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

Proteômica quantitativa e metabolômica do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensis*, tolerante e susceptível ao déficit hídrico

Janaina de Santana Borges

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

**Piracicaba
2016**

Janaina de Santana Borges
Engenheira Florestal

Proteômica quantitativa e metabolômica do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensis*, tolerante e susceptível ao déficit hídrico

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
2016**

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

Borges, Janaina de Santana

Proteômica quantitativa e metabolômica do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensis*, tolerante e susceptível ao déficit hídrico / Janaina de Santana Borges. - - Piracicaba, 2016.
124 p. : il.

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

1. Eucalipto 2. Seca 3. Estresse 4. Folha 5. Label-free 6. Proteínas 7. Metabólitos primários I. Título

CDD 634.9734
B732p

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

DEDICAO

A Deus por permitir a realização do meu doutorado, ao meu esposo Ezio meu maior incentivador na conclusão deste e ao meu filho Heitor por ser o meu maior e mais fiel companheiro.

OFEREÇO

A minha família por suportar toda distância existente para que esta sonhada etapa pudesse ser concretizada.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais puros agradecimentos:

A Deus;

Ao meu esposo Ezio, pela forte base que me proporciona;

Ao meu Heitor, por toda sapequice e por me fazer sorrir todos os dias;

Aos meus pais, Vera e Claudio, por estarem sempre presentes quando preciso;

A todos os meus parentes que sempre se preocupam comigo;

Aos meus amigos e colegas que mesmo na distância sabem que são importantes;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Labate por permitir minha evolução de conhecimento ao longo do mestrado e doutorado, toda amizade e orientação e por todo auxílio dado no desfecho e conclusão do doutorado;

Um agradecimento especial a Mônica V. Labate pelo constante suporte, a Ilara e Simone por todas as explicações e auxílios em minhas dúvidas. Muito obrigada!

A Capes e CNPq (Processo 141031/2015-8) pelo suporte financeiro;

A todos os professores da ESALQ/USP que me proporcionaram diversos conhecimentos ao longo do doutorado e todos os funcionários que sempre estão prontos a nos atender. Obrigada por toda dedicação;

A toda equipe do laboratório Max Feffer por todo companheirismo, aprendizagens e brincadeiras ao longo destes anos: Mônica, Simone, Ilara, Felipinho, Fabrício, Flávia, Ana Paula, Mariana, Thaís, Andressa, Maria Letícia, Hana, Juliana, Marisângela e Livia.

"Nada surge com um propósito. Mas quaisquer características, sejam elas anatômicas, fisiológicas ou químicas, que surjam durante o processo evolutivo e que aumentem as chances de um ser vivo deixar descendentes, serão incorporadas hereditariamente. Tudo isso cria um mundo absurdamente aleatório e por isso mesmo tão belo. Isso nos coloca, evolutivamente, na mesma condição de um ser tão pequeno quanto uma bactéria ou tão grande quanto uma baleia azul. Todos constituídos por um conjunto semelhante de moléculas orgânicas: carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos" Emery et al., 2010.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Cenário florestal mundial e o déficit hídrico.....	23
2.2 Déficit Hídrico em plantas.....	25
2.2.1 Déficit Hídrico e expansão foliar.....	25
2.2.2 Déficit hídrico e fotossíntese	26
2.2.3 Déficit hídrico e ajuste osmótico da planta	28
2.2.4 Déficit hídrico e dissipação de energia das folhas.....	29
2.2.5 Papel dos fatores de transcrição e do ABA em respostas ao estresse abiótico	30
2.3 Proteômica	32
2.4 Metabolismo primário	34
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Produção de mudas e fase de seleção	41
4.2 Medições de trocas gasosas	42
4.3 Extração e digestão de proteínas	42
4.4 Extração de metabólitos	43
4.5 Identificação por espectrometria de massas das proteínas.....	44
4.6 Identificação por espectrometria de massas dos metabólitos primários	45
4.7 Pesquisas em bancos de dados e análise estatística dos dados de proteômica	45
4.8 Pesquisas em bancos de dados e análise estatística dos dados de metabolômica	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1 Respostas fisiológicas ao déficit hídrico: medições de trocas gasosas.....	49
5.2 Proteínas globais identificadas em cada tratamento	50
5.3 Mudanças na regulação de proteínas em cada comparação pareada.....	52
5.4 Processos biológicos das proteínas de folhas diferencialmente expressas em cada análise comparativa pareada.....	54
5.5 Processos biológicos alterados pelo déficit hídrico em folhas de <i>Eucalyptus</i>	57
5.5.1 Homeostase celular (GO:0019725).....	58

5.5.2 Fotossíntese (GO:0015979)	61
5.5.3 Resposta ao estímulo abiótico (GO:0009628) e resposta ao estresse (GO:0006950)	66
5.5.4 Morte celular (GO:0008219)	71
5.5.5 Participação de enzimas diferencialmente expressas em importantes vias	73
5.6 Importantes processos biológicos afetados negativamente na presença do déficit hídrico	78
5.7 Metabólitos globais identificados em cada tratamento.....	79
5.8 Contribuição dos metabólitos de folha para a separação dos tratamentos e vias metabólicas.....	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	107

RESUMO

Proteômica quantitativa e metabolômica do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensis*, tolerante e susceptível ao déficit hídrico

O *E. grandis* x *E. camaldulensis* possui características favoráveis de adaptação à seca, conferidas pelo *E. camaldulensis* e qualidade da madeira para papel e celulose, conferida pelo *E. grandis*. Esta adaptação à seca está relacionada a fatores fisiológicos e também moleculares, expressos em sua proteoma e metaboloma, que se alteram na presença do estresse. Objetiva-se neste trabalho estudar as respostas fisiológicas, proteômicas e metabolômicas (metabólitos primários) diferencialmente expressos em folhas de *Eucalyptus* submetidas ao déficit hídrico. Dois genótipos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, sendo um tolerante (T) e um susceptível (S) ao déficit hídrico foram submetidos à 100% e 30% da capacidade de campo (CC), para as plantas bem irrigadas e as em déficit hídrico, respectivamente. Os tratamentos foram chamados de T100, T30, S100 e S30 para os diferentes genótipos, T e S, submetidos a diferentes CC, 100% e 30%. Estas plantas foram avaliadas fisiologicamente com auxílio do equipamento Infrared Gas Analyzer (IRGA). Foram empregadas técnicas de proteômica quantitativa, *label-free* e *shotgun*, através do uso de UPLC-MS^E. O estudo de metabolômica ocorreu através da utilização do GC x GC-TOF/MS. Os dados de proteômica foram processados no programa Protein Lynx Global Server (PLGS) e ExpressionE, através das análises comparativas S100 vs S30 e T100 vs T30, e dos metabólitos primários nos programas ChromaTOF e MetaboAnalyst. Foi possível observar que o T100 apresentou menor taxa fotossintética e condutância estomática do que o S100. Ambos os genótipos apresentaram taxas fotossintéticas e condutância estomática muito menores a 30% da CC do que a 100% da CC. A análise proteômica identificou um total de 397, 305, 366, 309 proteínas nos tratamentos S100, S30, T100 e T30 respectivamente. As análises comparativas por PLGS constataram que houve um aumento no número de proteínas diferencialmente expressas na presença do déficit hídrico. Cinco processos biológicos que apresentaram um aumento no número de proteínas diferencialmente expressas na presença do déficit hídrico foram: homeostase celular, fotossíntese, resposta ao estímulo abiótico, resposta ao estresse e morte celular. Três vias biológicas que apresentaram a participação de muitas enzimas identificadas, relacionadas a processos fotossintéticos, foram: fixação de carbono em organismos fotossintéticos, ciclo TCA e glicólise/gluconeogênese. O déficit hídrico diminuiu o número de proteínas diferencialmente expressas relacionadas ao processo metabólico de compostos contendo bases nucleares, regulação biológica e processo biossintético, que estão relacionados ao crescimento, desenvolvimento e manutenção dos processos vitais das plantas. Em relação à análise metabolômica foram identificados um total de 93, 94, 90 e 91 metabólitos primários nos tratamentos S100, S30, T100 e T30, respectivamente. Utilizando o programa Metaboanalyst, foi possível identificar os 15 metabólitos que mais contribuíram para a separação dos tratamentos, com maiores “VIP scores”, sendo alguns responsivos ao déficit hídrico. A via da purina e arginina foi identificada como a mais frequente dentre os metabólitos identificados com VIP score $\geq 1,5$.

Palavras-chave: Eucalipto; Seca; Estresse; Folha; Label-free; Proteínas; Metabólitos primários

ABSTRACT

Quantitative proteomics and metabolomics of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *E. camaldulensis*, tolerant and susceptible to drought stress

The *E. grandis* x *E. camaldulensis* has favourable characteristics of adaptation to drought, conferred by *E. camaldulensis* and quality of wood for pulp and paper, conferred by *E. grandis*. This adaptation to drought is related to physiological factors and also expressed in their molecular proteome and metabolome, which change in the presence of stress. The aim of this work was to study the physiological responses, proteomics and metabolomics (primary metabolites) differentially expressed in leaves of *Eucalyptus* under drought. Two genotypes of *E. grandis* x *E. camaldulensis*, a tolerant (T) and a susceptible (S) to drought stress, were subjected to 100% and 30% of field capacity (FC), for the well-watered plants and drought stressed plants, respectively. The treatments were called T100, T30, S100 and S30 for different genotypes, T and S, submitted to different FC, 100% and 30%. These plants were evaluated physiologically using the Infrared Gas Analyzer (IRGA). Label-free and shotgun quantitative proteomics were realized using UPLC-MS^E. The metabolomics study was carried out using GC x GC-TOF/MS mass spectrometer. The proteomics data were processed using the Protein Lynx Global Server program (PLGS) and ExpressionE program, through comparative analyses S100 vs S30 and T100 vs S30, and primary metabolites in ChromaTOF and MetaboAnalyst programs. It was observed that T100 had lower photosynthetic rate and stomatal conductance than S100. Both genotypes showed stomatal conductance and photosynthetic rates lower at 30% of FC than at 100% of FC. The proteomic analysis identified a total of 397, 305, 366, 309 proteins in the treatments S100, S30, T100 and T30 respectively. Comparative PLGS analyses showed an increase in the number of differentially expressed proteins under drought stress. The five biological processes that showed an increase in the number of differentially expressed proteins under drought stress were: cellular homeostasis, photosynthesis, response to abiotic stimulus, response to stress and cell death. The three biological pathways that had the participation of many identified enzymes, which are related to photosynthetic processes, were: carbon fixation in photosynthetic organisms, TCA cycle and glycolysis / gluconeogenesis. The drought reduced the number of differentially expressed proteins related to the metabolism of compounds containing nuclear bases, biological regulation and biosynthetic process, which were related to growth, development and maintenance of the vital processes of plants. The metabolomic analysis identified a total of 93, 94, 90 and 91 primary metabolites in the treatments S100, S30, T100 and T30, respectively. Using Metaboanalyst program, it was possible to identify 15 metabolites that contributed to the separation of treatments with higher "VIP scores", some of these are responsive to drought. The purine and arginine pathway was identified as the most frequent among the metabolites identified with VIP score ≥ 1.5 .

