose-6-fosfato	2289.7	299	387	357	Açúcares
Maltose	2719.0	243	271	319	Açúcares
Gentiobiose	2809.8	271	243		Açúcares
Flavonoide (Taxifolin)	2847.1	368	179	267	Açúcares
Galactinol	2921.7	204	217	305	Açúcares
Rafinose	3354.2	217	361	437	Açúcares
Alanina	1095.4	116	148	190	Aminoácidos
Valina	1203.9	144	218		Aminoácidos
Glicina	1293.9	174	248	276	Aminoácidos
Serina	1343.6	204	218	188	Aminoácidos
Ácido aspártico	1501.9	232	218	202	Aminoácidos
Ácido piroglutâmico	1509.0	156	161	230	Aminoácidos
Ácido aminobutírico (GABA)	1516.1	174	216	304	Aminoácidos
Ácido heptanóico	1165.5	144	188	202	Ácidos graxos
Ácido linoleico	2194.9	150	337		Ácidos graxos

Tabela 3 - Metabólitos identificados na região cambial de *E. grandis* pelo programa *ChromaTof*.
(conclusão)

Metabólito	RI	m1	m2	m3	Classificação
Ácido octadecenóico	2200.0	339	264		Ácidos graxos
Ácido eládico	2206.7	339	199		Ácidos graxos
Inositol	2004.4	217	191	305	Outros
Mio-inositol	2069.3	217	305	432	Outros
Ácido fosfórico	1257.5	299	133	211	Outros
Uracil	1325.4	241	126		Outros
Tocoferol	3123.8	237	502	277	Outros
UN_1321.2	1321.2	134	184	285	Desconhecido
UN_1429.9	1429.9	193	132	150	Desconhecido
UN_1445.4	1445.4	154	172	243	Desconhecido
UN_1649.7	1649.7	261	203	363	Desconhecido

*RI (índice de retenção); m1, m2 e m3 (massas selecionadas, que caracterizam cada metabólito)

Após a identificação dos metabólitos, estes foram analisados pelo programa *MatLab* para obtenção das respectivas áreas. Deste modo, as áreas referentes a cada metabólito identificado foram alinhadas, utilizando-se as amostras provenientes de todos os tratamentos (Figura 30). O mesmo procedimento foi realizado para os 11 padrões internos.

Figura 30 - Ilustração demonstrando o alinhamento dos metabólitos individualmente no programa *MatLab*. Alinhamento das áreas de todas as amostras (18 no total) referentes ao metabólito Treonina

Os dados normalizados foram utilizados para a Análise de Componentes Principais (PCA), pelo programa *SIMCA* (Figura 31). A partir da observação da Figura 32, percebe-se que houve uma tendência de separação entre as amostras de verão e inverno, que pode ser explicada pelos componentes PC1 (37%) e PC2 (23%). Ambos componentes representam 60% da variação.

Figura 31 - Análise de Componentes Principais (PCA) para as amostras da região cambial coletadas nos períodos: Verão (*Summer*) e Inverno (*Winter*), realizado pelo programa SIMCA

Em seguida, a figura do tipo *Loading Plot* (Figura 32) foi gerada. Esta demonstra como cada variável (metabólito) contribui para a separação/formação de grupos dentro das amostras analisadas e fornece também indicações sobre a importância de cada variável dentro do experimento. A análise do *Loading Plot* indica a predominância de três metabólitos durante o verão e de 21 durante o inverno (Figura 32).

Figura 33 - Histograma ilustrando os metabólitos identificados na região cambial de *E. grandis* que mais contribuíram para a separação das amostras, considerando-se os dois períodos de análise

No entanto, em virtude do número de repetições biológicas no experimento ($n=3$), um segundo teste estatístico foi executado para determinação dos metabólitos significativamente abundantes, o *HT-self*, com os limiares de 100%, 50% e 30% (Figura 33). Desta forma, houve menor número de metabólitos significativamente abundantes em relação ao *Loading Plot*, mostrando maior acurácia do *HT-self*.

Figura 33 - Resultado do teste de significância *HT-self*, executado pelo programa “R”. A- metabólitos duas vezes mais abundantes no verão (círculos em verde) e inverno (círculos em preto, vermelho, azul escuro e azul claro). B- metabólitos 0,5 vezes mais abundantes no verão (círculos em azul escuro e rosa) e inverno (círculos em preto, verde, vermelho, azul claro e amarelo). C- metabólitos 0,3 vezes mais abundantes no verão (círculos em azul claro e escuro) e inverno (círculos em preto, amarelo, verde, vermelho, rosa). Diferentes metabólitos são representados pela mesma cor, dentro e entre as análises

Para facilitar a observação dos resultados da Figura 33, os 11 metabólitos significativamente abundantes foram organizados na Tabela 4, onde é possível observar que apenas treonina e eritrose foram mais abundantes durante o verão e inverno.

Tabela 4 - Metabólitos significativamente abundantes na região cambal de *E. grandis*

Metabólito	Classificação	30%	50%	100%	Tratamento
Ácido Oxálico	ácido orgânico	X	X	X	Inverno
Ácido Pipecólico	ácido orgânico	X	X	X	Inverno
Ácido Glicérico	açúcar	X	X		Inverno
Eritrose	açúcar	X	X	X	Verão
Ácido 2,4,5-trihidroxipentanoico	açúcar	X	X	X	Inverno
Glucuronolactona	açúcar	X			Inverno
Glicose-6-fosfato	açúcar	X			Inverno
Galactinol	açúcar	X	X		Inverno
Rafinose	açúcar	X	X	X	Inverno
Treonina	aminoácido	X			Verão
UN_1649.7	desconhecido	X			Inverno

Os dois ácidos orgânicos significativamente abundantes, ácido oxálico e pipecólico, tiveram maior acúmulo durante o inverno (Tabela 4). O ácido oxálico já foi detectado em raízes, caules, flores e folhas de diferentes espécies. No entanto, a distribuição desse ácido orgânico pode variar de acordo com a idade da planta, condição climática e tipo de solo. A síntese do ácido oxálico é atribuída a diferentes vias, sendo o glioxilato e ácido ascórbico seus principais precursores nas plantas (ÇALISKAN, 2000). Sua atuação está relacionada ao balanço iônico vegetal, visto que pode se combinar com diferentes íons formando compostos solúveis e insolúveis, além de atuar na resposta à herbivoria (FRANCESCHI; LOEWUS, 1995). O ácido oxálico foi encontrado em folhas de *E. grandis*, sendo mais abundante em plantas expostas a 16 horas de luz (HOFFMAN et al., 2010). O ácido pipecólico é um aminoácido não protéico, homólogo à prolina e resultante da via de degradação da lisina (MOULIN et al., 2002). O acúmulo desse ácido orgânico nas plantas é relacionado a mudanças metabólicas induzidas por estresses ambientais (MOULINE et al., 2002; SERVILLO et al., 2012). Assim, este acúmulo pode indicar uma resposta à menor disponibilidade hídrica e temperatura durante o inverno ou pode indicar também que nesse período climático há maior degradação da lisina na região cambial. Não há relatos da observação desse metabólito na região cambial de arbóreas.

Dentre os açúcares encontrados estão o ácido glicérico, glucoronolactona e o ácido 2,4,5-trihidroxipentanóico. Os dois primeiros metabólitos são derivados da glicose. No entanto, não há informações sobre a função do ácido 2,4,5-trihidroxipentanóico. O metabólito UN_1649.7 foi apontado como um dos mais

abundantes no verão. No entanto, não é possível fazer inferências sobre o mesmo, visto que sua identificação não é conhecida.

Os demais açúcares mais abundante no inverno foram rafinose, galactinol e glicose-6-fosfato (Tabela 4). Esses três metabólitos atuam como crioprotetores e já foram identificados na região cambial, sendo acumulados em resposta a baixas temperaturas (GUY et al., 2008; KO et al., 2011; PLAVCOVÁ et al., 2012). Esses dados corroboram os resultados encontrados no presente estudo pela análise por qPCR e proteômica (Figura 29), onde foi possível verificar que houve um favorecimento para acúmulo de sacarose. Desta forma, pode-se considerar que houve uma mudança no perfil transcricional, protéico e metabólico na região cambial em decorrência da sazonalidade, assim como observado para espécies de clima temperado. Esta reconfiguração é um processo complexo, que envolve a percepção de diferentes sinais de transdução, promovendo alterações celulares em diferentes níveis (GUY et al., 2008).

Quanto aos metabólitos mais abundantes no verão, a eritrose, juntamente com o fosfoenolpiruvato, é um dos precursores do chiquimato, um importante intermediário da biossíntese de ligninas, aminoácidos aromáticos e alcalóides (BOCHKOV et al., 2012). A eritrose é um produto intermediário da oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato (BOCHKOV et al., 2012). Já a treonina é um aminoácido essencial, precursor da síntese de isoleucina (CURIEN et al., 2003).

2.3.4 Análise integrada do perfil metabólico primário

Os dados gerados pelas diferentes metodologias, relacionados ao metabolismo primário foram agrupados na figura 34, para que fosse possível uma melhor compreensão sobre as mudanças dinâmicas ocorridas na região cambial de *E. grandis*. Foram encontradas diferenças significativas nos três níveis analisados, evidenciando a ocorrência de uma reconfiguração metabólica desencadeada pelo período sazonal.

Em nível transcricional e protéico foi possível verificar diferenças na partição de carbono durante os dois períodos analisados. No verão, o metabolismo parece favorecer a formação de piruvato que, posteriormente, é metabolizado por enzimas fermentativas, de modo que energia e poder redutor sejam gerados para suprir a demanda energética requerida durante a fase de maior atividade metabólica, visando ao incremento de biomassa. Estes resultados confirmam a hipótese

proposta evidenciando importância da glicólise e fermentação para a manutenção do metabolismo primário, na região cambial em situação de hipoxia. É interessante notar que durante o inverno os transcritos, proteínas e metabólitos indicaram o direcionamento da glicólise no sentido da produção de carboidratos, com destaque para o maior acúmulo de glicose-6-P, galactinol e rafinose, o principal metabólito responsivo à aclimação ao frio (KO et al., 2011). Esses resultados vão de encontro com a alternância sazonal da região cambial, de modo que durante o verão há o crescimento ativo com posterior redução da atividade metabólica no inverno, como já descrito por alguns autores (LACHAUDA, CATESSONB, BONNEMAIN, 1999; CUFAR, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; GRICAR; LI; WU; SOUTHERTON, 2010). No entanto, não foram identificadas diferenças significativas no acúmulo de carboidratos solúveis, na região cambial, entre as amostras de verão e inverno. Portanto, é possível que os carboidratos sejam acumulados na casca, durante o inverno, ficando prontamente disponíveis para serem utilizados como fonte de carbono, quando necessário.

Embora não tenham sido encontradas proteínas e metabólitos relacionados a fixação do carbono, deve-se ressaltar a expressão diferencial da *RbcL* e *RPI* no inverno. O carbono fixado pode estar sendo destinado para o metabolismo de carboidratos visto que este é acumulado no inverno.

Figura 34 - Mapa metabólico indicando as principais mudanças ocorridas na região cambial de *E. grandis*, relacionadas ao metabolismo primário. Retângulos coloridos indicam os metabólitos identificados por GC-MS significativamente acumulados no verão (amarelo) e inverno (roxo). Círculos coloridos indicam proteínas identificadas por gel 2D significativamente expressas no verão (amarelo) e inverno (roxo) e quadrados coloridos indicam transcritos analisados por qPCR significativamente acumulados durante o verão (amarelo) e inverno (roxo)

Referências

AIVALAKIS A, G., DIMOU, M., FLEMETAKIS, E., PLATI, F., KATINAKIS, P., DROSSOPOULOS, J.B. Immunolocalization of carbonic anhydrase and phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Medicago sativa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v.42, p. 181-186, 2004.

ALMEIDA, M.R.; RUEDELL, C.M.; RICACHENEVSK, F.K.; SPEROTTO, R.A.; PASQUALI, G.; FETT-NETO, A.G. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BioMedCentral Molecular Biology**, London, v. 11, n. 73, p. 1-12, 2010.

AMOR, Y.; HAIGLER, C.H.; JOHNSON, S.; WAINSCOTT, M.; DELMER, D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 9353-9357, 1995.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, Baltimore, v.64, p. 5245–5250, 2004.

ANGYALOSSY, S.M; MARCATI, C.R. Câmbio. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2006, chap. 8, p. 205-212.

ASCHAN, G.; PFANZ, H. Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. **Flora**, Dordrecht, v. 198, p. 81-97, 2003.

BAROJA-FERNÁNDEZ, B.; MUÑOZ, F.J.; SAIKUSA, T.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M., AKAZAWA, T.; POZUETA-ROMERO, T. Sucrose Synthase Catalyzes the de novo Production of ADPglucose Linked to Starch Biosynthesis in Heterotrophic Tissues of Plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, n.5, p. 500–509, 2003.

BERVEILLER D., DAMESIN E. Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Trees*. v. 22, p.149–157, 2008.
BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Burnt Mill, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BOAVA, L.P.; LAIA, M.L.; JACOB, T.R.; DABBAS, K.M.; GONÇALVES, J.F.; FERRO, J.A.; FERRO, M.T.; FURTADO, E.L. Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. **BioMedCentral Research Notes**, London, v. 3, n. 43, p. 1-9, 2010.

BONHOMME, M., PEUCH, M., AMEGLIO, T., RAGEAU, R., GUILLIOT, A., DECOURTEIX, M., ALVES, G., SAKR, S., LACOINTE, A. Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia* L.). **Tree Physiology**, Victoria, v. 30, p. 89-102, 2009.