Keywords: *Eucalyptus*; Dry; Stress; Leaf; Label-free; Proteins; Primary metabolites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos fisiológicos induzidos ou reprimidos pelo estresse hídrico em plantas, conforme ZINGARETTI et al. (2013), com modificações	20
Figura 2 – Esquema do processo da fotossíntese. Obtida em < http://mriclassroom.weebly.com/photosynthesis.html > com modificações	27
Figura 3 - Representação dos elementos regulatórios (<i>cis-acting</i>) e fatores transcricionais envolvendo respostas aos estresses abióticos. Obtida em Lata et al. (2011), com modificações	32
Figura 4 – Interface entre metabolismo primário e secundário em plantas. Obtida em < http://www.ugr.es/~quiored/pnatu/secundario.htm > com modificações ...	35
Figura 5 - Respostas fisiológicas dos genótipos susceptível (S) e tolerante (T) de <i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i> a 30% e 100% da capacidade de campo (CC): (A) Taxa fotossintética, (B) Condutância estomática e (C) Taxa de transpiração	50
Figura 6 - (A) Diagrama de Venn (Oliveros, J.C. (2007-2015)) ilustrando a quantidade de proteínas identificadas em cada tratamento e as compartilhadas entre vários tratamentos; (B) Sumário do número de proteínas identificado	51
Figura 7 – <i>Heatmap</i> ilustrando o agrupamento dos tratamentos considerando a concentração de proteínas presente em folhas de genótipos susceptível (S) e tolerante (T) de <i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i> a 30% e 100% da CC. Barra à direita indica aumento (vermelho), redução (verde) e níveis sem mudanças significativas (preto) na expressão de proteínas	52
Figura 8 – Mudanças na regulação de proteínas em cada comparação pareada (A: S100 vs S30 e B: T100 vs T30)	53
Figura 9 - Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir das análises comparativas pareadas (A: S100 vs S30, B: T100 vs T30). Os processos biológicos foram obtidos através do software Blast2GO	57

Figura 10- Enzimas diferencialmente expressas na presença do déficit hídrico e identificadas nos cinco principais processos biológicos e a participação destas em três importantes vias metabólicas: A) Via de fixação de carbono em organismos fotossintéticos; B) Ciclo TCA e C) Glicólise / Gluconeogênese..... 77

Figura 11- Análise PLS-DA dos metabólitos de folhas de *E. grandis* x *E. camaldulensis* dos tratamentos S100, S30, T100 e T30..... 80

Figura 12- VIP score (Importância da variável em projeção) dos metabólitos: importantes fatores identificados por análise PLS-DA em uma ordem decrescente de importância. VIP scores $\geq 1,5$ foram considerados estatisticamente significativos. Altos valores de VIP scores indicam uma boa contribuição dos metabólitos para a separação dos grupos. As caixas à direita indicam uma concentração relativa do metabólito correspondente em cada grupo de estudo, as caixas pretas indicam uma maior abundância de determinado metabólito enquanto que a branca indica uma menor abundância 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à homeostase celular identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico	60
Tabela 2 – Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à fotossíntese, identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico	65
Tabela 3 – Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estímulo abiótico identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico	68
Tabela 4 – Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estresse identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico.....	69
Tabela 5 – Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à morte celular identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico	73
Tabela 6 - Sumário do número de metabólitos identificados por blocos e tratamentos	79
Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30	109
Tabela 8 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30	116
Tabela 9 – Descrição e informações dos metabólitos identificados nos diferentes tratamentos (ID: Identificação; RI: Índice do tempo de retenção; C: Componente).....	122

1 INTRODUÇÃO

A busca por maior produtividade no setor florestal tem demandado pesquisas à procura de materiais genéticos mais produtivos e adaptados às diferentes condições ambientais. Frequentemente, as plantas se encontram sob condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento (CAMBRAIA, 2005), sendo que a intensidade e os efeitos prejudiciais às mesmas dependerão da duração (FLEXAS et al., 1999) e da severidade dessas condições (FLEXAS et al., 2002), do estágio de desenvolvimento e do genótipo utilizado (TARDIEU e SIMONNEAU, 1998), dentre outros fatores (VELLINI et al., 2008).

Dos fatores ambientais que podem ocasionar estresse em uma planta tais como radiação solar, temperatura e disponibilidade hídrica (SOUZA et al., 2006), o último é o mais limitante para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (PAIVA et al., 2005), pois afeta as relações hídricas, alterando o metabolismo das plantas, causando grandes perdas em produtividade (NOGUEIRA et al., 2001). O estresse hídrico é a principal causa de perdas na produtividade agrônômica e florestal (VELLINI et al., 2008). Além disso, espera-se que os efeitos da seca aumentem com a mudança climática e com a crescente escassez de água (HARB et al., 2010) prejudicando ainda mais a produtividade das culturas. Na Figura 1 é possível observar alguns mecanismos fisiológicos que são induzidos ou reprimidos pela seca nas plantas (ZINGARETTI et al., 2013).

O efeito da deficiência hídrica sobre as plantas é complexo, não havendo um mecanismo universal de resistência à seca, pois as plantas respondem através de vários processos adaptativos à escassez de água como, por exemplo, por meio da capacidade de reduzir o potencial hídrico, aliada a adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas. Embora esses processos de resistência à seca sejam avaliados muitas vezes isoladamente, as espécies utilizam mecanismos associados para a sua sobrevivência em condições desfavoráveis de disponibilidade de água (NOGUEIRA et al., 2005).

A cultura do *Eucalyptus* é de extrema importância para o Brasil. É uma cultura cultivada em diferentes regiões do país servindo de matéria-prima para produção de papel e celulose, carvão vegetal, construção civil, bioenergia, óleo essencial, dentre outros. Além de sua importância estar refletida no número de empregos que seu cultivo gera, reflete-se também na área plantada com este gênero no Brasil, que

totalizou 5,56 milhões de ha em 2014, o que representa 71,9% da área total plantada com árvores neste país (informações disponíveis em <http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>).

Figura 1 - Mecanismos fisiológicos induzidos ou reprimidos pelo estresse hídrico em plantas, conforme ZINGARETTI et al. (2013), com modificações

O *E. camaldulensis* Dehn é apontado como sendo uma espécie adaptada à seca. Gonçalves e Passos (2000), por exemplo, estudaram os efeitos dos déficits hídrico e nutricional sobre o crescimento, partição de fotoassimilados e acúmulo de nutrientes, em mudas de cinco espécies de eucalipto (*E. pellita* F. Muell, *E. camaldulensis* Dehn, *E. citriodora* Hook, *E. cloeziana* F. Muell e *E. urophylla* St.

Blake) e estes autores concluíram que, sob déficit hídrico e menor nível de fósforo, o *E. camaldulensis* apresenta maior aumento na relação raiz/parte aérea e menor redução na produção de matéria seca total. Além disso, esta espécie foi apontada como a mais adaptada à seca dentre as cinco estudadas.

Já o *E. grandis* Hill ex Maiden é a espécie florestal mais plantada no Brasil devido ao seu potencial produtivo e às características da madeira. É utilizada para produção de celulose e papel, painéis de fibra e aglomerado, combustível industrial e doméstico e produtos de serraria (BARREIROS et al., 2007).

A produção de híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis* pode conferir características favoráveis de adaptação à seca e boas características da madeira para produção de papel e celulose, permitindo seu cultivo em áreas com baixa disponibilidade hídrica, além de gerar um produto madeireiro bastante interessante ao mercado brasileiro.

Na tentativa de melhor entender parâmetros fisiológicos e moleculares do híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis*, relacionadas à seca, almeja-se neste trabalho realizar um estudo das respostas fisiológicas, de proteômica e metabolômica de folhas de dois genótipos susceptível e tolerante ao déficit hídrico, submetidos à seca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cenário florestal mundial e o déficit hídrico

A população mundial recentemente alcançou sete bilhões de pessoas e a grande maioria destas, faz uso de produtos florestais sem ao menos perceberem como estes são importantes. Os produtos florestais estão presentes em estruturas de construções e materiais decorativos, mobílias, papéis gráficos, papéis de higiene, produtos farmacêuticos, cosméticos entre outras necessidades (REZENDE et al., 2014).