BUSTOS, D.M.; IGLESIAS, A.A. Phosphorylated Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase from Heterotrophic Cells of Wheat Interacts with 14-3-3 Proteins. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 2081–2088, 2003.

CALLAHAN, D.L.; ROESSNER, U.; DUMONTET, V.; PERRIER, N.; WEDD, A.G.; O'HAIR, R.A.J.; BAKER, A.J.M.; KOLEV, S.D. LC–MS and GC–MS metabolite profiling of nickel complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulator tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated alderic acid as a new nickel, ligand. **Phytochemistry**, v. 69, p. 240–251, 2008.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, New York, v. 25, n. 9, p.1327-1333, 2004.

CARVALHO M.C.C.G, GOMES D.G.C., CARNEIRO R.T., MOON D.H., SALVATIERRA G.R., FRANCESCHIN L.M., DE ANDRADE A., CELEDON P.A.F., ODA S., LABATE C.A. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 905 -918, 2008.

CELEDON P.A.; DE ANDRADE A.; MEIRELES K.G.; GALLO DE CARVALHO M.C.C.; CALDAS D.G.; MOON D.H.; CARNEIRO R.T.; FRANCESCHINI L.M.; ODA S.; LABATE C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, Weinheim v. 13, p.2258-2274, 2007.

DAFOE, N.N., CONSTABEL, C.P. Proteomic analysis of hybrid poplar xylem sap. **Phytochemistry**, London, v. 70, p. 856-863, 2009.

ELLIS, R.J. Chloroplast proteins: Synthesis, transport, and assembly. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.32, p,111-137, 1981.

EVANS, J.R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. **Oecologia**, Berlin, v.78, p. 9–19, 1989.

FERNIE, A.R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, RG.; KRUGER, N.J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 250–263, 2001.

FERNIE A.R., CARRARI F., SWEETLOVE L.J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 254–261, 2004.

FORBES, M.G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, AR.; KOPKA, J. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 1332–1337, 2005.

GRAUVOGEL, C.; BRINKMANN, H.; PETERSEN, J. Evolution of the Glucose-6-Phosphate Isomerase: The Plasticity of Primary Metabolism in Photosynthetic Eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, London, v. 24, n. 8, 2007.

GION, J. M.; LALLANE, C.; LE PROVOST, G. et al. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 14, p. 3731-3751, Sept., 2005.

GRICAR, J.; CUFAR, K. Seasonal Dynamics of Phloem and Xylem Formation in Silver Fir and Norway Spruce as Affected by Drought. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 55, n.4, p. 538–543, 2008.

HARRY D.E., KIMMERER T.W. Molecular genetics and physiology of alcohol dehydrogenase in woody plants. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 43, p. 251-272, 1991.

HOCH, G., RICHTER, A., KORNER, Ch. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v.26, p. 1067-1081, 2003.

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

JORGE, I., NAVARRO, R. M., LENZ, C., ARIZA, D., PORRAS, C., JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 222-234, 2005.

KALLURI, U. C.; HURST, B. G.; LANKFORD, P. K.; RANJAN, P.; PELLETIER, A. D. Shotgun proteome profile of Populus developing xylem. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 21, p. 4871-4880, 2009.

KHOUDOLI, G.A.; PORTER, I.M.; BLOW, J.J.; SWEDLOW, J.R. Optimization of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. **Proteome Science**, Berlin, v.2, p.12, 2004.

KIMMERER T.W., STRINGER M.A. Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 87, p. 693-697, 1988.

KLECZKOWSKI, L.A.; KUNZ, S.; WILCZYNSKA, M. Mechanisms of UDP-Glucose Synthesis in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v.29, p.191–203, 2010.

KLECZKOWSKI, L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.37, p.1507-1515, 1994.

KO, J.H.; PRASSINOS, C.; KEATHLEY, D.; HAN, K.H. Novel aspects of transcriptional regulation in the winter survival and maintenance mechanism of poplar. **Tree Physiology**, Victoria, v. 31, p. 208-225, 2011.

KÖCHER, T.; PICHLER, P.; MAZANEK, M.; SWART, R.; MECHTLER, K. Altered Mascot search results by changing the m/z range of MS/MS spectra: analysis and potential applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, 2010.

KOPKE-SECUNDO, E.; MOLNAR, I.; SCHNARRENBARGER, C. Isolation and Characterization of the Cytosolic and Chloroplastic 3- Phosphoglycerate Kinase from Spinach Leaves. **Plant Physiology**, London, v. 93, p. 40-47, 1990.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 67, p. 225-257, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEBORGNE N., TEULIERES, C., TRAVERT, S., ROLS, MP., TEISSIE, J., BOUDET, AM. Introduction of specific carbohydrates into Eucalyptus gunnii cells increases their freezing tolerance. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 229, p. 710-717, 1995.

LI, X.; WU, H.X.; SOUTHERTON, S.G. Seasonal reorganization of the xylem transcriptome at different tree ages reveals novel insights into wood formation in Pinus radiata. **New Phytologist**, London, v.187, p. 764–776, 2010.

MacDONALD, R.C., KIMMERER, T.W. Ethanol in the stems of trees. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 4, p. 582-588, 1991.

MANJUNATH, S.; KENNETH, S.H.L.; VANWINKLE, P.; BAILEY-SERRES, J. Molecular and Biochemical Characterization of Cytosolic Phosphoglucosyltransferase in Maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p. 997–1006, 1998.

MERTENS, E. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? **FEBS Letters**, Hoboken, v. 285, p. 1-5, 1991.

MIJNSBRUGGE, V. K., MEYERMANS, H., VAN MONTAGU, M., BAUW, G., BOERJAN, W. Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. **Planta**. Berlin, v. 210, n. 4, p. 589-598, 2000.

MOFFATT, B.A., STEVENS, Y.Y., ALLEN, M.S., SNIDER, J.D., PEREIRA, L.A., TODOROVA, M.I., SUMMERS, P.S., WERETILNYK, E.A., MARTIN-MCCAFFREY, L., WAGNER, C. Adenosine Kinase Deficiency Is Associated with Developmental Abnormalities and Reduced Transmethylation. **Plant Physiology**, Baltimore, v.128, p.812–821, 2002.

O'FARREL, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 250, n. 10, p.4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, L.A.; BRETON, M.C.; BASTOLLA, F.M.; CAMARGO, S.S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J. PASQUALI, G. Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in Eucalyptus Species. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 405–422, 2012.

PAIVA J.A.P.; GARNIER-GÉRÉ, P.H.; RODRIGUES, J.C.; ALVES, A.; SANTOS, S.; GRAÇA, J.; LE PROVOST, G.; CHAUMEIL, P.; DA SILVA-PEREZ, D.; BOSC, A.; FEVEREIRO, P.; PLOMION, C. Plasticity of maritime pine (*Pinus pinaster*) wood-forming tissues during a growing season. **New Phytologist**, London, v.179, p. 1080–1094, 2008.

PATGER, M., JENSEN, C.R., PETERSEN, K.K., LIU, F., ARORA, R. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 134, p. 473–485, 2008.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.; OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J. M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C.D.E.S.; SIMÕES, A.C.; ULIAN, E.C.; DI MAURO, S.M.; DA SILVA, A.M.; PEREIRA, C.A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in Sugarcane Tissues. **DNA Research**, Tokyo, v. 12, p. 27-38, 2005.

PARK, S.C.; KEATHLEY, D.E.; HAN, K.H. Transcriptional profiles of the annual growth cycle in *Populus*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 321-329, 2008.

PERKINS, D N; PAPPIN, D.J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identifications by searching sequence using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLÉ, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.30, n. 9, p. e36, 2002.

PILATE, G.; DÉJARDIN, A.; LAURANS, F.; LEPLÉ, J.C. Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. **New Phytologist**, London, v. 64, p. 63–72, 2004.

PLAXTON, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 185–214, 1996.

PLAXTON W.C.; PODESTÁ, F.A. The Functional Organization and Control of Plant Respiration. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 25, n. 2, p. 159-198, 2006.

PLOMION, C., LALANNE, C.; CLAVEROL, S.; MEDDOUR, H; KOHLER, A.; BOGEAT-TRIBOULOT, M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 24, p. 6509–6527, Dec., 2006.

RAMAKERS, C.; RUIJTERA, J.M.; DEPREZA, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62–66, 2003.

REGIER, N.; STREB, S.; ZEEMAN, S.C.; FREY, B. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* × *nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. **Tree Physiology**, Victoria, v. 30, p. 979–987, 2010.

RISON, S. C.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 56-69, 2000.

ROBERTS, M. R. 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signaling. **Trends in Plant Science**. Kidlington, v. 8, p. 218-223, 2003.

ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESI, A.; SODEK, L.; FERNIE, A.L.; VAN-DONGEN, J.T. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicas*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, p. 1501-1513, 2010.

RÖMER, U.; SCHRADER, H.; GÜNTHER, N.; NETTELSTROTH, N.; FROMMER, W.B.; ELLING, L. Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.107, p.135–149, 2004.

SACHS, M.M.; SUBBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 294, p.1-15, 1996.

SALVATO, F. **Identificação de proteínas diferencialmente expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis* durante a indução da formação da madeira de tração**. 2010. 267 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALIE, U.; SUBBAIAH, C.C.; HUBER, S.C.; SACHS, M.M.; RHOADS, D. Sucrose Synthase Expanding Protein Function. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 2, n. 1, p. 28-29, 2007.

SUNG SS, KORMANIK PP, BLACK CC. Vascular cambium sucrose metabolism and growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in relation to transplanting stress. **Tree Physiology**, Victoria, v. 12, p. 243–258, 1993.

SZŐKE, A.; KISS, E.; TOLDI, O.; HESZKY, L. Production of transgenic carnation with a heterologue 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase bifunctional enzyme cDNA. **International Journal of Horticultural Science**, Hungary, v. 12, p. 75–79, 2006.

TADEGE, M., DUPUIS, I., KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 320 – 325, 1999.

TAIZ L.; ZEIGER E. **Fisiologia vegetal**: Respiração e Metabolismo de Lipídeos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TOMAZ, T.; BAGARD, M.; PRACHAROENWATTANA, I.; LINDEN, P.; LEE, C.P.; CARROLL, A.J.; STROHER, E.; SMITH, S.M.; GARDESTROM, P.; MILLAR, A.H. Mitochondrial Malate Dehydrogenase Lowers Leaf Respiration and Alters Photorespiration and Plant Growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, London, v. 154, p. 1143-1157, 2010.

TRAVERT, S., VALERIO, L., FOURASTÉ, I., BOUDET, AM., TEULIERES, C. Enrichment in Specific Soluble Sugars of Two Eucalyptus Cell-Suspension Cultures by Various Treatments Enhances Their Frost Tolerance via a Noncolligative Mechanism. **Plant Physiology**. London, v. 114, p. 1333-1442, 1997.

TURNER WL, KNOWLES VL, PLAXTON WC. Cytosolic pyruvate kinase subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. **Planta**, Berlim, v. 222, p. 1051-1062, 2005.

VÊNCIO, R.Z.N.; KOIDE, T. HTself: Self–Self Based Statistical Test for Low Replication Microarray Studies. **DNA Research**, London, v.12, p. 211–214, 2005.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 20, p. 417–417, 2002.

ZERVOSEN, A.; ROMER, U.; ELLING, L. Application of recombinant sucrose synthase-large scale synthesis of ADP-glucose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.5, p. 25–28, 1998.

ZHOU, H. **Isolation and functional genetic analysis of *Eucalyptus* wood formation genes**. 2005. 150 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de Pretoria, Pretoria, 2005.

WESTRAM, A.; LLOYD, J.R.; ROESSNER, U.; RIESMEIER, J.W.; KOSSMANN, J. Increases of 3-phosphoglyceric acid in potato plants through antisense reduction of cytoplasmic phosphoglycerate mutase impairs photosynthesis and growth, but does not increase starch contents. **Plant, Cell and Environment**, London, v.25, p. 1133–1143, 2002

WINKLER, B.D.; WILLIAM M.; HENZE, K.C. Purification, microsequencing and cloning of spinach ATP-dependent phosphofructokinase link sequence and function for the plant enzyme. **FEBS Journal**, Hoboken, v.274, p. 429–438, 2007.

3 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PRIMÁRIO DA CASCA DE *Eucalyptus grandis* EM DOIS PERÍODOS SAZONAIS DISTINTOS

Resumo

A casca pode ser compreendida como o conjunto dos tecidos localizados externamente ao câmbio vascular, incluindo células do floema primário e secundário e atua protegendo-o do ressecamento e ataque de patógenos. A casca é considerada um resíduo lignocelulósico sendo utilizada na indústria para a obtenção de fibras e apresenta potencial para ser usada como biomassa na produção de bioetanol. Apesar do crescente interesse por esse tecido, pouco é conhecido sobre os seus mecanismos fisiológicos e moleculares. O presente trabalho analisou as mudanças no metabolismo primário da casca de *E. grandis* em resposta a dois períodos sazonais contrastantes, verão e inverno, por meio da associação de três importantes áreas da genômica funcional: análise de transcritos por qPCR, proteômica e metabolômica, de maneira integrada e ainda não descrita para espécies arbóreas. Foi observada a expressão diferencial dos genes *ADH* e *RbcL* indicando ocorrência do metabolismo fermentativo e fotossíntese cortical. Também foram encontradas possíveis isoformas da RbcL e proteínas atuantes na glicólise e TCA. Diferentes metabólitos foram acumulados significativamente durante o inverno, com destaque para o carboidrato galactinol.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Metabolismo primário; qPCR; Proteômica; Metabolômica

Abstract

Bark can be represented as a set of tissues located outside the vascular cambium, including primary and secondary phloem cells and acts protecting it from dissection and pathogen attack. The bark is regarded as a source lignocellulose utilized in industry to obtain fibers and has a potential to be used, as the biomass for bioethanol production. Despite the growing interest in this tissue, little is known about the physiological and molecular mechanisms that regulates its metabolism. In this study we examined changes in the primary metabolism of *E. grandis* bark during two contrasting seasons, summer and winter, through the combination of three important areas of functional genomics: qPCR, proteome and metabolome, in an integrated manner and not yet described for tree species. We observed the differential expression of *ADH* and *RbcL* genes indicating the occurrence of fermentative metabolism and cortical photosynthesis. We also found isoforms of the RbcL protein (most probably post-translational) and other proteins that were involved in glycolysis and the TCA. Different metabolites were significantly accumulated during the winter, especially the carbohydrate galactinol.

Key-words: *Eucalyptus grandis*; Primary metabolism; qPCR; Proteome; Metabolome

3.1 Introdução

O eucalipto é a principal espécie arbórea plantada nos países de clima tropical e subtropical devido principalmente a qualidade da madeira que é destinada a diferentes processos industriais. Com base no novo cenário energético mundial, a utilização de fontes renováveis para a produção de bicomcombustível vem sendo fortemente incentivada. Dentro deste contexto, a casca do eucalipto enquanto resíduo lignocelulósico florestal vem se destacando por possuir grande potencial para ser utilizada como fonte de biomassa na produção de bioetanol (BRAGATTO, 2010). A casca também pode ser utilizada como fonte de fibras para a indústria além de ser vista como fonte de nutrientes, de carbono e uma forma de proteção e enriquecimento dos solos florestais (FOELKEL, 2010). Exerce importante papel fisiológico translocando nutrientes pelo caule das plantas e protege o xilema contra danos mecânicos e ambientais (SOLER et al., 2008). A casca refere-se ao conjunto de tecidos localizados externamente a região cambial e contém inúmeros compostos químicos tais como óleos essenciais, taninos, carotenóides, flavonóides, polissacarídeos e açúcares solúveis (FENGEL; WEGENER, 1989). É importante destacar que a região cambial refere-se a região ocupada pelas células mãe do xilema e floema.

Assim como a região cambial o crescimento da casca também é regulado pelo período sazonal, sendo influenciado pela disponibilidade hídrica e temperatura (SOLER et al., 2009). No entanto, sabe-se pouco a respeito da atividade sazonal a nível molecular da casca. Poucos autores tem se dedicado ao estudo desse conjunto de tecidos, como exemplo tem-se trabalhos envolvendo a análise de transcritos e clonagem de genes (VAN-DAMME; VAN-LEUVEN; PEUMANS, 1997; YANG et al., 2004; SOLER et al., 2008), proteômica (RENAUT et al., 2008, DAFOE; CONSTABEL, 2009) e metabolômica (FREDERICH et al., 2004, DEFLORIO et al., 2012). No entanto, não há enfoque sobre o metabolismo primário e diferentes técnicas são abordadas separadamente.

Considerando a importância da casca e o crescente interesse da indústria na utilização desse tecido o presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma visão geral do metabolismo primário, na casca de *E. grandis*, em resposta a dois períodos sazonais contrastantes, por meio da análise do padrão transcricional dos principais genes envolvidos no metabolismo primário (fixação de carbono, respiração aeróbica e fermentação alcoólica), perfil protéico e metabólico.

3.2 Material e Métodos

Os procedimentos realizados para análise da casca foram os mesmos descritos no item 2.2 (Material e Métodos) do capítulo II, com algumas modificações que serão descritas aqui.

3.2.1 Material vegetal e condições experimentais

As condições experimentais utilizadas foram as mesmas já descritas no item 3.1 do capítulo II. As cascas foram coletadas das mesmas árvores usadas para amostragem da região cambial (Figura 35), porém, foram organizadas em cinco *bulks*, de cinco plantas. Após a remoção da casca, a região cambial presente no interior da casca, foi raspada e eliminada.

Figura 35 - Coleta da casca de árvores de *E. grandis*, com seis anos. (A) Abertura do painel. (B) Remoção da casca

3.2.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA

Estes procedimentos foram realizados como já descrito no item 3.2.5 Porém, devido a grande quantidade de compostos fenólicos e demais interferentes presentes na casca, foi adicionado 0,5% de PVP nas amostras levadas para a síntese de cDNA, conforme descrito em KOONJUL et al., (1999).

3.2.3 Focalização isoeletrica (primeira dimensão)

Este procedimento foi realizado como já descrito no item 3.2.10, com algumas modificações. A focalização isoeletrica foi realizada com 700 µg de proteínas totais da casca e foram utilizadas fitas (10 cm) com duas faixas de pH: 3-10 e 4-7.

3.2.4 Preparo das amostras para extração de açúcares solúveis

Para completa remoção da umidade, as cascas foram secas à temperatura ambiente por 40 dias. Em seguida, o material foi moído em moinho tipo *wiley*, com seleção da serragem em peneira de 60 *mesh* de acordo com a norma ASTM E1757-01. O teor de umidade foi determinado seguindo a norma ASTM E 1756-01, para tanto, 500 mg do material moído foram colocados em placas de petri e, estas foram levadas para estufa a 104°C.

3.2.5 Remoção dos extrativos da casca

Para remoção dos extrativos, aproximadamente 1g das serragens foram coletadas em “saquinhos” de papel filtro e transferidas para a plataforma de extração *Soxhelt* (Marconi). A remoção dos extrativos foi realizada em três etapas: mistura de toluol/ etanol 2:1 (v/v) durante 4 horas, seguida de uma extração com etanol 99 GL° por 4 horas e finalizando a extração, foi adicionado água à 100°C por uma hora.

3.2.6 Quantificação dos carboidratos solúveis totais (CST)

A extração dos carboidratos solúveis totais foi realizada como descrito em Bragatto (2010). Deste modo, foram adicionados 20 mL de água *milliQ* em 500 mg do material lignocelulósico e deixado em banho-maria a 80°C, por uma hora, com agitação manual. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo, seguindo-se a norma ASTM E 1758-01 e, a fim de aumentar o arraste de extrativos, as amostras foram avolumadas para 200 mL. O filtrado foi utilizado para a quantificação dos CST, como já descrito no item 2.2.18.2

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Análise de transcritos da casca de *E. grandis*, atuantes no metabolismo primário

Visando verificar diferenças sazonais no perfil transcricional de genes atuantes no metabolismo primário, da casca de *E. grandis*, foi realizado PCR quantitativo.

3.3.2 Escolha dos genes de referência

Tal procedimento foi realizado como descrito no item 3.4.1.3, sendo os genes α -tubulina e malato desidrogenase citoplasmático, usados como gene de referência.

3.3.3 PCR quantitativo (qPCR)

Os processos moleculares envolvendo a formação e diferenciação da casca são pouco conhecidos (SOLER et al., 2008). Apenas alguns trabalhos têm reportado a análise do perfil transcricional ou, de genes específicos, envolvidos na formação desse tecido (YANG et al., 2003; SOLER et al., 2008). Deste modo, análises de qPCR foram realizadas, visando compreender o comportamento de alguns genes relacionados ao metabolismo primário, neste tecido, durante dois períodos sazonais distintos.

3.3.4 Genes envolvidos na glicólise e fermentação alcoólica

Com base nos resultados iniciais, foi possível verificar transcritos para todos os genes de interesse, atuantes na glicólise (Figuras 36 e 38). É interessante notar que, dos 13 genes analisados, oito foram significativamente expressos, sendo seis mais abundantes durante o verão: frutose bisfosfato aldolase (*FBA* – EC 4.2.1.13), piruvato quinase (*PK* – EC 2.7.1.40), fosfoenolpiruvato carboxilase (*PEPC* – 4.1.1.31), fosfofrutoquinase ATP-dependente (*PFK* – 2.7.1.40), fosfoglicomutase (*PGM* – EC 5.4.2.2), fosfoglicomutase (*PGM* – 5.4.2.1) e sacarose sintase 3 (*SuSy3* – 2.4.1.13) (Figuras 36 e 38). Tal fato sugere que, durante esse período, o metabolismo glicolítico provavelmente está envolvido com a maior produção de poder redutor e compostos energéticos, requeridos para o crescimento e incremento dos tecidos que compõem a casca. Já durante o inverno, a casca provavelmente diminui sua atividade metabólica, considerando que entra em período de baixo crescimento, onde é requerida energia apenas para a manutenção do metabolismo basal. No inverno, apenas os genes fosfoglicerato mutase (*PGAM*) e sacarose sintase 1 (*SuSy1*) foram diferencialmente expressos.

Figura 36 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ALDO* (frutose bifosfato aldolase); *GPI* (glicose fosfato isomerase); *PGK* (fosfoglicerato kinase); *PK* (piruvato kinase); *PEPC* (fosfoenolpiruvato carboxilase); *PFK* (fosfofrutoquinase-ATP-dependente); *ENO* (enolase); *PGM* (fosfoglicomutase); *PGAM* (fosfoglicerato mutase); *PDH* (piruvato desidrogenase); *SuSy1* (sacarose sintase 1) *SuSy3* (sacarose sintase 3); *PFP* (fosfofrutoquinase-PPI-dependente)

Quanto a *SuSy* é importante ressaltar o padrão diferencial de expressão das duas isoformas analisadas, sendo a isoforma 3 mais abundante no verão e, a isoforma 1, mais abundante durante o inverno. Deste modo, as isoformas provavelmente são requeridas em diferentes momentos do metabolismo celular, de modo apresentando padrão temporal de expressão.

Como mencionado no capítulo II, essas isoformas foram selecionadas com base no trabalho de ZHOU (2005), onde apresentaram padrão semelhante de transcrição, com expressão em diferentes tecidos, incluindo floema e casca. Portanto, ZHOU (2005) aponta *SuSy* 1 e 3 como genes atuantes no fornecimento de UDP-Glc para a biossíntese de celulose, na parede celular vegetal (ZHOU; 2005).

Quanto ao metabolismo fermentativo, é interessante notar que, embora a expressão dos genes *ADH3* (EC 1.1.1.1) e *PDC* (EC 4.1.1.1) seja significativamente diferente, ambos os transcritos foram acumulados em períodos diferentes (Figura 37 e 38). No entanto, com base nos dados, é provável que o metabolismo fermentativo seja requerido tanto durante o verão quanto durante o inverno, com isoformas específicas, temporalmente expressas. No trabalho de Yang et al. (2003), foram encontradas duas possíveis isoformas de *ADH* na casca de *Robinia pseudoacacia* porém os autores não inferem sobre a possível função desse transcrito. O estudo da

fermentação alcoólica, em espécies arbóreas, despertou o interesse de alguns autores, a partir do final da década de 80 (KIMMERER; STRINGER; 1988) e início dos anos 90 (HARRY; KIMMERER, 1991; MacDONALD; KIMMERER, 1991). No entanto, a partir daquele período poucos autores se dedicaram ao estudo desse processo, de modo que não há dados na literatura sobre o estudo direcionado para a expressão dos genes *ADH* e *PDC* em *Eucalyptus* spp.

Figura 37 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ADH2* (álcool desidrogenase 2); *ADH3* (álcool desidrogenase 3); *PDC* (piruvato descarboxilase)

Figura 38 - Ilustração esquemática da glicólise e fermentação alcoólica. Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR, na casca de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão e inverno, respectivamente

3.3.5 Genes envolvidos no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

Os dois genes analisados para esta via foram significativamente expressos durante o verão (Figuras 39 e 40) e sugerem que durante esse período o piruvato resultante da glicólise está sendo principalmente destinado para a mitocôndria, de modo a ser metabolizada no TCA, com consequente produção de energia, através da cadeia transportadora de elétrons e não pelo metabolismo fermentativo. Este resultado vai ao encontro do observado para os genes da glicólise (Figuras 36 e 38), onde o padrão temporal de expressão sugere que a via está atuando no sentido da produção de piruvato. Do ponto de vista fisiológico as árvores apresentam maior

atividade metabólica durante o verão e é nesse momento de crescimento ativo que a glicólise e TCA são ainda mais importantes. A exportação de moléculas intermediárias do TCA exige que sejam importados substratos que possam ser convertidos a acetil-CoA e oxaloacetato. Se o piruvato for utilizado como o único substrato do TCA, haverá a interrupção da produção de oxaloacetato, a medida que intermediários da via forem exportados. Assim a PEPC passa a desempenhar um importante papel na rota anaplerótica, suprindo o TCA com outros intermediários, que serão requeridos, posteriormente, para a síntese e assimilação de nitrogênio (revisado por PLAXTON; PODESTA, 2006). O transcrito para *PEPC* foi mais expresso durante o verão (Figuras 36 e 38) corroborando com os dados apresentados.

Figura 39 - Expressão relativa dos genes atuantes na glicólise, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. As barras amarelas indicam os genes mais expressos durante o verão e as barras em roxo indicam aqueles mais expressos durante o inverno. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *ISOCIT* (isocitrato desidrogenase); *SCL* (sucinil CoA ligase)

Figura 40 - Ilustração esquemática do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA). Caixas em cinza indicam os genes analisados por qPCR, na casca de *E. grandis*. Setas em amarelo e roxo indicam os genes mais expressos durante o verão e inverno, respectivamente

3.3.6 Genes envolvidos na fotossíntese: fixação de carbono

Como já descrito acima, a região localizada entre o câmbio e os tecidos que compõe a casca é bastante rica em CO₂ (GARTNER, 1996; IVANOV et al., 2006; ALEKSEEV et al., 2007; BERVEILLER; DAMESIN, 2008) e diferentes autores já verificaram atividade fotossintética na casca de arbóreas (ASCHAN; WITTMAN; PFANZ, 2001; ALEKSEEV et al., 2007; WITTMANN; PFANZ, 2007). Os nossos resultados vão de encontro com este fato, sendo observado, na casca, o acúmulo de mRNAs referentes a genes atuantes na fixação de CO₂ (Figuras 41 e 42). Dentre os genes analisados, apenas dois (*RbcL* e *RPI*) foram significativamente expressos, sendo mais abundantes no verão (Figura 41 e 42).