Segundo à FAO (2010 e 2011), a demanda global por produtos florestais irá aumentar, por diversos motivos como: o aumento da população mundial (existem previsões que indicam que a população mundial alcançará nove bilhões de pessoas em 2050); a diminuição da disponibilidade de madeira (a área de floresta global e disponibilidade de madeira, *per capita*, têm sido reduzida com o passar do tempo); o crescimento econômico, especialmente em economias emergentes; a globalização do mercado de produtos florestais (a China, a Índia e o Brasil estão dirigindo futuras demandas e investimentos de produtos florestais); mudanças climáticas, como o aumento de temperatura e tendências de escassez de água; políticas ambientais e energéticas, valorizando o potencial da madeira como fonte de energia renovável, com benefícios ambientais positivos; e por fim a grande demanda por alta qualidade e valor adicionado a produtos madeireiros certificados.

Considerando-se todo este cenário, as florestas plantadas se tornarão cada vez mais importantes. Aceitá-las e promovê-las seria um bom caminho para tratar o problema de escassez madeireira e evitar a extração ilegal de madeira de florestas nativas (FENNING e GERSHENZON, 2002).

A expansão das florestas de *Eucalyptus* é uma alternativa para este contexto, pois estas apresentam rápido crescimento, qualidade da madeira apropriada para diferentes usos, grande variabilidade e adequação para propagação vegetativa (REZENDE et al., 2014).

Segundo Bedon et al. (2012), estima-se que as plantações de *Eucalyptus* cubram aproximadamente 20 milhões de hectares ao longo de muitos países em várias partes do mundo incluindo, América do Sul, África do Sul, Ásia, Austrália e Europa Sul-Occidental (IGLESIAS e WISTERMANN, 2008). O gênero *Eucalyptus*

possui cerca de 900 espécies nativas da Austrália onde existe uma grande variedade de condições ambientais desde clima temperado úmido até zonas áridas quentes (BOLAND et al. 2006). Algumas espécies de *Eucalyptus*, consideradas como apresentando crescimento mais rápido em áreas tropicais e subtropicais, são as mais amplamente utilizadas em florestas cultivadas, representando assim uma importante fonte de madeira *hardwood* para diversas indústrias (KELLISON, 2001).

A seca é um fator limitante que pode prejudicar o desenvolvimento e produtividade do *Eucalyptus*. Foram identificados diversos mecanismos de escape à seca nesta espécie (WHITEHEAD e BEADLE, 2004). O déficit hídrico leva a alterações fisiológicas como mudança do teor relativo de água e potencial osmótico, e a ajustes morfológicos como alteração da área foliar e do crescimento das plantas. Estas modificações permitem às árvores manterem seu crescimento e suas trocas gasosas utilizando menores quantidades de água durante as estações secas. Todas estas modificações em decorrência da seca variam entre clones (PITA e PARDOS, 2001), procedências (LI et al., 2000 e TUOMELA, KOSKELA e GIBSON, 2001) e espécies (SCHULZE et al., 2006; MERCHANT et al., 2007).

Diversos autores apontam o solo e a disponibilidade de água atmosférica como grandes fatores limitantes para a produtividade em plantações de *Eucalyptus* (SHVALEVA et al., 2006; VILLAR et al., 2011). Estudos ecofisiológicos relataram que diferentes genótipos diferem em sua capacidade de lidar com a seca (VILLAR et al. 2011). Isto levou à prática atual de se considerar o desempenho de um determinado genótipo de planta sob variadas condições ambientais durante seu processo de desenvolvimento para a futura prática da seleção dos genótipos mais adaptados à determinados ambientes (CORREIA et al., 2014), que poderão passar a apresentar uma maior produtividade quando cultivado em um local satisfatório ao seu desenvolvimento.

Atualmente é possível encontrar muitos estudos focados em respostas moleculares de *Eucalyptus* submetido ao estresse hídrico, como no trabalho de Valdés et al. (2013). Estes novos estudos podem trazer respostas importantes que poderão ser utilizadas futuramente em processos de seleção de genótipos, ou trazer entendimento sobre as modificações internas que o déficit hídrico pode causar no *Eucalyptus* como, por exemplo, alterações metabólicas, protéicas e de expressão gênica.

2.2 Déficit Hídrico em plantas

2.2.1 Déficit Hídrico e expansão foliar

Com a diminuição do conteúdo de água da planta, suas células se contraem e as paredes afrouxam. Esta diminuição do volume celular resultará em uma menor pressão de turgor e aumento na concentração de solutos na planta. A redução do turgor é o efeito biofísico mais precoce e significativo do estresse hídrico e as atividades dependentes do turgor como expansão foliar e crescimento de raízes acabam sendo as mais sensíveis aos déficits hídricos (TAIZ e ZEIGER, 2006).

O estresse hídrico inibe a produção de matéria seca em razão dos seus efeitos inibitórios na expansão foliar, desenvolvimento foliar e consequentemente redução na interceptação de luz (NAM et al., 1998). Estes efeitos inibitórios podem trazer uma menor transpiração foliar, mantendo um suprimento de água por períodos mais longos.

Conforme Burssens et al. (2000) as expansões tanto celular como a foliar dependem de fatores bioquímicos e moleculares e dos fatores que controlam o fluxo de água. Uma forte evidência é que estas alterações são controladas por diversos processos, que incluem a síntese da parede celular, de membranas, divisão celular e síntese protéica.

Quando a planta já possui sua área foliar plena antes do início do estresse hídrico, irá ocorrer o fechamento estomático para a redução da evapotranspiração foliar (TAIZ e ZEIGER, 2006). Alterações reversíveis no volume da célula guarda proporcionam a abertura e o fechamento estomático que é o principal mecanismo que regula o controle das trocas gasosas entre a planta e o meio ambiente. O movimento estomático é facilitado pela atividade dos canais de íons e transportadores de íons encontrados na membrana citoplasmática e membrana vacuolar das células guarda. Durante o fechamento estomático, há uma redução no teor de soluto e do volume das células guarda, resultando na deflação e um estreitamento de sua abertura estomática. Alguns estudos têm elucidado as identidades moleculares de muitas proteínas de transporte das células guarda, e descrevem sua modulação por vários componentes de transdução de sinal celular durante a abertura e fechamento dos estômatos induzidos por estímulos ambientais e endógenos (PANDEY, ZHANG e ASSMANN, 2007).

2.2.2 Déficit hídrico e fotossíntese

A fotossíntese é um importante processo bioquímico que envolve a produção de glicose a partir da luz solar, água e dióxido de carbono, liberando oxigênio. Trata-se de uma série de complexas reações bioquímicas que ocorrem em plantas, algas, algumas bactérias e alguns fotoautótrofos. O ritmo da fotossíntese está relacionado com diversos fatores como a concentração de CO₂, temperatura, intensidade de luz solar e água. Esse processo gera energia a partir de fótons absorvidos, participando a água como um agente redutor (TAIZ e ZEIGER, 2006).

A água é extremamente importante no processo fotossintético, esta é responsável por fornecer elétrons para substituir aqueles que são removidos da clorofila no fotossistema II, produzir o oxigênio, bem como reduzir o NADP para NADPH (necessário para o ciclo de Calvin) ao liberar íons H⁺. A água fornece elétrons que se ligam aos átomos de hidrogênio (da sua própria molécula) para o carbono, do CO₂, formar a glicose (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Fotossíntese e crescimento celular são uns dos primeiros processos afetados pela seca. Os efeitos podem ser diretos, como a diminuição da disponibilidade de CO₂ causada por limitações da difusão através dos estômatos e mesófilo (FLEXAS et al., 2007) ou alterações no metabolismo fotossintético (LAWLOR e CORNIC, 2002) ou eles podem surgir como efeitos secundários como estresse oxidativo, muito presente em múltiplas condições de estresse (CHAVES e OLIVEIRA, 2004), e que pode afetar seriamente o maquinário fotossintético da folha (ORT, 2001).

Na Figura 2 é possível observar a importância da água e da luz para o fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII) e cadeia transportadora de elétrons na formação de ATP e NADPH que serão consumidos no ciclo de Calvin com a participação da *Ribulose-1,5-bisphosphate* (RuBP). A diminuição da disponibilidade de água resultaria em alterações em todo processo fotossintético da planta.

Figura 2 - Esquema do processo da fotossíntese. Obtida em <http://mriclassroom.weebly.com/photosynthesis.html> com modificações

A resposta fotossintética ao estresse hídrico é altamente complexa. Envolve a interação de limitações que ocorrem em diferentes locais da célula/folha e em diferentes escalas de tempo em relação ao desenvolvimento da planta. A intensidade, duração e taxa de progressão do estresse influenciam as respostas das plantas à escassez de água, pois ditam se irão ocorrer ou não os processos de mitigação associados à aclimação. Respostas de aclimação da planta sob déficit hídrico, que afetam indiretamente a fotossíntese, incluem aquelas relacionadas à inibição do crescimento ou queda de folhas, que ajudam a manter a condição hídrica da planta e, portanto, de assimilação de carbono por esta (CHAVES, FLEXAS e PINHEIRO, 2009).

O estresse hídrico diminui indiretamente a quantidade de fotoassimilados exportados das folhas. O transporte do floema depende do turgor e a redução do potencial hídrico no floema na presença do estresse pode levar à inibição do movimento de assimilados. Mas quando o estresse já inibiu fortemente processos como a fotossíntese, a translocação pode não ser afetada, permitindo a planta mobilizar e utilizar reservas necessárias, mesmo na presença de um estresse severo (TAIZ e ZEIGER, 2006).