Figura 41 - Expressão relativa dos genes atuantes na fotossíntese, na casca de *E. grandis*, considerando o período inverno como referência. Cores amarelo e roxo indicam aumento e redução da expressão, respectivamente. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa, com $P \leq 0,05$ (programa *REST*). *NADPme*- enzima málica-NADP; *CA*- anidrase carbônica; *RbcS*- rubisco subunidade menor; *RbcL*- rubisco subunidade maior; *FBAcl*- frutose bifosfato aldolase cloroplastidial; *RPI*- ribose 5-fosfato isomerase

É interessante observar a expressão da enzima málica NADP-me, comum em plantas C4. Essa enzima permite a rápida descarboxilação de ácidos orgânicos com quatro carbonos, por exemplo, o malato, proveniente do xilema e floema, resultando na liberação de CO₂ para a fotossíntese (BERVEILLER et al., 2007). Quanto a Rubisco, foi possível verificar o padrão transcricional das duas isoformas, destacando-se o acúmulo diferencial da *RbcL*, durante o verão, período no qual a taxa respiratória é mais intensa, contribuindo para a maior liberação de CO₂ no interior do caule. É interessante notar que o gene *RPI* (5.3.1.6), responsável por catalisar a interconversão da Ribose-5-fosfato em Ribulose-5-fosfato, tanto no ciclo de Calvin quanto na via das pentoses-fosfato (MARTIN et al., 1996), também tem maior expressão durante o verão. Assim, considerando a disponibilidade de CO₂,

mentionado anteriormente, a extração fenólica remove do extrato compostos secundários, sais, carboidratos e ácidos nucleicos, que interferem na qualidade das amostras e na eletroforese bidimensional (HURKMAN; TANAKA, 1986; SARAVANAN; ROSE, 2004; FAUROBERT et al., 2007). Após a solubilização e quantificação das proteínas, procedeu-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, para verificar a qualidade dos extratos protéicos provenientes da casca (Figura 43). No gel foi observada a boa eficiência da metodologia de extração, resultando em ótima qualidade do extrato protéico, sem sinais de degradação ou impurezas.

Figura 43 - Análise por SDS-PAGE (mini-gel). Amostras proteína total da casca de *E. grandis* resultante de extração fenólica. 1- marcador molecular (Kaleidoscope Bio rad), 2 e 3 – amostras casca período verão e inverno

3.3.7.2 Géis bidimensionais

Considerando que não há na literatura trabalhos usando a proteômica para o estudo da casca de *E. grandis* spp. inicialmente foram confeccionados géis bidimensionais utilizando fitas com gradiente de pH 3-10 (Figura 44). Deste modo, pode ser observado o perfil protéico da casca, verificando-se que a maior parte das proteínas bem coradas encontram-se também na faixa de pH 4-7, delimitada pela linha pontilhada (Figura 46). Géis 2DE foram então confeccionados nesta faixa, permitindo a melhor separação e resolução das proteínas (Figura 45).

Todos os géis foram preparados em triplicata, sendo cada réplica proveniente de uma extração fenólica independente, a partir do material de cada *bulk*. Os géis apresentam boa resolução e perfil protéico semelhante, dentro de cada tratamento (Figura 45). Os *spots* mais fortemente corados concentram-se na região entre pI 5 e 6, indicando proteínas com caráter mais ácido.

Figura 44 - Gel bidimensional ilustrando proteínas extraídas da casca de *E. grandis*. Gel confeccionados na faixa de pH 3-10 e corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. A linha pontilhada indica a região de pH 4-7

Figura 45 - Géis bidimensionais ilustrando proteínas extraídas da casca de *E. grandis*, no período de verão (acima) e inverno (abaixo). Géis confeccionados na faixa de pH 4- 7 e corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

3.3.7.3 Análise de imagens

Ao final da análise de imagens dos géis confeccionados para casca, foram detectados 445 e 424 *spots* para verão e inverno, respectivamente. Destes 123 foram diferencialmente expressos e 2 preferencialmente expressos; todos foram recortados para posterior identificação por espectrometria de massas.

3.3.7.4 Proteínas identificadas na casca e classificação funcional

Dentre os *spots* diferencialmente expressos 63% foram identificados (Anexo B), todos com base no banco de eucalipto. No entanto, 23% dos *spots* apresentaram similaridade com duas ou mais proteínas, sendo desconsiderados. Aproximadamente 14% dos *spots* não apresentaram similaridade com as sequências presentes nos bancos de dados utilizados, ou tiveram valor de *score* inferior a 70, sendo também desconsiderados.

Depois de identificadas, as proteínas foram organizadas, de acordo com as categorias funcionais às quais se referem (Figura 46), com base na classificação proposta por Rison et al. (2000) e modificada por Carvalho et al. (2008).

Figura 46 - Classificação funcional das proteínas identificadas na casca, de *E. grandis*

A partir da classificação funcional (Figura 46), foi possível observar que proteínas pertencentes às categorias “1. Metabolismo e Energia” (36%), “5. Vias de informação” (33,33) e “2. Processos celulares” foram as mais abundantes. Dentro de categoria 1. Metabolismo e Energia, as proteínas encontram-se distribuídas em subcategorias específicas (Figuras 47, 48 e 49). Foram também encontradas proteínas representadas por mais de um *spot*, indicando a presença de diferentes

isoformas, devido a modificações pós-traducionais, variações alélicas ou até mesmo *splicing alternativo* (KHOUDOLI et al., 2004, JORGE et al., 2005).

1. Metabolismo e Energia

Figura 47 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na casca de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 1. Metabolismo e energia

5. Vias de Informação

Figura 48 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na casca de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 5. Vias de Informação

2. Processos Celulares

Figura 49 - Proteínas diferencialmente expressas, identificadas na região cambial de *E. grandis*, pertencentes a diferentes subcategorias, da categoria 2. Processos Celulares

3.3.7.5 Proteínas identificadas relacionadas ao metabolismo primário

As proteínas atuantes no metabolismo primário são encontradas na categoria “1. Metabolismo e Energia” estão distribuídas nas subcategorias: 1.1.1.2 Metabolismo de C1, 1.1.2 Metabolismo Energético, 1.1.3 Transferência de Energia, 1.2.3 Metabolismo de Nucleotídeos e 1.2.8 Metabolismo Secundário (Figura 47). Na subcategoria Metabolismo de C1 foram encontradas três prováveis isoformas da

enzima rubisco (RbcL), todas mais expressas durante a seca. A presença dessa proteína pode ser explicada, pelo fato da região caulinar da maioria das espécies lenhosas possuir cloroplastos funcionais localizados no clorênquima e nas camadas celulares mais internas (células dos raios e medula). Assim, são capazes de utilizar o CO₂ interno para realizar fotossíntese (PFANZ et al., 2002). Visto que a casca atua como uma barreira à difusão de gases, levando ao acúmulo de CO₂ no ambiente intracelular (cerca de 500 a 800 vezes maior que a concentração do ambiente), a fotossíntese cortical atua como um importante mecanismo na redução da anaerobiose interna, contribuindo para evitar restrições ao processo de respiração e consequente redução na produção de ATP (PFANZ et al., 2002; ACHAN; PFANZ, 2003). Proteínas fotossintéticas também foram encontradas na casca de *Prunus persica* (RENAUT et al., 2008) e *Picea sitchensis* (LIPPERT et al., 2007).

No entanto, o resultado observado para o perfil protéico é contrastante em relação ao padrão transcricional da *RbcsL*, já que o transcrito foi mais expresso durante o verão. A discrepância entre os dados de transcriptômica e proteômica é bastante discutida na literatura e indica a ocorrência de modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais (YIN et al., 2007; FERNIE; STIITT, 2012; VOGEL; MARCOTTE, 2012).

Ainda em relação ao metabolismo primário na subcategoria 1.1.2 Metabolismo Energético foram identificadas três proteínas atuantes na glicólise, sendo três possíveis isoformas da fosfoglicerato quinase, uma triose isomerase e quatro possíveis isoformas da enolase. Apenas duas isoformas de enolase foram mais abundantes durante o verão, as demais proteínas tiveram maior acúmulo durante o inverno (Figuras 47 e 50). De modo geral, foram identificadas poucas proteínas atuantes no metabolismo primário, o que pode ser explicado por limitações da técnica 2D ou pelo fato de apenas um número reduzido de proteínas, do metabolismo primário, ser diferencialmente expressa na casca comparando-se os períodos de verão e inverno.

Figura 50 - Representação esquemática da glicólise e da fermentação alcoólica. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados com qPCR mas não encontrados no gel 2D. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada por qPCR. As setas indicam transcritos que foram analisados por qPCR. Setas em roxo indicam os transcritos mais abundantes no inverno e setas em amarelo indicam aqueles mais abundantes no verão

Na subcategoria 1.1.3 Transferência de Energia, foram encontradas duas possíveis isoformas de citrato sintase, ambas mais expressas no verão, e uma malato desidrogenase, mais expressa no inverno (Figuras 47 e 51). Foram ainda

encontradas na subcategoria 1.2.3 Metabolismo de Nucleotídeos quatro UDP-glucose pirofosforilase, sendo apenas uma mais expressa no verão (Figura 47 e 50).

Figura 51 - Representação esquemática do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) na casca de *E. grandis*. Caixas de texto cinza indicam transcritos analisados com qPCR mas não encontrados no gel 2D. Caixas em roxo representam proteínas encontradas no gel 2D que foram mais expressas durante o inverno. Caixas em amarelo representam proteínas mais abundantes durante o verão. Caixa pontilhada representa proteína encontrada por gel 2D mas não analisada por qPCR. As setas indicam transcritos que foram analisados por qPCR. Setas em roxo indicam os transcritos mais abundantes no inverno e setas em amarelo indicam aqueles mais abundantes no verão

3.3.7.6 Proteínas identificadas relacionadas a diferentes vias metabólicas

Como já mencionado no capítulo II, a análise proteômica resulta na identificação do conjunto protéico expresso em um dado momento ou tecido; desse modo, na casca de *E. grandis* foram encontradas proteínas não relacionadas diretamente ao metabolismo primário (ANEXO B) e algumas serão discutidas abaixo.

Em relação as proteínas de resposta a estresses foram encontradas 17 proteínas *heat-shock* pertencentes à subcategoria 5.3.5 Proteínas de Dobramento/Chaperonas (Figura 50). Destas, apenas duas proteínas foram mais expressas no inverno. As *heat shock* são produzidas em resposta a diferentes tipos de estresses como baixa temperatura, salinidade, alta intensidade de radiação solar, dessecação, oxidação (SWINDELL et al., 2007). Essas proteínas atuam promovendo o remodelamento/ nova conformação das proteínas, protegendo as células de possíveis danos causados por estresses e auxiliando na recuperação do mecanismo

celular (WHAIBI, 2010). Foi encontrado também um *spot* para a proteína *LEA* (*Late embryogenesis protein*), subcategoria 2.2.3.2 Processos Abióticos e sete *spots* para a proteína ascorbato peroxidase (subcategoria 2.2.2 Detoxificação e Resposta à Proteção), a expressão dessa proteína é induzida em resposta a diferentes estresses, que resultam na redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MITTLER; FENG; COHEN, 1998).

Foram encontrados dois *spots* referentes à proteína 14-3-3 pertencente à subcategoria 2.1.2 Transdução de Sinal, ambos mais expressos no inverno. A 14-3-3 regula a atividade de proteínas-alvo, atuantes no metabolismo e associadas a cromatina, por meio da interação proteína-proteína e agindo também na regulação do desenvolvimento e resposta a estresses (ROBERTS, 2003; FERL, 2004).

Quanto a proteínas da subcategoria tradução, foram identificadas duas possíveis isoformas da proteína fator de iniciação, ambas mais expressas no verão e uma proteína fator de alongamento, mas expressa no inverno.

Na categoria 4. Estrutura e Organização Celular foram encontradas proteínas pertencentes a três subcategorias: 4.1.2.1 Metabolismo de Ligninas, 4.1.2.5 Expansinas, Xiloglucanas e Extensinas e 4.3 Citoesqueleto.

A lignina é um importante polímero fenólico da parede celular, covalentemente ligado a celulose e hemicelulose (ROBINSON; MANSFIELD, 2009). Nesse contexto, o ácido cafeico O-metiltransferase (COMT) catalisa reações que promovem a metilação dos precursores monoméricos da lignina, desempenhando papel fundamental na síntese desse polímero (MA; XU, 2008). No presente trabalho foram encontrados dois *spots* para essa proteína, ambos mais expressos no inverno.

Foram identificadas também duas possíveis isoformas da proteína *major latex protein* (MLP), na subcategoria 4.1.2.5 Expansinas, Xiloglucanas e Extensinas. Embora ainda não seja conhecida a função biológica da MLP, a ação da proteína tem sido associada ao desenvolvimento de frutas e flores e na resposta a ataque por patógenos (LYTLE et al., 2009).