2.2.3 Déficit hídrico e ajuste osmótico da planta

Quando o solo apresenta baixa disponibilidade hídrica, seu potencial mátrico (relacionado ao conteúdo de água do solo, sendo tanto menor quanto mais seco ele estiver (LIBARDI, 2005)) torna-se mais negativo e as plantas conseguem absorver água quando apresentam um potencial hídrico mais negativo do que o da água do solo. O ajuste osmótico pode levar à diminuição do potencial hídrico sem haver a diminuição do turgor ou volume celular. Este ajuste osmótico é um aumento líquido no conteúdo de soluto (como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos) por célula e independe das mudanças de volume resultantes da perda de água. O aumento da concentração de osmólitos no citosol pode ocorrer através da absorção de solutos ou ainda pela síntese de compostos orgânicos compatíveis com o metabolismo celular (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Esse aumento de solutos na célula, na tentativa de manter a absorção de água pela planta, pode causar um estresse osmótico na planta. Enzimas do citosol podem ser inibidas por concentrações altas de íons, prejudicando processos metabólicos essenciais. Assim o acúmulo de íons parece ficar limitado nos vacúolos, impedindo que os mesmos entrem em contato com enzimas no citosol ou organelas subcelulares. Outros solutos podem acumular-se no citoplasma, os solutos compatíveis (que não interferem nas funções das enzimas), como o aminoácido prolina, alcoóis de açúcar (como sorbitol e manitol), além de uma amina quaternária – a glicina betaína. Assim, rotas metabólicas que sintetizam solutos compatíveis são ativadas quando se faz necessário o aumento de solutos na célula. Estudos mostram que o ajuste osmótico promove a tolerância à desidratação (MCCREE e RICHARDSON, 1987). A expressão do gene que codifica a enzima *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* aumenta durante o estresse osmótico, provavelmente para permitir um aumento do fluxo de carbono em solutos orgânicos para o ajuste osmótico (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Outros genes regulados por estresse osmótico codificam proteínas associadas ao transporte de membrana, incluindo ATPases (NIU et al., 1995) e proteínas de canal de água, as aquaporinas (MAGGIO e JOLY, 1995). Muitos genes envolvidos na degradação de proteínas, como as proteases, são também induzidos como uma resposta adaptativa ao estresse salino e osmótico.

Segundo PANJABI-SABHARWAL et al., 2010) o estresse osmótico pode induzir genes envolvidos na:

- Síntese protéica, como as proteínas ribossomais e fatores de alongação;
- Modificações em proteínas, como os inibidores de proteases que podem estar envolvidos em reestruturação do complexo de síntese protéica;
- Regulação de genes envolvidos na defesa contra as ROS (espécies reativas de oxigênio), como a *glutathione-S-transferase* (GST) e a *ascorbato peroxidase* (APX) e outras toxinas induzidas pelo estresse;
- Reparação de proteínas e DNA;
- Proteção contra atividade enzimática, como as enzimas antioxidantes *glutathione redutase*, *dehydroascorbato redutase*, *glutathione peroxidase*, proteínas *heat shock*, as DnaJ e a protease Clp;
- Manutenção da homeostase osmótica como a LEA (*late embryogenesis abundant*) e as enzimas de síntese da trealose.

Proteínas LEA, por exemplo, são proteínas extremamente hidrofílicas, ligam-se fortemente à água, retendo-a, e foram identificadas pela primeira vez em plantas terrestres. Sua acumulação intracelular é fortemente correlacionada com a aquisição de tolerância à dessecação, e dados suportam que as proteínas LEA possuem a capacidade de estabilizar proteínas de membranas e outras proteínas durante a seca, especialmente na presença de açúcares como trealose (HAND et al., 2011).

Na ocorrência do déficit hídrico, o ABA é sintetizado pelas raízes e transportado pelo xilema para a parte aérea, onde inibe a expansão foliar e induz o fechamento estomático antes de alterações detectáveis no *status* de água foliar e nutricional (DODD, 2005; WANG et al., 2000).

2.2.4 Déficit hídrico e dissipação de energia das folhas

Muitas vezes o estresse hídrico em plantas vem acompanhado pelo estresse por calor, pois as plantas também utilizam a evapotranspiração foliar para regular a temperatura da folha. Possuindo uma menor quantidade de água para a evapotranspiração, na presença do déficit hídrico, haverá um menor controle da temperatura foliar que por sua vez poderá levar a um aumento no aquecimento foliar ou estresse por calor.

Uma quantidade substancial de energia é requerida para que a evaporação da água ocorra. A evaporação de água das superfícies molhadas das folhas pode dissipar uma grande quantidade de energia para balancear a entrada de energia da luz solar na folha. Sob condições incomuns, a perda de calor latente (necessário para que a água passe do seu estado líquido para o gasoso) pode exceder o ganho de calor radiante, resultando também em temperaturas foliares menores que a temperatura do ar. Assim, as trocas de calor entre a planta e o ambiente são importantes para o desenvolvimento da planta. Em determinados momentos, com a temperatura do ar elevada, pode ocorrer uma perda adicional de calor, por evaporação. A perda de calor latente é um importante componente de balanço de energia das folhas, minimizando o estresse por calor. O estresse por alta temperatura pode ser uma consequência da seca se as plantas não têm disponibilidade de água para resfriamento por evapotranspiração (SHARKEY e SCHRADER, 2006). O efeito combinado do estresse hídrico e calor em muitas culturas torna-se mais acentuado do que os efeitos causados por um destes estresses agindo individualmente (DREESEN et al., 2012; ROLLINS et al., 2013).

A murcha, que altera o ângulo da folha, podendo provocar o enrolamento foliar em algumas espécies, pode minimizar a intensidade da radiação solar na folha, minimizar a superfície exposta ao sol e consequentemente minimizar o estresse por calor (TAIZ e ZEIGER, 2006).

2.2.5 Papel dos fatores de transcrição e do ABA em respostas ao estresse abiótico

Conforme Lata et al. (2011) os fatores de transcrição (FTs) são proteínas que agem em conjunto com outros reguladores transcricionais, e que se ligam ao DNA possibilitando que haja assim uma ligação entre RNA-polimerase e DNA (UDVARDI et al., 2007), permitindo que ocorram os processos de transcrição e tradução. Genomas de plantas atribuem aproximadamente 7% da sua sequência de codificação para TFs, o que comprova a complexidade existente na regulação transcricional (UDVARDI et al., 2007). Os FTs interagem com elementos regulatórios (elementos *cis-acting*) nas regiões promotoras de muitos genes que estão relacionados às respostas ao estresse abiótico e, portanto, aumentam a regulação da expressão destes genes, resultando em eficiência na tolerância ao estresse

abiótico em plantas (AGARWAL e JHA, 2010). No genoma de *Arabidopsis thaliana* cerca de 1500 FTs estão descritos como estando envolvidos na expressão de genes responsivos ao estresse (RIECHMANN et al., 2000). Dados de transcriptoma em *Arabidopsis* e em muitas outras espécies de plantas sugerem que existem muitas vias que independentemente respondem aos estresses ambientais (de maneiras ABA-dependente e ABA-independente), sugerindo que a tolerância ao estresse seja controlado ao nível transcricional por uma rede genética regulatória extremamente complexa (Figura 3) (UMEZAWA et al., 2006). O fito-hormônio ABA é o regulador central do estresse abiótico particularmente no caso de plantas tolerantes ao estresse hídrico, e está relacionado à regulação de uma rede complexa de genes permitindo que as plantas possam tolerar a diminuição da disponibilidade hídrica (CUTLER et al., 2010).

O sistema de sinalização ABA-dependente tem sido ilustrado como via que media a adaptação ao estresse por indução de pelos menos duas regulações, um grupo de genes controlados por um determinado FT: (1) o domínio AREB/ABF (*ABA-responsive element-binding protein* / *ABA-binding factor*) e (2) o domínio MYC (*myelocytomatosis oncogene*) / MYB (*myeloblastosis oncogene*) (SAIBO et al., 2009). Enquanto os domínios ABA-independente são: (1) o domínio CBF/DREB e (2) o domínio NAC (NAM, ATAF e CUC) e ZF-HD (*zinc-finger homeodomain*) (NAKASHIMA et al. 2009; SAIBO et al., 2009). Entretanto muitos estudos identificaram a existência de ambas as vias ABA-dependente e ABA-independente de resposta ao estresse que funcionam através dos membros da família AP2/EREBP (ERF) (KIZIS e PAGÉS, 2002). Em adição a estas vias bem conhecidas, um grande número de outros FTs esta também envolvido em respostas ao estresse abiótico, desempenhando assim um papel crucial na transmissão de tolerância ao estresse em plantas. Embora estes diferentes FTs responsivos ao estresse geralmente ajam independentemente, é sem dúvida possível que algum nível de interferência exista entre eles.

Figura 3 - Representação dos elementos regulatórios (*cis-acting*) e fatores transcricionais envolvendo respostas aos estresses abióticos. Obtida em Lata et al. (2011), com modificações

2.3 Proteômica

A proteômica é um estudo em larga escala da estrutura e função das proteínas contidas em uma amostra biológica complexa. Esta abordagem tem um valor potencial para compreender a natureza complexa de um organismo (CHANDRAMOULI e QIAN, 2009). A análise proteômica é capaz de identificar e quantificar um grande número de proteínas, a fim de gerar a identificação de diferentes e importantes vias biológicas (WILKINS et al., 1996; CAPUANO et al., 2011).

Segundo Mirzaei et al. (2012), a técnica tradicional 2D-PAGE foi o primeiro método utilizado para estudos de proteômica quantitativa em diferentes espécies submetidas a estresses ambientais, particularmente o estresse hídrico, incluindo arroz (SALEKDEH et al., 2002; ALI e KOMATSU, 2006; MIRZAEI et al., 2012), milho (VINCENT et al., 2005), beterraba açucareira (HAJHEIDARI et al., 2005), banana (CARPENTIER et al., 2007), alfafa (ARANJUELO, et al., 2011), e trigo (BAZARGANI et al., 2011). No entanto, certas limitações da técnica 2D-PAGE são inegáveis, como

por exemplo, a baixa representação de proteínas com pontos isoelétricos extremos, massas moleculares muito pequenas ou muito grandes, baixa solubilidade de proteínas com membranas hidrofóbicas e baixa abundância de proteínas, o que dificulta a identificação da proteína. Assim, alternativas técnicas de proteômica quantitativa tais como marcação com isótopo estável, assim como livre de marcação (*label-free*) têm sido utilizadas por diversos grupos. Entre essas técnicas, a quantificação *label-free* baseada na contagem espectral tornou-se bastante eficiente para uso em estudos de estresse ambiental e que envolvem a comparação de múltiplas variáveis tais como seca (MIRZAEI et al., 2012), estresse por calor (GAMMULLA et al., 2010 e 2011) e frio (NEILSON et al., 2011).