Na subcategoria 4.3 Citoesqueleto foram identificadas três possíveis isoformas de Beta-tubulina, todas mais expressas no inverno. O citoesqueleto, responsável por controlar as propriedades mecânicas das células, é principalmente composto por filamentos de actina e microtúbulos (LI; WU; SOUTHERTON, 20011). Os polímeros de Alfa e Beta-tubulinas são os responsáveis pela formação dos microtúbulos que são continuamente reorganizados em resposta ao

desenvolvimento e a diferentes estresses (WASTENEYS, 2004). As beta-tubulinas também determinam a orientação da microfibrilas de celulose, durante a formação da parede celular (SPOKEVICIUS et al., 2007).

3.3.8 Carboidratos solúveis presentes na casca

A quantificação dos carboidratos solúveis disponíveis na casca mostrou que houve diferenças significativas no acúmulo destes açúcares, entre os períodos de verão e inverno (Figura 52). Essa diferença foi observada tanto em relação aos carboidratos individuais, quanto para os valores totais, de modo que houve maior acúmulo no período de inverno.

Figura 52 - Análise de carboidratos presentes na casca de *E. grandis*. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística (Teste Tukey $p < 0.01$) entre os dois períodos analisados (Janeiro – verão e Agosto – inverno)

Os carboidratos são produtos diretos da atividade fotossintética e representam uma importante fonte de energia, metabólitos e moléculas estruturais, fornecendo o carbono necessário para a manutenção do metabolismo, crescimento e produção de novos tecidos (SIVACI, 2006), além disso, os carboidratos acumulados podem ser prontamente utilizados quando a atividade fotossintética não é suficiente para gerar a quantidade de carbono requerida pelas plantas (CHANTUMA et al., 2009). Os resultados apresentados corroboram com o fato do acúmulo de carboidratos ocorrer durante o período no qual o crescimento das árvores é reduzido, ou ainda durante a dormência, com diminuição nos níveis desses carboidratos durante a fase de crescimento ativo (CHAPIN, 1990; GAUHER et al., 2005; PAGTER et al., 2008) e já foram observados por diferentes autores (ASHWORTH; STIRM; VOLENEC, 1993; SIVACI, 2006; KASUGA; ARAKAWA;

FUJIKAWA, 2007). No verão (período de maior disponibilidade hídrica), o eucalipto apresenta alta taxa de crescimento, sendo característico o consumo de carboidratos solúveis da casca, uma vez que as árvores utilizam tanto os carboidratos prontamente disponibilizados como aqueles armazenados (PALLARDY, 2008; PATGER et al., 2008). Já no inverno (menor disponibilidade hídrica), com o crescimento das árvores reduzido, há o acúmulo destes carboidratos. Outro ponto a ser considerado é o acúmulo de carboidratos em resposta as baixas temperaturas e como mecanismo de aclimação ao frio (TRAVERT et al., 1997; LEBORGNE et al., 1995; HOCH; RICHTER; KÖRNER, 2003; PAGTER et al., 2008; BONHOMME et al., 2009). Tais informações corroboram com os dados obtidos no presente trabalho (Figura 54). A temperatura média durante o período no qual as amostras de verão foram coletadas foi de 23.7°C, com precipitação média de 213 mm. Já para as amostras de inverno, a temperatura média foi de 16.8°C, com precipitação média de 47.4mm.

Travert et al (1997), analisando culturas de suspensão celular, provenientes de dois híbridos de *Eucalyptus*, observaram que as células resistentes ao frio acumularam mais frutose e sacarose e associaram esse maior conteúdo de açúcares solúveis a resistência. O acúmulo destes carboidratos, assim como o de aminoácidos e algumas proteínas, como respostas fisiológicas a aclimação ao frio, atua protegendo estruturas celulares do congelamento (LI et al. 2004), sendo a sacarose o açúcar mais estudado em relação a tolerância ao frio/ congelamento. Em *Cornus sericea* L., glicose, frutose, sacarose e rafinose são os açúcares solúveis predominantes na casca e xilema; durante o início do verão a concentração destes açúcares diminui, enquanto os valores de amido aumentam já no inverno a concentração de açúcares é máxima (ASHWORTH; STIRM; VOLENEC, 1993).

3.3.9 Análise do perfil metabólico casca de *E. grandis*

3.3.9.1 Identificação dos metabólitos e normalização dos dados

Assim como realizado para as amostras da região cambial, a análise do perfil metabólico, por GC/MS, visou identificar mudanças nos níveis dos metabólitos primários, nos dois períodos de coleta. Através do programa *ChromaTof* foram identificados 36 metabólitos diferentes, sendo estes classificados em cinco categorias: ácidos orgânicos (18,86%), açúcares (39,62%), aminoácidos (15,09%), ácidos graxos (7,5%), outros (11,32%) e desconhecidos (7,5%) (Tabela 5). Os

metabólitos classificados como “desconhecidos” já foram encontrados em outros organismos porém, não é conhecido a quais compostos se referem.

Tabela 6 - Metabólitos identificados na região cambial de *E. grandis*, através do programa *ChromaTof*

Metabólito	RI	m1	m2	m3	Classificação
Erythritol	1485,9	184	217	205	Alcool
Mio-Inositol	2003,5	217	191	305	Alcool
Ácido aspártico	1500,9	232	218	202	Amino ácido
Ácido piroglutâmico	1507,4	156	161	235	Amino ácido
4-Aminobutyric acid (GABA)	1515,3	174	216	304	Amino ácido
Serina	1343,4	204	218	188	Amino ácido
Heptanoic acid	1165,8	144	188	100	Ácidos graxos
Nonanoic acid	1350,0	117	129	131	Ácidos graxos
Ácido linoleico	2194,4	129	150	337	Ácidos graxos
Ácido oleico	2200,3	117	129	145	Ácidos graxos
Stearic acid	2224,8	129	145	341	Ácidos graxos
Beta Sitosterol	3335,6	357	396	255	Ácidos graxos
Ácido fosfórico	1257,4	299	133	211	Ácido inorgânico
Uracil	1325,4	241	255		Base nitrogenada
Ácido piruvico	1081,9	149	217	189	Ácido orgânico
Ácido benzóico	1242,6	105	135	179	Ácido orgânico
Ácido fumárico	1336,2	245	143	133	Ácido orgânico
Ácido málico	1470,7	233	189	335	Ácido orgânico
Ácido shiquimico	1783,5	204	205	357	Ácido orgânico
Ácido cítrico	1795,0	273	347	211	Ácido orgânico
Ácido dehidroascórbico	1827,9	173	245	316	Ácido orgânico
Ácido quinico	1835,4	345	255	256	Ácido orgânico
Ácido gálico	1933,3	281	458	311	Ácido orgânico
Ácido protocatecuico	1801,0	193	223	370	Fenol
Taxifolina	2823,4	368	179	267	Fenol
Ácido glicólico	1071,9	148	177	205	Açúcar
Ácido treônico	1537,1	205	292	220	Açúcar
Ácido tartárico	1613,1	292	219	423	Açúcar
Ácido ribônico	1739,4	217	292	189	Açúcar
Frutose	1846,2	103	217	307	Açúcar
Gluconic acid	1971,4	217	205	189	Açúcar
Glucaric acid	2019,0	292	189	245	Açúcar
Galactinol	2920,2	204	217	305	Açúcar
Tocoferol	3122,8	237	502	277	Vitamina
UN_1445,1	1445,1	154	130	243	**
UN_2087,5	2087,5	205	319	262	**

* RI (índice de retenção); m1, m2 e m3 (massas selecionadas, que caracterizam cada metabólito)

Após a identificação dos metabólitos, estes foram analisados pelo programa *MatLab* para obtenção das respectivas áreas. Deste modo, as áreas referentes a

cada metabólito identificado foram alinhadas, utilizando-se as amostras provenientes de todos os tratamentos (Figura 53). O mesmo procedimento foi realizado para os 11 padrões internos.

Figura 53 - Ilustração demonstrando o alinhamento dos metabólitos, individualmente, no programa *MatLab*. Alinhamento das áreas, de todas as amostras (18 no total), referentes ao metabólito Uracil

Em seguida, foi realizada a normalização dos dados, como já descrito anteriormente, no capítulo II, item 2.6.1.

Os dados normalizados foram utilizados para a Análise de Componentes Principais (PCA), através do programa *SIMCA* (Figura 54). Percebe-se que houve uma tendência de separação entre as amostras de verão e inverno, que pode ser explicada pelos componentes PC1 (28%) e PC2 (23%). Ambos componentes representam 51% da variação dos dados.

Figura 54 - Análise de Componentes Principais (PCA), para as amostras da região cambial coletadas nos períodos: Verão (Summer) e Inverno (Winter), realizado no programa *SIMCA*

Em seguida, a figura do tipo *Loading Plot* (Figura 57) foi gerada. Esta demonstra como cada variável (metabólito) contribui para a separação/formação de grupos dentro das amostras analisadas e fornece também indicações sobre a importância de cada variável dentro do experimento. A análise do *Loading Plot* indica a predominância de oito metabólitos durante o verão e de nove durante o inverno.

Figura 55. Histograma ilustrando os metabólitos, identificados na região cambial de *E. grandis*, que mais contribuíram para a separação das amostras, considerando os dois períodos de análise

No entanto, em virtude do número de repetições biológicas no experimento ($n=3$), um segundo teste estatístico foi executado para determinação dos metabólitos significativamente abundantes, o *HT-self*, com os limiares de 100%, 50% e 30% (Figura 56). Desta forma, houve menor número de metabólitos significativamente abundantes em relação ao *Loading Plot*, mostrando maior acurácia do *HT-self*.

Figura 56 - Resultado do teste de significância HT-self, executado pelo programa “R”. A- metabólitos duas vezes mais abundantes no verão (círculos em verde) e inverno (círculos em preto, vermelho, azul escuro e azul claro). B- metabólitos 0,5 vez mais abundantes no verão (círculos em azul escuro e rosa) e inverno (círculos em preto, verde, vermelho, azul claro e amarelo). C- metabólitos 0,3 vez mais abundantes no verão (círculos em azul claro e escuro) e inverno (círculos em preto, amarelo, verde, vermelho, rosa). Diferentes metabólitos são representados pela mesma cor, dentro e entre as análises

Visando facilitar a observação dos resultados da Figura 56, os oito metabólitos significativamente abundantes foram organizados na Tabela 7, onde é possível observar que apenas o ácido sacárico foi mais abundante durante o verão. Todos os metabólitos identificados, significativos ou não, foram apresentados na figura 57, assim é possível a distribuição desses metabólitos em diferentes vias.

Tabela 7 - Metabólitos significativamente abundantes na casca de *E. grandis*

Metabólitos diferenciais Casca <i>E. grandis</i>					
Metabólito	Classificação	30%	50%	100%	Tratamento
Ácido chiquímico	ácido orgânico	X	X	X	Inverno
Ácido desidroascórbico	ácido orgânico	X	X		Inverno
Malato	ácido orgânico	X	X		Inverno
Eritritol	açúcar	X	X	X	Inverno
Ácido sacárico	açúcar	X	X		Verão
Galactinol	açúcar	X			Inverno
Mio-inositol	álcool	X			Inverno
Taxifolina	fenol	X			Inverno

Os ácidos orgânicos significativamente abundantes na casca foram os ácidos chiquímico e desidroascórbico e o malato (Tabela 7). O ácido chiquímico é um dos intermediários da via do chiquimato, importante processo que une o metabolismo de carboidratos ao metabolismo de compostos aromáticos (HERRMANN; WEAVER, 1999) originando, nas plantas, precursores da fenilalanina, tirosina e triptofano e conseqüentemente da lignina (WEAVER; HERRMANN, 1997; HERRMANN; WEAVER, 1999). O ácido desidroascórbico é formado a partir da oxidação reversível do ácido ascórbico, a vitamina C, um importante antioxidante (PARSON; STEPHEN; FRY, 2011). E o malato, por sua vez, é um dos intermediários do TCA e, malato acumulado durante o dia pode ser utilizado como fonte de energia para a respiração durante a noite (MARTINOIA; RENTSCH, 1994).

Dentre os açúcares identificados na casca de *E. grandis* apenas dois foram mais abundantes durante o inverno, o eritritol e o galactinol, ambos metabólitos tem função de proteção, atuando como crioprotetores (BAÑUELOS et al., 2008). O único metabólito significativamente acumulado durante o verão foi o ácido sacárico, que é um açúcar encontrado nos frutos, látex e caule de diversas plantas (WALASZEK et al., 1996). Esse metabólito tem despertado o interesse de pesquisadores, pois estudos indicam que o seu consumo contribui para a prevenção do câncer (WALASZEK et al., 1996, PEREZ et al., 2008). A síntese do ácido sacárico é resultante da oxidação da glicose pelo ácido nítrico (WALASZEK et al., 1996). Esse açúcar já foi encontrado em *Sebertia acuminata*, árvore cujo látex é rico em níquel (CALLAHN et al., 2008). No entanto, não há outros relatos da quantificação/determinação desse metabólito em *Eucalyptus* spp.

O mio-inositol foi o único álcool significativamente abundante na casca, este é um importante metabólito que participa de diversos processos celulares incluindo a transdução de sinais, resposta a estresses, biossíntese de parede celular, regulação do crescimento, tolerância osmótica, metabolismo do ácido indol acético (IRVINE; SCHELL, 2001 e síntese do ácido fítico (ABID et al., 2009). Também foi possível encontrarmos a taxifolina, um flavonóide.

3.3.10 Análise integrada do perfil metabólico primário

Os dados gerados pelas diferentes metodologias, relacionados ao metabolismo primário, foram agrupados na figura 57, para que fosse possível uma melhor compreensão sobre as mudanças dinâmicas ocorridas na casca de *E. grandis*. Foram encontradas diferenças significativas nos três níveis funcionais analisados (transcritos, proteínas e metabólitos), evidenciando a ocorrência de uma reconfiguração metabólica desencadeada pelo período sazonal.

Os resultados indicam que a partição do carbono ocorre de modo diferencial entre os períodos de verão e inverno. Durante o inverno houve acúmulo diferencial dos três carboidratos solúveis analisados (glicose, frutose e sacarose) e a maior abundância de galactinol e eritritol, metabólitos cuja concentração é maior no inverno (BAÑUELOS et al., 2008). O galactinol é um importante intermediário da biossíntese de rafinose e, juntos, esses metabólitos atuam protegendo as membranas celulares contra estresses abióticos (PENNYCOOKE et al., 2004). A nível transcricional também é possível verificar que, durante o inverno, houve o direcionamento da glicólise no sentido da produção de carboidratos. Proteínas atuantes nessa via também foram mais expressas durante o mesmo período. Não foram encontradas proteínas da via fermentativa, mas verificamos expressão diferencial para os transcritos da *ADH* e *PDC* (Figuras 36 e 38), a *ADH* foi mais expressa durante o inverno e o *PDC* no verão. Estes dados sugerem que outras isoformas estão atuando durante a fermentação alcoólica, exibindo padrão temporal de regulação. Tanto o malato quanto a malato desidrogenase foram mais abundantes durante o inverno. O ácido desidroascórbico (DHA), um importante antioxidante, foi um dos metabólitos mais abundantes no inverno. Sete prováveis isoformas da proteína ascorbato peroxidase também foram encontradas, duas foram mais abundantes no inverno e as demais isoformas, no verão. Essa proteína promove a redução de peróxido de hidrogênio a água, utilizando o ascorbato como

doador de elétrons, processo necessário para a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) do metabolismo celular (MURGIA et al., 2004). Esses dados apontam que esse mecanismo está sendo utilizado tanto no verão quanto inverno o que era esperado, pois a formação de ROS é resultante de diversos processos metabólicos e respostas a estresses (MURGIA et al., 2004), deve-se ressaltar que diferentes isoformas estão sendo utilizadas, indicando um padrão temporal de expressão diferenciado. Ademais, foram encontrados diversas proteínas relacionadas a respostas a estresses, como as *heat shock proteins* (Figura 48). O chiquimato também apresentou maior acúmulo durante o verão e as proteínas da biossíntese de ligninas também foram mais expressas nesse período (ANEXO B). Deve ser ressaltado que embora nenhum metabólito diretamente relacionado a fixação de carbono tenha sido identificado, foram encontrados transcritos e proteínas do ciclo de Calvin-Benson, com destaque a *RbcL*, sugerindo que há fixação de carbono na casca de *E. grandis*.

Figura 57 - Mapa metabólico indicando as principais mudanças ocorridas na casca de *E. grandis*, relacionadas ao metabolismo primário. Retângulos coloridos indicam os metabólitos identificados por GC-MS significativamente acumulados no verão (amarelo) e inverno (roxo). Retângulos pontilhados indicam os demais metabólitos identificados não estatisticamente significativos. Círculos coloridos indicam proteínas identificadas por gel 2D significativamente expressas no verão (amarelo) e inverno (roxo) e quadrados coloridos indicam transcritos analisados por qPCR significativamente acumulados durante o verão (amarelo) e inverno (roxo)

Referências

ABID, G.; SILUE, S.; MUHOVSKI, Y.; JACQUEMIN, J.M.; OUSSAINT, A.; BAUDOIN, J.P. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. **Gene**, London, v. 439, p. 1–10, 2009.

AL-WHAIBI, M.H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University (Science)**, London, 2010, In Press.

ALEKSEEV, A.A.; MATORIN, D.N., OSIPOV, V.A.; VENEDIKTOV, P.S. Investigation of the photosynthetic activity of bark phelloderm of arboreous plants using the fluorescent method. **Moscow University Biological Science Bulletin**, Moscow, v. 62, n. 4, p. 28-33, 2007.

ASCHAN, G.; WITTMANN, C.; PFANZ, H. Age-dependent bark photosynthesis of aspen twigs. **Trees**, Berlin, v. 15, p. 431-437, 2001.

ASCHAN, G.; PFANZ, H. Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. **Flora**. Amsterdam, v. 198, p. 81-97, 2003.

ASHWORTH E.N., STIRM V.E., VOLENEC J. J. Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Corms sericea* L. **Tree Physiology**. Victoria, v.13, p. 379-388, 1993.

BAÑUELOS, M.L.G.; MORENO, L.V.M.; WINZERLING, J.; OROZCO, A.; GARDEA, A.A. Winter metabolism in deciduous trees: mechanisms, genes and associated proteins. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 31, n. 4, p. 295 – 308, 2008.

BERVEILLER, D.; KIERZKOWSKI, D.; DAMESIN, C. Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. **Tree Physiology**, Victoria, 27, 53–61, 2007.

BERVEILLER D., DAMESIN E. Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase. **Trees**, Berlin, v. 22, p.149–157, 2008.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BONHOMME, M., PEUCH,M., AMEGLIO,T., RAGEAU, R., GUILLIOT, A., DECOURTEIX, M., ALVES, G., SAKR, S., LACOINTE, A. Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia* L.). **Tree Physiology**, Victoria, v. 30, p. 89-102, 2009.

CARVALHO M.C.C.G, GOMES D.G.C., CARNEIRO R.T., MOON D.H., SALVATIERRA G.R., FRANCESCHIN L.M., DE ANDRADE A., CELEDON P.A.F., ODA S., LABATE C.A. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 905 -918, 2008.

CHANTUMA, P.; LACOINTE, A.; KASEMSAP, P.; THANISAWANYANGKURA, S.; GOHET,E.; CLEMENT, A.; GUILLIOT, A.; AMEGLIO, T.; THALER, P. Carbohydrate storage in wood and bark of rubber trees submitted to different level of C demand induced by latex tapping. **Tree Physiology**, Victoria, v. 43, p. 1-11, 2009.

CHAPIN, F.S.; SCHULZE, E.D.; MOONEY, H.A. The ecology and economics of storage in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, London, v.21, p.423–44, 1990.

DAFOE, N.J.; CONSTABEL, C.P. Proteomic analysis of hybrid poplar xylem sap. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, p. 856-63. 2009.

DEFIORIO, G.; HORGAN, G.; JASPARS, M.; WOODWARD, S. Defence response of Sitka spruce before and after inoculation with *Heterobasidion annosum*: ¹H NMR fingerprinting of bark and sapwood metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 402, p. 3333–3344, 2012.

FAUROBERT, M.; MIHR, C.; BERTIN, N.; PAWLOWSKI, T.; NEGRONI, L.; SOMMER, N.; CAUSSE, M. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. **Plant Physiology**, Lancaster, v.143, p.1327-1346, 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERL, R.J. 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.120, p.173-178, 2004.

FERNIE A.R.; STITT M. On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: coping with increasing complexity in logic, chemistry and network interactions. **Plant Physiology**, Washington, In press, 2012.

FOELKEL, C. A **casca da árvore de eucalipto**: aspectos morfológicos, fisiológicos, florestais, ecológicos e industriais, visando à produção de celulose e papel. São Paulo: ABTCP, 2005. Disponível em <http://www.eucalyptus.com.br/>. 2005, 109 p. Acesso em 29 Jan. 2008.

FREDERICH, M.; CHOI, Y.H.; ANGENOT, L.; HARNISCHFEGGER, G.; LEFEBER, AWM.; VERPOORTE, R. Metabolomic analysis of *Strychnos nux-vomica*, *Strychnos icaia* and *Strychnos ignatii* extracts by H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1993–2001, 2004.

GARTNER, B.L. Does photosynthetic bark have a role in the production of core vs. outer wood. **Wood and Fiber Science**, Hanover, v. 28, n. 1, p. 53-61, 1996.

GAUCHER, C.; GOUGEON, S.; MAUFFETTE, Y.; MESSIER, C. Seasonal variation in biomass and carbohydrate partitioning of understory sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula alleghaniensis*) seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, p.93–100, 2005.

HARRY D.E.; KIMMERER T.W. Molecular genetics and physiology of alcohol dehydrogenase in woody plants. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 43, p. 251-272, 1991.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

HOCH, G.; RICHTER, A.; KORNER, CH. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell and Environment**. Hoboken, v. 26, p. 1067-1081, 2003.

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

IVANOV, A.G.; KROL, M.; SVESHNIKOV, D.; GARDESTROM, G.M.P.; HURRY, V.; OQUIST, G.; HUNER, N.P.A. Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma os Scot pine. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 1165-1177, 2006.

IRVINE, R.F.; SCHELL, M.J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, London, v. 2, p. 327–338, 2001.

JORGE, I.; NAVARRO, R. M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C.; JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**.Weinheim, v. 5, p. 222-234, 2005.

KASUGA, J.; ARAKAWA, K.; FUJIKAWA, S. High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. **New Phytologist**, London, v. 174, n. 3, p. 569-579, 2007.

KIMMERER T.W., STRINGER M.A. Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 87, p. 693-697, 1988.

KHOUDOLI, G.A.; PORTER, I.M.; BLOW, J.J.; SWEDLOW, J.R. Optimization of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. **Proteome Science**, Lancaster, v.2, p.12, 2004.

KOONJUL,P.K.; BRANDT, W.F.; FARRANT, J.M.; LINDSEY, G.G. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, p. 915-916, 1999.

LEBORGNE, N.; TEULIÈRES, C.; CAUVIN, E.; TRAVERT, S.; BOUDET, A.M. Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions. **Trees**, Berlin, v, 10, p. 86-93, 1995.

LI, X.; XU, H.X.; SOUTHERTON, S.G. Transcriptome profiling of *Pinus radiata* juvenile wood with contrasting stiffness identifies putative candidate genes involved in microfibril orientation and cell wall mechanics. **BioMed Central Genomics**, London, v. 12, p. 468 - 480., 2011.

LIPPERT, D.; CHOWRIRA, S.; RALPH, S.R.; ZHUANG, J.; AESCHLIMAN, D.; RITLAND, C.; RITLAND, K.; BOHLMANN, J. Conifer defense against insects: Proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodesstrobi*). **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 248-270, 2007.

LYTLE, B.L.; SONG, J.; CRUZ, N.B.; PETERSON, F.C.; JOHNSON, K.A.; BINGMAN, C.A.; PHILLIPS, J.N.J.; VOLKMAN, B.F. Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. **Proteins**, London, v. 76, n. 1, p. 237-243, 2009.

MA, Q.H.; XU, Y. Characterization of a caffeic acid 3-Omethyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. **Biochimie**, Paris, v. 90, p., 515–524, 2008.

MacDONALD, R.C., KIMMERER, T.W. Ethanol in the stems of trees. **Physiologia Plantarum**. Lund, v. 4, p. 582-588, 1991.

MARTIN, C.; SMITH, A.M. Starch Biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville v. 7, p. 971-985, 1995.

MARTINOIA, E.; RENTSCH, D. Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 447-467, 1994.

MITTLER, R.; FENG, X.; COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 461–474, 1998.

MURGIA, I.; TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACALE, M.; CARRAVIERI, S.; SOAVE, C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. **Plant Journal**, Victoria, v. 38, p. 940–953, 2004.

RENAUT, J.; HAUSMAN, J.F.; BASSETT, C.; ARTLIP, T.; CAUCHIE, H.M.; WITTERS, E.; WISNIEWSKI, M. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). **Tree Genetics & Genomes**, Dordrecht, v. 4, p.589–600.

PATGER, M., JENSEN, C.R., PETERSEN, K.K., LIU, F., ARORA, R. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 134, p. 473–485, 2008.

PALLARDY, S.G. **Physiology of Woody Plants: Carbohydrates**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2008. 454 p.

PENNYCOOKE, J.C.; VEPACHEDU, R.; STUSHNOFF, C.; JONES, M.L. Expression on an alpha-Galactosidase Gene in *Petunia* is Upregulated during Low-temperature Deacclimation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 129, n. 4, p. 491-496, 2004.

PEREZ, J.L.; JAYAPRAKASHA, G.K.; YOO, K.S.; BHIMANAGOUDA, S.P. Development of a method for the quantification of d-glucaric acid in different varieties of grapefruits by high-performance liquid chromatography and mass spectra. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1190, p. 394–397, 2008.

PFANZ, H.; ASCHAN, G.; LANGENFELD-HEYSER, R.; WITTMANN, C.; LOOSE, M. Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. **Naturwissenschaften**, Germany, v. 89, p.147–162, 2002.

PLAXTON W.C.; PODESTÁ, F.A. The Functional Organization and Control of Plant Respiration. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 25, n. 2, p. 159-198, 2006.

RISON, S. C.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 56-69, 2000.

ROBERTS, M.R. 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signaling. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.8, n.5, p. 218-223, 2003.

ROBINSON, A.R.; MANSFIELD, S.D. Rapid analysis of poplar lignin monomer composition by a streamlined thioacidolysis procedure and near-infrared reflectance-based prediction modeling. **The Plant Journal**, London, n. 58, p. 706–714, 2009.

SIVACI, A.. Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.109, p. 234–237, 2006.

SOLER, M.; SERRA, O.; MOLINAS, M.; BERTHOU, E.G.; CARITAT, A.; FIGUERAS, M. Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 743–751, 2008.

SPOKEVICIUS, A.; SOUTHERTON, S.G.; MACMILLAN, C.P.; QIU, D.; GAN, S.; TIBBITS, J.F.G.; MORAN, G.F.; BOSSINGER, G. Beta-tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. **The Plant Journal**, London, v. 51, p. 717 – 726, 2007.