O método de quantificação *label-free* utilizado em espectrometria de massas esta ganhando mais popularidade pela facilidade de uso e pelo fato de poder ser integrado em diferentes fluxos de trabalho sem qualquer esforço extra ou custo. Na quantificação *label-free*, as amostras de interesse são preparadas e analisadas separadamente. Este método pode ser dividido em duas categorias: a quantificação por intensidade do pico do peptídeo e a quantificação por contagem espectral que depende do número de peptídeos identificados em uma determinada proteína (ARIKE e PEIL, 2014).

Outra importante tecnologia que pode ser somada à *label-free* e que compensa as fraquezas da técnica 2D-PAGE é a *Shotgun*. Nesta abordagem, as proteínas totais em amostras complexas são digeridas e os peptídeos digeridos obtidos são separados por cromatografia unidimensional ou multidimensional e introduzidos em um espectrômetro de massa em *tandem*. Desde que a técnica de *shotgun* começou a ser utilizada como estratégia primária em proteômica, ao invés da 2D-PAGE, um grande número de metodologias relacionadas foi desenvolvido (KUBOTA, KOSAKA e ICHIKAWA, 2009), incluindo os estudos em plantas submetidas ao déficit hídrico.

Segundo Bedon et al. (2012) a análise de proteômica auxilia no descobrimento dos componentes moleculares chaves do estresse abiótico (TIMPERIO et al., 2008). Em plantas perenes, a proteômica relacionada ao déficit hídrico tem considerado, principalmente, o populus, uma árvore modelo (XIAO et al. 2009; BONHOMME et al. 2009a,b; YANG, WANG e MIAO 2010). Estes estudos concentraram-se na proteômica de folha, pois esta representa a principal interface ativa entre o ambiente atmosférico e a planta.

Freqüentemente, dois ou mais genótipos contrastantes em relação aos seus parâmetros fisiológicos são expostos a diferentes tratamentos de umidade do solo, realçando assim a plasticidade molecular de pequenos conjuntos de proteínas específicas do genótipo (XIAO et al. 2009; BONHOMME et al. 2009a,b; YANG, WANG e MIAO 2010).

É possível observar alguns estudos de proteômica em *Eucalyptus*, com abordagem 2-DE, como por exemplo, o trabalho de Valdés et al. (2013) que estudou a tolerância à seca em *E. globulus* avaliando caracteres morfológicos, fisiológicos e de proteômica, mas poucos são os estudos que utilizaram *label-free* e *shotgun*. Trabalhos que utilizam estas abordagens se concentram em arroz (LEE e KOH, 2011; KIM et al., 2015), *Populus* (KALLURI et al., 2009), *Arabidopsis thaliana* (NIEHL et al. 2013), *Nicotiana attenuata* (WEINHOLD et al., 2015) e uva (GEORGE, et al., 2015).

Apesar das importantes respostas que a proteômica pode nos trazer e dos grandes avanços já obtidos com esta técnica, ainda existem limitações nas análises que estão relacionadas à complexidade das estruturas biológicas e processos fisiológicos, tornando o caminho da exploração pavimentada com várias dificuldades e armadilhas. A grande quantidade de dados que é adquirido com as novas técnicas também gera novos desafios no processamento e análise dos mesmos (CHANDRAMOULI e QIAN, 2009).

2.4 Metabolismo primário

Define-se metabolismo como sendo a soma das relações anabólicas e catabólicas das estruturas celulares, ou seja, o total de modificações das moléculas orgânicas nas células vivas, sendo tais modificações catalisadas por enzimas (NELSON e COX, 2002). O metabolismo vegetal é geralmente dividido em metabolismo primário e metabolismo secundário, no entanto, não há uma divisão exata entre estes pois qualquer mudança no metabolismo primário afeta diretamente o metabolismo secundário (SALGADO, 2009; DELBONE, 2010), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Interface entre metabolismo primário e secundário em plantas. Obtida em <<http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/secundario.htm>>com modificações

O metabolismo primário vegetal forma elementos chamados de metabólitos primários, indispensáveis à vida celular, como por exemplo, carboidratos, proteínas, lipídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos, cuja formação se dá diretamente a partir das vias fotossintéticas e respiratórias (FÁVERO e PAVAN, 1997).

Já o metabolismo secundário vegetal, por meio de diversas rotas metabólicas e de substâncias formadas no metabolismo primário, forma uma grande variedade de compostos orgânicos, os quais recebem o nome de metabólitos secundários. Nas plantas, o metabolismo secundário, está relacionado a diversas funções, como defesa contra patógenos, atrativo de polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes, alelopatia, função estrutural, dentre outros (DELBONE, 2010).

A metabolômica permite o estudo do metabolismo de um organismo que se encontra sob determinada perturbação genética e/ou ambiental (FIEHN, 2002; OLIVER, 1997).

As determinações metabólicas podem reportar o *status* de um organismo (ou célula ou tecido) que, por sua vez, podem estar relacionadas ao seu fenótipo, mesmo sabendo que, em termos práticos, a relação entre metabólitos-fenótipo não

seja, normalmente, tão simples. Uma segunda vantagem é que a metabolômica pode descobrir relações inesperadas e respostas ao nível de metabólitos, que por si só pode levar à geração de hipóteses (BUNDY et al., 2009) ou ainda pode trazer algumas respostas.

A metabolômica encontra-se em crescente número de aplicações nas ciências ambientais, variando desde o entendimento de respostas do organismo a estresses abióticos como temperatura, seca e poluição ou ainda para investigar interações biótico-biótico como em casos de infecção e herbivoria (BUNDY et al., 2009).

A disponibilidade de água pode afetar a salinidade do solo e um aumento desta salinidade pode resultar em alterações em uma gama de produtos metabólicos, com função direta relacionada à osmorregulação (SANCHEZ et al., 2008). Johnson et al. (2003) e Smith et al. (2003) têm mostrado diferenças globais de metabólitos em plantas de tomate submetidas a tratamentos salinos. Entender a base metabólica da resistência à seca em plantas é de grande importância, pois isso poderá ajudar em diversas questões como as relacionadas às mudanças climáticas, disponibilidade de água no solo e manejo de áreas para permitir um bom desenvolvimento e reprodução das plantas (CHAVES et al., 2003).

Mudanças no metabolismo de plantas de *Lupinus albus*, que passaram previamente por estresse hídrico e foram posteriormente re-hidratadas, foram detectadas, incluindo alterações na abundância de carboidratos e aminoácidos (PINHEIRO et al., 2004). Semel et al. (2007) também estudaram o efeito da seca em tomates e observaram que o híbrido entre um tipo comercial vs. uma variedade selvagem foi mais tolerante à seca do que o controle comercial. O fenótipo metabólico do híbrido bem irrigado foi similar às mesmas plantas em estresse hídrico, ou seja, o híbrido não sofreu muitas alterações na presença do déficit hídrico, e com isso os autores concluíram que a variedade selvagem, assim como seu híbrido, pode ser metabolicamente mais adaptada a condições de seca do que o controle comercial.

Em estudos conduzidos em campo, Llusia et al. (2008) avaliou se a manipulação da disponibilidade de água afetaria as taxas de isoprenóides, importantes para polinização e anti-herbivoria, em formações arbustivas mediterrânicas. Houve um efeito específico para determinadas espécies submetidas a condições de seca, como no caso da espécie *Erica multiflora* que diminuiu seus

níveis de emissões de isopreno enquanto que as espécies *Globularia alypum* e *Pinus halepensis* aumentaram suas emissões de terpenos.

Estudos com *Eucalyptus* nesta área são relativamente escassos e recentes. No trabalho desenvolvido por Warren et al. (2011) verificou-se que o estresse hídrico afeta múltiplos aspectos do metabolismo do *Eucalyptus*, como partição de carbono, fotorrespiração, desvio do GABA (*Gamma-Amino Butyric Acid*), metabolismo de fenilpropanóides e de várias classes de compostos, como carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos.

Shvaleva et al. (2006) estudaram as respostas metabólicas ao déficit hídrico em folhas e raízes de dois clones de *Eucalyptus globulus* que contrastavam em relação à sensibilidade à seca e observaram um aumento na concentração de açúcares solúveis e prolina nestes dois órgãos na presença do déficit hídrico.

3 OBJETIVOS

Neste estudo, objetivou-se estudar os efeitos fisiológicos e moleculares que o estresse hídrico ocasiona em genótipos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, tolerante (T) e susceptível (S) ao déficit hídrico. Foi realizado o monitoramento dos parâmetros de trocas gasosas como taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração em genótipos T e S que foram submetidos a diferentes disponibilidades hídricas, 30% e 100% da capacidade de campo (CC), para as plantas em déficit hídrico e para as plantas bem irrigadas, respectivamente. Foram realizadas análises comparativas entre os tratamentos, ao nível de proteínas e metabólitos primários de folhas, para observar as respostas diferencialmente expressas entre os tratamentos na presença do déficit hídrico. As análises comparativas foram realizadas entre os 2 tratamentos (estresse hídrico e bem irrigado) e os 2 genótipos (susceptível e tolerante ao déficit hídrico) e estão detalhadas abaixo:

- i. Genótipo susceptível bem irrigado (S100);
- ii. Genótipo susceptível em estresse hídrico (S30);
- iii. Genótipo tolerante bem irrigado (T100);
- iv. Genótipo tolerante em estresse hídrico (T30).