SWINDELL, W.R.; HUEBNER, M.; WEBER, A.P. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 661-677, 2007.

TRAVERT, S., VALERIO, L., FOURASTÉ, I., BOUDET, AM., TEULIERES, C. Enrichment in Specific Soluble Sugars of Two Eucalyptus Cell-Suspension Cultures by Various Treatments Enhances Their Frost Tolerance via a Noncolligative Mechanism. **Plant Physiology**. Victoria, v. 114, p. 1333-1442, 1997.

VAN-DAMME, E.J.; VAN-LEUVEN F.; PEUMANS, W.J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconjugate Journal**, London, v. 14, n. 4, p. 449-456, 1997.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 13, p. 227-232, 2012.

WASTENEYS, G.O. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 651–660, 2004.

WALASZEK, Z.; SZEMRAJ, J.; HANAUSEK, M.; ADAMS, A.K.; SHERMAN, U. D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary d-glucarate in the rat. **Nutrition Research**, Oxford, v. 16, n. 4. p. 673- 681, 1996.

WITTMANN, C.; PFANZ, H. Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendulata* Roth.) Trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 4293-4306, 2007.

YANG, J.; KAMDEM, D.P.; KEATHLEY, D.E.; HAN, K.H. Seasonal changes in gene expression at the sapwood–heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, p.461–474, 2004.

YIN, L.; TAO, Y.; ZHAO, Z.; SHAO, J.; LI, X.; LIU, G.; LIU, S.; ZHU, L. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 755-768, 2007.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 20, p. 417–417, 2002.

ZHOU, H. **Isolation and functional genetic analysis of *Eucalyptus* wood formation genes**. 2005. 150 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de Pretoria, Pretoria, 2005.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise integrada de resultados obtidos a partir das diferentes “ômicas” é reconhecida como uma importante ferramenta para a biotecnologia e melhoramento vegetal. No entanto, a interpretação e integração desses resultados é uma tarefa bastante complexa e, portanto, um dos desafios da genômica funcional atual. Aliado a este fato tem-se a grande importância econômica do *Eucalyptus* spp e a necessidade de estudos mais detalhados a respeito do metabolismo primário dessa arbórea. Neste contexto, o presente trabalho propôs a investigação do metabolismo primário na região cambial e casca de *E.grandis* durante dois períodos contrastantes, verão e inverno, por meio da análise de transcritos (qPCR), proteínas (Gel 2D) e metabólitos (GC-MS).

Os dados apresentados indicam que a partição de carbono favorece diferentes vias metabólicas, na região cambial e casca, durante os períodos analisados, ficando evidente que, embora a região subtropical não tenha temperaturas tão baixas quanto aquelas vivenciadas nas regiões temperadas, houve uma reconfiguração metabólica em resposta às diferenças sazonais. Assim, muito embora as análises tenham sido realizadas em apenas dois períodos, verão e inverno, foram encontradas alterações nos diferentes níveis funcionais analisados.

Outro ponto importante foi verificar na casca o maior acúmulo de carboidratos durante o inverno, período de atividade metabólica reduzida. O mesmo não foi observado para a região cambial, que apresentou a nível transcricional e protéico, o direcionamento do metabolismo primário para o acúmulo de carboidratos, porém não foram detectadas diferenças significativas no acúmulo desses carboidratos entre o verão e inverno. Assim, é possível que os carboidratos produzidos na região cambial, durante o inverno, sejam armazenados na casca, sendo prontamente disponíveis quando necessário.

No presente projeto ficou evidente também a participação efetiva da glicólise e fermentação alcoólica para o suprimento energético, tanto da região cambial quanto da casca. Como mencionado acima, durante o verão, o piruvato é direcionado para a via fermentativa. Este é um importante resultado, que também corrobora com a hipótese proposta, evidenciando que glicólise e fermentação têm papel fundamental para o desenvolvimento da madeira e qualidade do produto. Embora a fermentação alcoólica não seja tão eficiente energeticamente quanto o

TCA, essa via é fundamental para a geração de energia, mantendo o metabolismo do eucalipto ativo mesmo em condição de hipóxia.

O presente trabalho mostrou que somente a subunidade maior da rubisco foi significativamente expressa tanto na região cambial quanto na casca. Estes resultados possibilitam maiores discussões a respeito da função biológica da *RbcL* no tronco das árvores. Apenas a *RbcL* foi significativamente expressa pois a região cambial é rica em CO₂, de modo que a fixação de carbono pode ser realizada com a participação apenas dessa subunidade catalítica. Este carbono pode ser então destinado à produção de carboidratos ou ser armazenado como fonte de nitrogênio, ficando prontamente disponível para o metabolismo, quando necessário.

É importante mencionar que a formação da madeira e o crescimento da árvore são pouco estudados do ponto de vista do metabolismo primário. Os resultados gerados representam um avanço significativo no conhecimento do metabolismo primário de *E. grandis* em diferentes níveis funcionais, fornecendo novas informações e perspectivas para estudos mais detalhados.

Novas isoformas dos genes *ADH* e *PDC* e genes atuantes na glicólise devem ser estudadas na região cambial e casca de eucalipto, nas mesmas condições realizadas no presente trabalho, ou em árvores submetidas a diferentes tratamentos, como, por exemplo, estresse hídrico, visando identificar e caracterizar esses genes quanto ao seu padrão temporal e espacial de expressão, possibilitando ainda o estudo das suas regiões promotoras, visando determinar sua regulação transcricional. Ademais, seria interessante quantificar a atividade enzimática da ADH e PDC e também determinar a concentração de etanol na região cambial. Outra possibilidade seria a busca e estudo de mais genes/ isoformas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, visando à melhor compreensão temporal sobre o incremento de biomassa na região cambial.

Considerando a expressão diferencial da *RbcL*, seria interessante também quantificar a atividade da rubisco e analisar o padrão transcricional de genes atuantes no metabolismo de nitrogênio, afim de, confirmar a função da rubisco na região cambial e casca.

Em relação à metabolômica, no trabalho foi utilizada a abordagem de identificação global dos metabólitos e não uma análise direcionada para uma determinada classe. Embora poucos metabólitos tenham sido identificados e considerados significativamente abundantes, informações relevantes foram geradas.

Contudo, informações adicionais podem ser obtidas com um novo experimento de GC-MS, utilizando um número maior de amostras, por exemplo $n=5$, e também a análise de metabólitos por LC-MS, onde a identificação dos metabólitos secundários seria favorecida. Ademais, pode-se utilizar isótopos estáveis de carbono para um acompanhamento mais detalhado da partição de carbono de modo que marcadores metabólicos possam ser estabelecidos.

ANEXO

ANEXO A

Tabela 8 – Proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*

(continuação)

Spot nº	Proteína <i>E.grandis</i>	Categoria funcional	Score <i>E. grandis</i>	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico
3	Transketolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	468	32%	S54300	81064 7,06
4	Fructose-bisphosphate aldolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	676	47%	Egrandis_v1_0.017318m	38888 6,56
27	phosphoglycerate kinase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	3180	61%	Egrandis_v1_0.014782m	42266 5,82
55	pyruvate decarboxylase-2	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1043	28%	Egrandis_v1_0.006350m	67107 5,79
88	phosphoglucose isomerase 1	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	313	19%	Egrandis_v1_0.006104m	68470 5,31
Pref_V_9	Phosphoglycerate kinase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	2855	57%	Egrandis_v1_0.014782m	42266 5,82
Pref_V_13	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1242	37%	Egrandis_v1_0.010587m	53741 5,79
5	Alcohol dehydrogenase 1	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	378	19%	Egrandis_v1_0.018070m	37846 6,42
6	Fructose-bisphosphate aldolase 2	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	256	23%	Egrandis_v1_0.017318m	38888 6,56
17	alcohol dehydrogenase 1	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	149	21%	Egrandis_v1_0.012235m	49898 6,44
22	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1459	62%	Egrandis_v1_0.018622m	36831 6,34
29	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	167	8%	Egrandis_v1_0.010054m	55075 6,24
48	Alcohol dehydrogenase 3	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	123	40%	Q9XHT2	30950 5,01
Pref_I_1	Aldolase-type TIM barrel family protein	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1060	40%	Egrandis_v1_0.012736m	48189 6,92
18	Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	651	22%	Egrandis_v1_0.014061m	47060 6,48
19	Citrate synthase family protein	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	70	5%	Egrandis_v1_0.011280m	53123 6,96
30	Cyclase associated protein 1	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	146	16%	Egrandis_v1_0.013470m	46368 8,42
33	ATP synthase alpha/beta family protein	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	228	18%	Egrandis_v1_0.007569m	60958 6,30
47	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	1918	58%	Egrandis_v1_0.019581m	34244 5,46
53	pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	346	24%	Egrandis_v1_0.015068m	43754 8,04
Pref_V_17	delta subunit of Mt ATP synthase	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	1021	28%	Egrandis_v1_0.018606m	38097 8,63
15	S-methyl-5-thioribose kinase	1.2.1 Amino Acid Metabolism	240	13%	Egrandis_v1_0.013917m	48128 5,79
26	Cobalamin-independent synthase family protein	1.2.1 Amino Acid Metabolism	1132	24%	Egrandis_v1_0.003834m	83254 6,44

Tabela 8 – Proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*

			(continuação)				
Spot nº	Proteína <i>E.grandis</i>	Categoria funcional	Score <i>E. grandis</i>	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico	
Pref_V_7	glutamine synthase clone R1	1.2.1 Amino Acid Metabolism	727	48%	Egrandis_v1_0.018223m	38181	5,33
Pref_V_8	Cobalamin-independent synthase family	1.2.1 Amino Acid Metabolism	868	20%	Egrandis_v1_0.003834m	83254	6,44
Pref_V_19	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1.2.1 Amino Acid Metabolism	1147	35%	Egrandis_v1_0.010712m	53747	6,05
12	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	2173	43%	Egrandis_v1_0.011888m	50641	5.66
25	UDP-sugar pyrophosphorylase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	187	11%	Egrandis_v1_0.005961m	69169	6,07
63	Adenosine kinase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	1234	47%	Egrandis_v1_0.018389m	37852	5.09
Pref_V_12	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	1404	44%	Egrandis_v1_0.010940m	53628	6,15
Pref_V_16	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	1932	46%	Egrandis_v1_0.010940m	53628	6,15
Pref_I_2	adenosine kinase 2	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	840	47%	Egrandis_v1_0.018389m	37852	5,09
89	pyrophosphorylase 4	1.2.4 Phosphorus Metabolism	276	18%	Egrandis_v1_0.052216m	25711	5,28
Pref_V_5	xylose isomerase family protein	1.2.5 Carbohydrate Metabolism	318	15%	Egrandis_v1_0.010250m	55314	5,43
Pref_V_14	Thiolase family protein	1.2.6 Lipid, Fatty Acid And Sterol Metabolism	2026	54%	Egrandis_v1_0.052037m	40108	6,89
11	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	1.2.8 Secondary Metabolism	698	69%	Egrandis_v1_0.020543m	3360	5.69
23	Chalcone-flavanone isomerase family protein	1.2.8 Secondary Metabolism	168	16%	Egrandis_v1_0.026727m	23294	5.22
34	Chalcone and stilbene synthase family protein	1.2.8 Secondary Metabolism	81	12%	Egrandis_v1_0.015307m	43164	6,34
51	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	1.2.8 Secondary Metabolism	1983	80%	Egrandis_v1_0.020543m	33603	5,69
72	leucoanthocyanidin dioxygenase	1.2.8 Secondary Metabolism	184	13%	Egrandis_v1_0.017634m	40101	6,04
100	Chalcone-flavanone isomerase family protein	1.2.8 Secondary Metabolism	78	14%	Egrandis_v1_0.026727m	23294	5,22
Pref_V_2	G-box regulating factor 6	2.1.2 Signal Transduction	862	52%	Egrandis_v1_0.024177m	28438	4,78
Pref_V_3	G-box regulating factor 6	2.1.2 Signal Transduction	800	53%	Egrandis_v1_0.024177m	28438	4,78
Pref_V_4	G-box regulating factor 6	2.1.2 Signal Transduction	854	52%	Egrandis_v1_0.024177m	28438	4,78
8	ascorbate peroxidase 1	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	1190	36%	Egrandis_v1_0.024217m	27483	5,29
60	importin alpha isoform 1	3.1.1 Protein, Peptide Transport	465	19%	Egrandis_v1_0.008714m	59355	5,21
Pref_V_20	RAN GTPase 3	3.1.1 Protein, Peptide Transport	406	31%	Egrandis_v1_0.025980m	25468	6,45
106	Nuclear transport factor 2A	3.4 Transport Factors, Kinesins	70	10%	Egrandis_v1_0.031682m	14201	5,13

Tabela 8 – Proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*

(continuação)						
Spot nº	Proteína E.grandis	Categoria funcional	Score E. grandis	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico
16	O-methyltransferase 1	4.1.2.4 Lignin Metabolism	778	39%	Egrandis_v1_0.013381m	48016 6,47
37	O-methyltransferase 1	4.1.2.4 Lignin Metabolism	1671	38%	Egrandis_v1_0.013381m	48016 6,47
92	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2	4.1.2.4 Lignin Metabolism	150	14%	Q9SWB8	27883 5,40
102	MLP-like protein 423	4.1.2.5 Expansins, Xet and Extensin	407	26%	Egrandis_v1_0.029776m	17384 4,93
9	tubulin alpha-3	4.3 Cytoskeleton	647	25%	Egrandis_v1_0.012006m	51211 4,93
103	tubulin folding cofactor A (KIESEL)	4.3 Cytoskeleton	103	18%	Egrandis_v1_0.032663m	12893 5,21
52	Histone	4.5 Chromosome Related	173	16%	Egrandis_v1_0.024177m	28438 4,78
108	Glycine-rich RNA-binding protein	5.2 Rna Related	75	10%	P84560	66320 5,00
97	seryl-tRNA synthetase / serine--tRNA ligase	5.3.2 Aminoacyl-Trna Synthetases/Transferases	174	18%	Egrandis_v1_0.012499m	51790 6,09
28	Protein of unknown function (DUF674)	5.3.3 Translation Related	1016	19%	Egrandis_v1_0.024943m	26211 6,44
35	Translation elongation factor EF1B, gamma chain	5.3.3 Translation Related	385	28%	Egrandis_v1_0.013873m	47762 6,32
73	Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein	5.3.3 Translation Related	1398	35%	Egrandis_v1_0.002714m	94837 5,86
74	tubulin alpha-5	5.3.3 Translation Related	131	10%	Egrandis_v1_0.012356m	50462 4,97
Pref_V_18	eukaryotic translation initiation factor 4A1	5.3.3 Translation Related	484	29%	Egrandis_v1_0.014221m	46982 5,38
45	Protein kinase superfamily protein	5.3.4 Protein Modification/Phosphorylation	148	25%	Egrandis_v1_0.017074m	39265 6,16
80	protein phosphatase 2A subunit A2	5.3.4 Protein Modification/Phosphorylation	664	31%	Egrandis_v1_0.007031m	66377 4,92
24	heat shock protein 70	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	728	25%	Egrandis_v1_0.003884m	81765 5,80
39	Heat shock protein 70	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	376	14%	Egrandis_v1_0.002627m	94551 5,15
40	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1865	39%	Egrandis_v1_0.003091m	90172 5,18
41	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	128	5%	Egrandis_v1_0.003091m	90172 5,18
43	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	321	18%	Egrandis_v1_0.008589m	59752 5,40
49	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1522	46%	Egrandis_v1_0.007763m	60856 6,2
59	heat shock protein 70B	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	87	14%	Egrandis_v1_0.003388m	86332 4,99
68	heat shock protein 89.1	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	187	7%	Egrandis_v1_0.003245m	89622 5,20
79	Heat shock 70B	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	608	27%	Egrandis_v1_0.005502m	71825 5,44

Tabela 8 – Proteínas identificadas na região cambial de *E. grandis*

(conclusão)						
Spot nº	Proteína E.grandis	Categoria funcional	Score E. grandis	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico
83	TCP-1/cpn60 chaperonin family	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	128	15%	Egrandis_v1_0.008589m	59752 5,40
91	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1161	23%	Egrandis_v1_0.004242m	79709 5,32
94	Heat-shock protein 70 B	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	828	17%	Egrandis_v1_0.003388m	86340 4,99
99	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1092	30%	Egrandis_v1_0.002627m	94551 5,15
105	HSP20-like chaperones superfamily protein	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	312	18%	Egrandis_v1_0.026663m	23905 6,05
110	HSP20-like chaperones superfamil	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	838	48%	Egrandis_v1_0.045806m	18794 5,83
31	CLPC homologue 1	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	153	12%	Egrandis_v1_0.002033m	101969 6,29
54	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	993	26%	Egrandis_v1_0.003091m	90172 5,18
57	regulatory particle triple-A ATPase 3	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	1038	34%	Egrandis_v1_0.014168m	46492 5,43
76	CLPC homologue 1	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	469	21%	Egrandis_v1_0.002033m	101969 6,29
87	Proteasome subunit alpha type-2-B	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	428	22%	Egrandis_v1_0.026727m	23293 5,22
64	DC1 domain-containing protein	6.2 Putative Protein	81	5%	Egrandis_v1_0.007715m	63872 5,04
70	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	6.2 Putative Protein	248	18%	Egrandis_v1_0.021547m	31188 7,82
86	N-terminal nucleophile aminohydrolases superfamily protein	6.2 Putative Protein	110	22%	Egrandis_v1_0.019747m	35616 9,45

* Pref_V_ = Proteínas Preferencialmente Expressas no Verão, Pref_I_ = Proteínas Preferencialmente Expressas no inverno

ANEXO B

Tabela 9 – Proteínas identificadas na casca de *E. grandis*

(continuação)						
Spot nº	Proteínas Casca	Categoria	Score E.grandis	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico
21	RuBisCO large subunit-binding	1.1.1.2 C1 Metabolism	410	11%	Egrandis_v1_0.005399m	69445 5,35
58	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	1.1.1.2 C1 Metabolism	325	15%	RBL_ANTFO	53183 6,09
59	RuBisCO large subunit-binding	1.1.1.2 C1 Metabolism	263	13%	Egrandis_v1_0.005399m	69445 5,35
73	Formate dehydrogenase	1.1.1.2 C1 Metabolism	1297	39%	Egrandis_v1_0.015998m	42323 6,68
7	Phosphoglycerate kinase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	3928	58%	Egrandis_v1_0.014782m	42266 5,82
8	Enolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	122	5%	Egrandis_v1_0.021648m	31454 4,84
14	Phosphoglycerate kinase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1681	46%	Egrandis_v1_0.014782m	42266 5,82
51	Phosphoglycerate kinase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1452	32%	Egrandis_v1_0.014782m	42266 5,82
52	Enolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	128	3%	Egrandis_v1_0.010202m	54752 7,94
60	Triosephosphate isomerase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1092	45%	Egrandis_v1_0.020110m	33941 6,95
101	Enolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1610	19%	ENO1_HEVBR	48029 5,57
114	Enolase	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	929	15%	ENO1_HEVBR	48029 5,57
Ech 1	Aldolase superfamily protein	1.1.2 Energy Metabolism (Carbon)	1032	61%	Egrandis_v1_0.017318m	38882 6,56
3	Heat shock proetin (Hsp20)	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	153	28%	Egrandis_v1_0.029820m	18050 5,384
25	Vacuolar H ⁺ -ATPase, subunit B	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	964	27%	Egrandis_v1_0.010528m	54556 5,04
30	ATP synthase alpha/beta family protein	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	1664	51%	Egrandis_v1_0.007569m	60958 6,30
46	Citrate synthase	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	286	21%	Egrandis_v1_0.011280m	53118 6,96
91	Citrate synthase	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	523	18%	Egrandis_v1_0.011280m	53118 6,96
97	Malate dehydrogenase	1.1.3 Energy Transfer/Atp-Proton Motive Force	1094	30%	Egrandis_v1_0.018951m	35958 6,60
71	Phosphoglycerate dehydrogenase	1.2.1 Amino Acid Metabolism	456	35%	Egrandis_v1_0.014972m	42234 5,16
2	UDP-sugar pyrophosphorylase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	395	10%	Egrandis_v1_0.005961m	69169 6,07
41	Adenosine kinase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	1965	45%	Egrandis_v1_0.018389m	37852 5,09
61	UDP-glucose pyrophosphorylase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	89	6%	Egrandis_v1_0.011888m	50641 5,66
63	UDP-glucose dehydrogenase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	554	22%	Egrandis_v1_0.010940m	53628 6,15

Tabela 9 – Proteínas identificadas na casca de *E. grandis*

(continuação)						
Spot nº	Proteínas Casca	Categoria	Score E.grandis	Cobertura %	Sequencia	PM/pl teórico
103	UDP-glucose pyrophosphorylase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	621	32%	Egrandis_v1_0.011888m	50641 5,66
106	UDP-glucose pyrophosphorylase	1.2.3 Nucleotide/Nucleoside and Nucleotide Sugar Metabolism	1187	41%	Egrandis_v1_0.011888m	50641 5,66
87	NAD(P)-linked oxidoreductase	1.2.8 Secondary Metabolism	445	24%	Egrandis_v1_0.019083m	36828 5,49
96	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	1.2.8 Secondary Metabolism	2400	76%	Egrandis_v1_0.020543m	33603 5,69
78	Vacuolar H ⁺ -ATPase, catalytic subunit	2.1 Cell Processes	933	20%	Egrandis_v1_0.006156m	68939 5,36
70	14-3-3 protein	2.1.2 Signal Transduction	568	32%	Egrandis_v1_0.043757m	31233 4,82
123	14-3-3- protein	2.1.2 Signal Transduction	1031	39%	Egrandis_v1_0.023614m	29806 5,0
1	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	1788	41%	Egrandis_v1_0.024254m	27613 6,07
24	Peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	209	9%	gi 242089639	38438 8,30
31	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	84	7%	Egrandis_v1_0.024254m	27613 6,07
45	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	121	10%	Egrandis_v1_0.024164m	27545 6,08
47	Glutathione peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	75	8%	Egrandis_v1_0.024172m	27637 9,17
69	Glutathione S-transferase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	157	8%	Egrandis_v1_0.022631m	29680 4,91
74	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	1624	57%	Egrandis_v1_0.024217m	27483 5,29
79	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	1447	51%	Egrandis_v1_0.024254m	27613 6,07
99	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	200	14%	Egrandis_v1_0.024254m	27613 6,07
107	Copper/zinc-superoxide dismutase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	296	19%	Egrandis_v1_0.029096m	17246 5,61
Es 1	Ascorbate peroxidase	2.2.2 Protection Responses/Detoxification	1406	41%	Egrandis_v1_0.024164m	27545 6,08
90	Late embryogenesis abundant protein	2.2.3.2 Abiotic	1384	43%	Egrandis_v1_0.020038m	35060 4,68
105	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	4.1.2.4 Lignin Metabolism	383	31%	COMT1_EUCGU	40401 5,52
124	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	4.1.2.4 Lignin Metabolism	120	3%	Egrandis_v1_0.003388m	86332 4,99
17	Beta-tubulin	4.3 Cytoskeleton	267	13%	Egrandis_v1_0.012369m	51079 4,74
102	Beta-tubulin	4.3 Cytoskeleton	1533	27%	Egrandis_v1_0.012451m	50958 4,78
111	Beta-tubulin	4.3 Cytoskeleton	2034	34%	Egrandis_v1_0.012369m	51079 4,74
44	Glycine-rich RNA-binding protein	5.2 Rna Related	283	21%	Egrandis_v1_0.020038m	35060 4,68
32	Elongation factor Tu	5.3.3 Translation Related	374	14%	Egrandis_v1_0.007207m	62666 6,53
66	Eukaryotic initiation factor	5.3.3 Translation Related	381	9%	Egrandis_v1_0.014208m	46883 5,37

Tabela 9 – Proteínas identificadas na casca de *E. grandis*

(conclusão)						
Spot nº	Proteínas Casca	Categoria	Score E.grandis	Cobertura %	Sequencia	PM/pi teórico
75	Elongation factor 1 beta	5.3.3 Translation Related	684	14%	Egrandis_v1_0.021389m	33268 8,61
84	Eukaryotic initiation factor	5.3.3 Translation Related	1471	41%	Egrandis_v1_0.014208m	46883 5,37
4	Heat shock protein (Hsp20)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	565	28%	Egrandis_v1_0.021389m	33268 8,61
11	Heat shock protein 101	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	2052	28%	Egrandis_v1_0.044829m	101490 5,84
13	Heat shock protein (sHsp)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	292	8%	Egrandis_v1_0.029182m	18873 6,33
40	Heat shock protein (Hsp70)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1888	31%	Egrandis_v1_0.003388m	86332 4,99
57	Heat shock protein mitochondrial	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	385	21%	Egrandis_v1_0.026204m	24329 5,54
62	Heat shock protein (Hsp20)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1331	50%	Egrandis_v1_0.045806m	18794 5,83
67	Heat shock protein (sHsp)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	157	15%	Egrandis_v1_0.029182m	18873 6,33
76	Heat shock protein (Hsp20)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1589	26%	Egrandis_v1_0.021389m	33268 8,61
82	Heat shock protein (Hsp70)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	3155	44%	Egrandis_v1_0.005502m	71825 5,44
94	Heat shock protein (sHsp)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	810	34%	Egrandis_v1_0.029182m	18873 6,33
98	Heat shock protein (Hsp20)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	363	23%	Egrandis_v1_0.026663m	23904 6,05
104	Heat shock protein (Hsp70)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	383	18%	Egrandis_v1_0.026663m	23904 6,05
112	Heat shock protein (sHsp)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	2682	47%	Egrandis_v1_0.025526m	25250 8,53
118	Heat shock protein (Hsp70)	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1292	24%	Egrandis_v1_0.003884m	81765 5,8
120	Heat shock protein 101	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1010	22%	Egrandis_v1_0.044829m	101490 5,84
125	Heat shock protein (Hsp70), mitochondrial	5.3.5 Protein Folding/Chaperoning	1413	29%	Egrandis_v1_0.004853m	73320 5,62
42	Proteasomal regulatory protein	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	187	14%	Egrandis_v1_0.018412m	38094 6,50
55	Proteasome subunit beta type	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	1215	34%	Egrandis_v1_0.021324m	33084 8,9
68	26S proteasome non-ATPase regulatory particle	5.3.6 Protein Cleavage and Turnover	533	28%	Egrandis_v1_0.023175m	30747 4,33
116	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	6.2 Putative Protein	386	21%	Egrandis_v1_0.018330m	36713 9,6
54	Major Latex protein MLP-like		1055	50%	Egrandis_v1_0.029781m	17355 5,03
95	Major Latex protein (MLP-like)		792	55%	Egrandis_v1_0.029781m	17355 5,03

* Ech 1 = Proteínas Exclusiva verão Es 1 = Proteína Exclusiva inverno