Objetivou-se também identificar algumas proteínas e metabólitos responsivos ao estresse hídrico, assim como identificar os mais relevantes processos biológicos e importantes vias metabólicas mais afetados durante o estresse por déficit hídrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas e fase de seleção

Sementes do híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis* foram fornecidas pela empresa Suzano Papel e Celulose e semeadas em tubetes preenchidos com uma mistura do composto Basaplant® farelado grosso e vermiculita textura média (2:1). As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação a 30 °C, localizada no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Os tubetes permaneceram em casa de vegetação, durante o período de desenvolvimento dos genótipos. Mudas de 88 genótipos foram obtidas e quando estas atingiram altura aproximada de 15 cm, foram transferidas para vasos de 3 litros preenchidos com a mesma mistura de substrato citada acima. Os vasos foram fertilizados semanalmente com 5 ml de solução nutritiva de Kristalon® White (NPK: 15-05-30), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e Tenso-Fe® (FeEDDHMA-6% Fe) (20:20:0,8). Após manutenção das plantas primeiramente em 40% da CC (indução de seca, conforme LIBARDI, 2005) por 3 semanas, foram analisados os sintomas visuais das plantas relacionados com a velocidade de murchamento foliar e turgor. Os 88 genótipos foram classificados de acordo com aqueles que apresentaram o murchamento mais rápido até os que apresentaram murchamento mais lento. Desta classificação, 10 genótipos foram aleatoriamente selecionados e utilizados para compor o delineamento experimental de blocos casualizados, no esquema fatorial 10 x 2 (genótipos x regimes hídricos), com 3 repetições. Após esta seleção, as irrigações foram controladas em 30% da CC, de acordo com Libardi (2005), para as plantas sob estresse hídrico e 100% da CC para as plantas bem irrigadas. As plantas foram mantidas nestas condições por 2 semanas. O genótipo que não apresentou sintomas visuais relacionados à seca foi selecionado como o mais tolerante e o genótipo que apresentou os sintomas mais severos foi classificado como o mais susceptível. Esta seleção, baseada em sintomas visuais, foi repetida 4 vezes até a definitiva identificação dos genótipos tolerante e susceptível.

4.2 Medições de trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas das folhas como taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração foram medidos através do uso do *Infrared Gas Analyzer* - IRGA (Li-6400, LI-COR, Biosciences Inc., Nebraska, USA) nas 3 plantas de cada genótipo selecionado. As medições foram realizadas nas folhas localizadas na altura média das plantas, sendo que cada planta teve duas folhas mais próximas analisadas.

Os parâmetros de trocas gasosas foram obtidos pela média das curvas de respostas à luz de acordo com o aumento dos valores da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As medições foram realizadas entre 9 am e 11:20 am. A referência de CO_2 foi estabelecida a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e a referência de água entre 18 e 20 mmol mol^{-1} . O fluxo de CO_2 foi estabelecido a 350 $\mu\text{mol s}^{-1}$.

4.3 Extração e digestão de proteínas

Amostras de folhas das 3 repetições biológicas de cada genótipo foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em -80°C .

Proteínas totais foram extraídas de acordo com Hurkman e Tanaka (1986) com algumas modificações. Folhas (1 g) foram maceradas em nitrogênio líquido até completa pulverização, seguido de uma homogeneização, a 4°C , por 30 min, em 15 ml de tampão de extração (0,5 M Tris HCl, pH 7,5; 0,1 M KCl; 0,05 M EDTA; 0,7 M sacarose; 2% v/v 2-mercaptoetanol; 2 mM PMSF; 1% w/v *polivinilpirrolidona*). O mesmo volume de fenol saturado com Tris HCl pH 8,0 foi adicionado à amostra. Após 30 min de agitação a 4°C , as fases foram separadas por centrifugação (10.000 g, 30 min, 4°C). A fase fenólica foi recuperada e reextraída com um volume igual de tampão de extração. Proteínas foram precipitadas da fase fenólica pela adição de 0,1 M de acetato de amônio em 100% MetOH e mantidas, por 16 h a -20°C . Posteriormente foram centrifugadas (16.000 g, 30 min, 4°C). O *pellet* foi lavado três vezes com 0,1 M de acetato de amônio em 100% MetOH e uma vez em 15 ml de acetona gelada (100%), mantido a -20°C por 2 h, seguido pela centrifugação (16.000 g, 30 min, 4°C). O *pellet* resultante foi seco e solubilizado em 800 μL de tampão TCT através de vigorosa agitação com *vortex* (7 M urea, 2 M tiourea, 10 mM DTT

(ditiotretol) e 0,1% (v/v) Triton X-100). As proteínas extraídas foram dessalinizadas com filtros Amicon® Ultra-0,5 mL 3K-NMWL (Millipore).

A concentração da proteína foi determinada conforme Bradford (1976) e confirmada por eletroforese SDS PAGE. Amostras de proteínas (50 µg) foram desnaturadas com 25 µL de 0,2% *RapiGest* SF (Waters) a 80 °C, por 15 min; reduzidas com 2,5 µL de 100 mM DTT (GE Healthcare) a 60 °C, por 30 min; alquiladas com 2,5 µL de 300 mM iodoacetamida (GE Healthcare), à temperatura ambiente, por 30 min no escuro, e enzimaticamente digeridas com tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) na razão 1:100 (w/w) enzima:proteína. Após digestão, 10 µL de ácido trifluoroacético (5%), preparado em H₂O, grau MS, foi adicionado à amostra. As amostras digeridas foram então incubadas a 37 °C por 90 min, para hidrolisar o *RapiGest*. Após digestão, a mistura de peptídeos foi dessalinizada com o uso de ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18 (Millipore), conforme instruções do fabricante. O volume final de 50µL foi obtido pela adição de solução de formato de amônio (20 mM pH 10), contendo padrão interno (Fosforilase de coelho (P00489) a 1 pmol.µL⁻¹).

4.4 Extração de metabólitos

A extração de metabólitos foi realizada conforme descrito por Hoffman et al. (2010) com algumas modificações. As amostras de folhas (50 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido até completa pulverização. Estas foram homogeneizadas em 1 mL do tampão de extração MeOH:clorofórmio:H₂O (3:1:1) com auxílio de um moinho de bola: MM 301 Vibration Mill (Retsch GmbH & Co.KG, Haan, Germany) na frequência de 20 Hz s⁻¹ por 40 s e duas esferas de 3 mm de carboneto de tungstênio (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany) por tubo, para aumentar a eficiência da extração. Posteriormente as amostras foram sonicadas em um sonificador (modelo Unique Ultra Cleaner 1600A), por 15 min, a 4 °C e centrifugadas em centrífuga Eppendorf (Allegra™64R, Beckman, German), por 10 min a 4 °C e 16.000 *g*. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado com filtro de membrana PVDF com tamanho do poro de 0,22 µm e posteriormente, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um *vial* e 10µL de cada padrão interno (1mg.mL⁻¹) foi adicionado (ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – ¹³C₄), ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5) e ácido mirístico (1, 2, 3 – ¹³C₃, 99% - CLM 3665- 0.5)). Em seguida, as amostras foram

secas em concentrador Eppendorf 5301 (Eppendorf, Germany), por 2 h. As amostras foram derivatizadas com 30 μL de metoxi-amina-hidroclorada (15 mg mL^{-1}) em piridina, por 14 h, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram trimetilsililadas pela adição de 30 μL de MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) com 1% TMCS (trimetilclorosilano) e mantidas por 1h à temperatura ambiente. Após sililação, um volume de 30 μL de heptano foi adicionado.

4.5 Identificação por espectrometria de massas das proteínas

Os peptídeos foram separados por cromatografia reversa em cromatógrafo líquido de ultraperformance (2D Technology nanoACQUITY-Waters, Manchester, UK). A separação de primeira dimensão foi efetuada na coluna XBridge BEH130 C18 5 μm 300 μm x 50 mm (Waters, Manchester, UK). A eluição foi realizada utilizando-se 5 gradientes binários diferentes com 20 mM de formiato de amônio em acetonitrila (pH 10). Os peptídeos eluídos da coluna de primeira dimensão foram retidos na coluna Symmetry C18 5 μm 180 μm x 20 mm (Waters, Manchester, UK) e diluídos, *online*, com acetonitrila com 0,1% ácido fórmico, na taxa de fluxo de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$. A separação de segunda dimensão foi realizada na coluna HSS T3 1,8 μm 75 μm x 100 mm (Waters, Manchester, UK), utilizando-se um gradiente binário de 3 a 85% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, durante 52 min, e fluxo de 350 nL min^{-1} .

A aquisição da espectrometria de massas foi obtida no espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS Waters equipado com uma célula de mobilidade iônica e uma fonte *NanoLockSpray* operando no modo íon positivo e 'V' (Waters, Manchester, UK). O íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$) foi utilizado para calibração inicial *single-point* e íons fragmentados MS/MS de 200 fmol mL^{-1} Human (Glu¹)-fibrinopeptide B (GFP) foram utilizados para calibração final do instrumento. Experimentos foram realizados em MS^E (análise independente de dados) com aquisição alternada entre baixa (3 eV) e elevada energia de colisão (15–50 eV), aplicada ao módulo trap do 'T-wave' CID preenchida com argônio, que induz os íons precursores e produtos em sequência. Utilizou-se um tempo de varredura de 0,8 s para baixa e alta energia de varredura no intervalo m/z entre 50 e 2000 (SILVA et al., 2006).

4.6 Identificação por espectrometria de massas dos metabólitos primários

As amostras de metabólitos foram analisadas como descrito por Gullberg et al. (2004) com auxílio do espectrômetro de massas Pegasus 4D time-of-flight, GC-TOF/MS (LECO, St. Joseph, MI, USA). Utilizou-se uma série de alcanos como controle (C_{12} - C_{40}) para o cálculo do índice de retenção (SCHAUER et al., 2005). As amostras derivatizadas (1 μ L) foram automaticamente injetadas, no modo *splitless*, com auxílio de um CombPal-xt Autosampler (Leap Technologies, CTC Analytics AG, Switzerland), acoplado a um cromatógrafo gasoso (7890A Agilent Technologies) equipado com duas colunas de sílica fundida. A primeira dimensão da coluna (DB 5-Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) foi de 20 m de comprimento x 0,18 mm de diâmetro interno x 0,18 μ m de espessura da película, e a segunda dimensão da coluna (RXT-17, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) foi de 0,84 m de comprimento x 0,10 mm de diâmetro interno x 0,10 μ m da espessura da película. A temperatura do injetor foi de 280 °C, com fluxo de 20 mL min⁻¹, iniciado após 250 s e após o início da aquisição de dados e a taxa de fluxo de gás através da coluna foi 1 mL min⁻¹. A temperatura da primeira coluna foi mantida a 80°C durante 2 min, em seguida aumentou 15 °C min⁻¹ até 305 °C, e esta foi mantida por 10 min. A temperatura da segunda coluna foi mantida a 85 °C por 2 min, em seguida aumentou 15 °C min⁻¹ até 310 °C, e esta foi mantida por 10 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do GC x GC-TOF/MS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph). A linha de transferência e a temperatura da fonte de íons foram de 280 e 250°C, respectivamente. Os íons foram gerados por um feixe de elétrons de 70-eV com uma corrente de ionização 2.0 mA, 20 espectros s⁻¹ foram registrados na faixa de massa 45-800 m/z e a voltagem do detector foi de 1500 V.

4.7 Pesquisas em bancos de dados e análise estatística dos dados de proteômica

Para identificar e quantificar as proteínas, as intensidades dos espectros foram calculadas por método estequiométrico, tendo como referência o padrão interno, por análise MS^E (SILVA et al., 2006). O processamento dos espectros, a pesquisa em banco de dados e as análises comparativas de expressão foram realizadas no software ProteinLynx Global Server v.2.5 (PLGS) (Waters Corporation,

Manchester, UK) com o banco de dados de sequências do genoma de *Eucalyptus grandis* (acessado em 29 de Julho de 2015 com 46.280 acessos fornecidos) (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Egrandis_er) (BARTHOLOMÉ et al., 2005). As duas análises comparativas de expressão desenvolvidas no software PLGS foram: (i) S100 versus (vs) S30 (genótipo suscetível a 100% da CC vs 30% da CC) e (ii) T100 vs T30 (genótipo tolerante a 100% da CC vs 30% da CC). Os valores dos dados de expressão PLGS 2.5.1 de $p \leq 0,05$ e $p \geq 0,95$ foram considerados estatisticamente significativos para proteínas que apresentaram um aumento ou diminuição da sua expressão pelo tratamento em déficit hídrico, respectivamente, ou ainda expressão similar para $0,05 < p < 0,95$, entre os dois tratamentos, 100% e 30% da CC.

Os parâmetros de processamento utilizados foram: tolerância automática para íons precursores e produtos, mínimo de 3 íons de fragmentos correspondentes por peptídeo, mínimo de 7 fragmentos de íons combinados por proteína, mínimo de 2 peptídeos combinados por proteína, 1 possível clivagem perdida permitida, 1 possível clivagem perdida de tripsina, Carbamidometil-C como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável, e um máximo *false positive discovery rate* (FDR) de 4%, que foi determinado com base na procura de uma base de dados invertida, gerada automaticamente pelo software PLGS 2.5.1, pela inversão da sequência de cada entrada.

A abundância (*fmols*) e a sequência dos peptídeos combinados e das proteínas foram obtidas. Todos os acessos das proteínas foram identificados no banco de dados com uma confiança $\geq 95\%$ e os acessos invertidos foram excluídos da análise. O software Mass Pivot101.jar (MURAD e RECH, 2012) foi também utilizado para auxiliar na análise de dados quantitativo de cada proteína identificada. Este programa permite a determinação da quantidade média de proteínas (em *fmol*) presente em um grupo de estudo.

As sequências de proteínas combinadas com peptídeos ionizados foram funcionalmente categorizadas. As ontologias genéticas (GO) (ASHBURNER et al., 2000) (<http://www.geneontology.org>) foram obtidas utilizando-se o software Blast2GO (CONESA et al. 2005) considerando-se os parâmetros padrões especificados pelo programa (Filtro do E-Value do Hit 1.0E-6, Limiar de anotação 55, Peso do GO 5, Cobertura de corte do Hsp-Hit 20). As anotações foram previamente simplificadas utilizando-se os recursos do programa GOSlim.

O número total de proteínas e peptídeos foram identificados por repetição e tratamento. O agrupamento hierárquico foi realizado com auxílio do programa Metaboanalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (XIA et al., 2009). O resultado do agrupamento das proteínas está ilustrado em *heatmap*, considerando-se como medida de similaridade a distância euclidiana e como algoritmo de agrupamento o Ward's linkage.

4.8 Pesquisas em bancos de dados e análise estatística dos dados de metabolômica

O *software* LECO ChromaTOF v.2.21 (LECO, St. Joseph, MI, USA) foi utilizado para o processamento dos dados de metabolômica obtidos por cromatografia gasosa, que compreende na obtenção dos valores correspondentes do espectro de massas, execução da correção da linha de base e exportação dos arquivos para o formato netCDF. A detecção de pico, alinhamento do tempo de retenção e identificação da biblioteca correspondente foram realizadas com o uso do *software* TargetSearch (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009). Os metabólitos foram selecionados por comparação dos seus índices de retenção (± 2 s) e espectro (similaridade > 600) com os compostos armazenados na base de dados Golm-Metabolome-Database (GMD) (KOPKA et al., 2005). A matriz contendo os dados foi levada para o programa Metaboanalyst 3.0 (XIA et al., 2009), para a análise estatística dos dados, incluindo ajustes como: transformação logarítmica, *pareto scaling* e normalização dos dados pela mediana, assim como as análises dos dados através dos mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA).

Importância da variável em Projeção (VIP) é uma soma ponderada dos mínimos quadrados parciais (PLS) carregados, considerando-se a quantidade de variação Y- explicada em cada dimensão. Os VIP scores dos metabólitos foram calculados com auxílio do Metaboanalyst 3.0. Somente variáveis com valores de VIP maiores que 1,5 foram considerados como os mais influentes para o modelo. Os VIP scores dos PLS-DA foram utilizados para identificação dos metabólitos que contribuíram para a separação dos grupos. O mapeamento das vias metabólicas foi obtido por meio da ferramenta Metaboanalyst 3.0 (XIA et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Respostas fisiológicas ao déficit hídrico: medições de trocas gasosas

As características fisiológicas de respostas à seca dos genótipos T e S de *E. grandis* x *E. camaldulenses* foram estudadas através da comparação das curvas de respostas obtidas quando as plantas foram submetidas a 100% e 30% da CC.

Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas. O genótipo T apresentou uma menor taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração a 100% da CC quando comparado ao genótipo susceptível. A 30% da CC, ambos os genótipos apresentaram similaridade, apresentando uma taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração menores que as plantas em 100% da CC (Figuras 5A, 5B e 5C).

Conforme Flexas et al. (2007), as medições de trocas gasosas, realizadas com o IRGA, provaram ser úteis para desenvolver modelos de previsão de assimilação de CO₂ para diferentes culturas (DÍAZ-ESPEJO et al., 2006) e vegetações naturais (XU e BALDOCCHI, 2003) ajudando a prever os efeitos das mudanças climáticas sobre a fotossíntese (SABATÉ et al., 2002), ou trazendo uma base fisiológica sólida para a possível ampliação dos estudos em folha para modelos de assimilação de carbono em plantas e / ou ecossistemas inteiros (WOODWARD et al., 1995), e para avaliar a influência de vários tipos de estresses, como seca (WILSON et al., 2000), salinidade (CENTRITTO et al., 2003), temperaturas elevadas (ZHOU et al., 2004), as restrições de luz (SCHULTZ, 2003), deficiência nutricional (WARREN, 2004) ou o estresse biótico (SAMPOL et al., 2003) na capacidade fotossintética.

As respostas das plantas às mudanças nas condições hídricas estão relacionadas a muitos aspectos ao nível molecular, bioquímico e fisiológico. A seca pode causar uma diminuição na abertura estomática da planta, que pode ocorrer através da sensibilidade física ou de sinais químicos como a pressão hidráulica ou o ABA. A taxa de transpiração de água e a taxa fotossintética limitadas devido ao declínio da condutância estomática em um estresse hídrico progressivo, leva a um aumento da eficiência do uso da água, porque a transpiração é inibida mais do que a fotossíntese. A seca severa resulta em uma diminuição da eficiência fotoquímica e da atividade da RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) (EC

4.1.1.39), que devem reduzir a taxa fotossintética líquida a zero. Simultaneamente, outras rotas metabólicas são alteradas, incluindo a peroxidação que pode ser exacerbada levando a uma redução na taxa de crescimento das plantas (XU, ZHOU e SHIMIZU, 2010).

Figura 5 - Respostas fisiológicas dos genótipos susceptível (S) e tolerante (T) de *E. grandis* x *E. camaldulensis* a 30% e 100% da capacidade de campo (CC): (A) Taxa fotossintética, (B) Condutância estomática e (C) Taxa de transpiração

5.2 Proteínas globais identificadas em cada tratamento

Por meio da técnica de proteômica *label-free shotgun* foi possível identificar 523 proteínas, distribuídas entre os 4 tratamentos (Figura 6A). O maior número de acessos de proteínas foi identificado no tratamento S100 (397 proteínas), seguido

por menores quantidades que foram identificadas nos tratamentos T100, T30 e S30 (366, 309 e 305, respectivamente). O número de proteínas e peptídeos inicialmente identificados em cada análise UPLC/MS^E foi consistente entre as repetições e os tratamentos (Figura 6B). A taxa de falsa detecção, também chamada de “*false discovery rate (FDR)*”, das proteínas foi zero em todos os tratamentos, indicando que as análises foram suficientemente rigorosas (Figura 6B).

Figura 6 - (A) Diagrama de Venn (Oliveros, J.C. (2007-2015)) ilustrando a quantidade de proteínas identificadas em cada tratamento e as compartilhadas entre vários tratamentos; (B) Sumário do número de proteínas identificado

Para definir a semelhança intergrupal utilizou-se o agrupamento hierárquico com a função *hclust* no pacote estatístico. O resultado do agrupamento pode ser visualizado na forma de *heatmap* na Figura 7. Genótipos diferentes nas mesmas condições hídricas foram agrupados mais intensamente (apresentaram perfis de

proteínas mais semelhantes) que os mesmos genótipos em diferentes condições hídricas.

Figura 7 - *Heatmap* ilustrando o agrupamento dos tratamentos considerando a concentração de proteínas presente em folhas de genótipos susceptível (S) e tolerante (T) de *E. grandis* x *E. camaldulensis* a 30% e 100% da CC. Barra à direita indica aumento (vermelho), redução (verde) e níveis sem mudanças significativas (preto) na expressão de proteínas

5.3 Mudanças na regulação de proteínas em cada comparação pareada

Para determinar as mudanças na regulação de proteínas realizamos duas análises comparativas pareadas (A: S100 vs S30 e B: T100 vs T30) que foram obtidas por meio de análises PLGS (Figura 8). Os diagramas de Venn mostram a quantidade de proteínas encontradas em cada análise comparativa pareada, neste caso é possível observar proteínas exclusivas de cada tratamento e proteínas compartilhadas entre dois tratamentos. Proteínas exclusivas são aquelas

encontradas em um tratamento em particular, considerando as condições de análises utilizadas neste estudo.

Figura 8 - Mudanças na regulação de proteínas em cada comparação pareada (A: S100 vs S30 e B: T100 vs T30)

Foram identificados um total de 231 proteínas incluindo prováveis isoformas, a um nível de confiança de 95%, na comparação S100 vs S30 (Figura 8A). Neste caso, foram encontradas 45 (19,48%) e 12 (5,19%) proteínas exclusivas, para os tratamentos S100 e S30, respectivamente, e 174 proteínas compartilhadas entre ambos os tratamentos sendo que dentre estas, 85 (36,80%) e 51 (22,08%) proteínas apresentaram aumento e diminuição da regulação, respectivamente, no genótipo susceptível, enquanto que 38 (16,45%) proteínas mantiveram uma expressão similar entre ambos os tratamentos S100 vs S30.

Na comparação T100 vs T30 (Figura 8B) foi encontrado um total de 213 proteínas sendo que a maioria destas, 120 ou 56,34%, apresentou um aumento na regulação na presença do déficit hídrico.

Em ANEXOS (Tabela 7 e 8) é possível observar maiores informações relacionadas às duas análises comparativas pareadas de proteômica como, por exemplo, informações sobre descrições das proteínas, valores de *score*, razões entre tratamentos e valores de *p* das mesmas.

5.4 Processos biológicos das proteínas de folhas diferencialmente expressas em cada análise comparativa pareada

Os processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas em cada análise comparativa pareada podem ser observados nas Figuras 9A e 9B, nas comparações S100 vs S30 e T100 vs T30, respectivamente.

Na comparação S100 vs S30 (Figura 9A), foi possível observar que o número total de proteínas diferencialmente expressas aumentou na presença do déficit hídrico. Para o S30 os dois processos biológicos mais importantes foram aqueles relacionados à resposta ao estresse e fotossíntese. O S100 indica o processo biossintético como o alvo predominante para um grande número de proteínas diferencialmente expressas.

Quando observamos o comportamento do genótipo tolerante, T100 vs T30 (Figura 9B), descobrimos que também houve um aumento no número de proteínas diferencialmente expressas quando o déficit hídrico se tornou presente. Neste caso, a resposta ao estresse, para o T30, é predominante para um grande número de proteínas diferencialmente expressas.

As proteínas de resposta ao estresse e resposta ao estímulo abiótico se tornam muito expressas na presença do déficit hídrico. Esse aumento de expressão não está somente relacionado ao déficit hídrico em si, mas, como já explicado, a diversos outros fatores como aumento da temperatura interna da planta, salinidade e toxicidade iônica.

O déficit hídrico conduz a uma diminuição na evapotranspiração pela planta e isto somado à baixa umidade do solo pode resultar em uma redução no controle de temperatura pela planta gerando um aumento da temperatura interna, levando a alterações fisiológicas, assim como na expressão de proteínas. O estresse por calor faz com que muitas proteínas celulares que funcionam como enzimas ou componentes estruturais apresentem desdobramentos ou enrolamentos incorretos, levando assim à perda de uma estrutura e atividade enzimática adequada. Em temperaturas mais elevadas, as plantas produzem proteínas de choque térmico, chamadas *heat shock*, para ajudar as células com o estresse térmico agindo como chaperonas moleculares que permitem um enrolamento correto das proteínas mal dobradas, agregadas e ainda previnem o mal dobramento de proteínas, facilitando

assim o adequado funcionamento da célula que está submetida a altas temperaturas (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Dependendo do nível do déficit hídrico do solo e da fertilização utilizada na cultura, as plantas podem ainda expressar proteínas relacionadas ao estresse salino e toxicidade iônica, ou ainda quando há concentrações prejudiciais de íons acumulados nas células. Isto acontece porque a evaporação e a transpiração removem água (na forma de vapor) do solo, e esta perda de água concentra solutos no solo (TAIZ e ZEIGER, 2002) que podem trazer prejuízos às plantas, como por exemplo, a inativação de enzimas, inibição da síntese protéica, inibição da fotossíntese e podem ainda ativar outros mecanismos da planta que entram em ação na tentativa de contornar os danos causados pelo sal, como por exemplo, a ativação de algumas proteínas expressas relacionadas à resposta ao estresse e resposta ao estímulo abiótico.

Os cinco processos biológicos importantes mais relevantes foram detalhados, assim como as proteínas identificadas nestes processos. É possível observar que algumas proteínas pertencentes a um determinado processo biológico estão na realidade relacionadas a mais de um processo biológico, ou seja, desempenham múltiplos processos na planta, como por exemplo, a proteína *Rubisco Activase* (Eucgr.J01234.2|PACid:23599205), discutida abaixo, que está relacionada ao processo de fotossíntese, assim como aos processos de resposta ao estímulo abiótico, resposta ao estresse e morte celular.

Contagem dos Processos Biológicos - Genótipo Susceptível

Figura 9 - Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir das análises comparativas pareadas (A: S100 vs S30, B: T100 vs T30). Os processos biológicos foram obtidos através do software Blast2GO

5.5 Processos biológicos alterados pelo déficit hídrico em folhas de *Eucalyptus*

Observando as Figuras 9A e 9B é possível identificar cinco processos biológicos nos quais um grande número de proteínas apresentou uma superexpressão na presença do déficit hídrico. Estes processos foram: homeostase celular (Tabela 1), fotossíntese (Tabela 2), resposta ao estímulo abiótico (Tabela 3), resposta ao estresse (Tabela 4) e morte celular (Tabela 5), que serão comentados adiante.

As Tabelas 1 até 5 trazem as proteínas identificadas em ambos os genótipos e as proteínas chamadas de exclusivas (pertencente à um único genótipo, considerando-se as condições de análise utilizadas neste trabalho) em cada análise comparativa.

O valor da razão entre dois tratamentos (S100/S30 ou T100/T30) nas Tabelas 1 até 5 identifica que quanto menor é o valor da razão S100/S30, maior é a concentração de dada proteína no tratamento S30 em relação ao tratamento S100 ou T30 em relação ao tratamento T100. Uma razão igual a 1 indica que ambos os tratamentos apresentaram a mesma abundância de determinada proteína.

5.5.1 Homeostase celular (GO:0019725)

Cannon (1929) introduziu o termo homeostase, que origina-se da junção das palavras gregas *homeo* (similar) e *stasis* (estático). Refere-se à capacidade dos organismos vivos de manter um equilíbrio interno estável, mas dinâmico, que capacite o organismo a responder adequadamente e se adaptar às flutuações do ambiente externo. Segundo Gomes e Blenis (2015), em organismos multicelulares, células individuais trabalham a fim de detectar sinais externos e internos, manter a homeostase celular e sobreviver em diferentes condições ambientais. As células ajustam seu metabolismo eficientemente para permitir a abundância de nutrientes, energia e crescimento da planta. A capacidade de reprogramar o metabolismo celular entre processos anabólicos e catabólicos é crucial para as células prosperarem. Assim, as células têm desenvolvido, através da evolução, redes metabólicas que são altamente plásticas e bem regulamentadas para atender os requisitos necessários para manter a homeostase celular. A plasticidade desses sistemas celulares é rigidamente controlada por redes de sinalizações complexas que integram informações intracelulares e extracelulares. A coordenação de transdução de sinal e as vias metabólicas são essenciais para manter um estado celular saudável e rapidamente responsivo.

Quando observamos os processos biológicos alterados nas análises comparativas pareadas (S100 vs S30 e T100 vs T30), é possível identificar que um processo importante que é alterado na presença do déficit hídrico é a homeostase celular (Figuras 9A e 9B). Em ambos os genótipos, tolerante e susceptível, não é possível identificar proteínas diferencialmente expressas relacionadas à homeostase

celular quando os genótipos se encontram em 100% da CC, no entanto, quando ambos os genótipos são submetidos ao déficit hídrico, ambos passam a expressar proteínas diferencialmente expressas relacionadas à homeostase celular.

Segundo Miller et al. (2010) a aclimação das plantas às mudanças ocorridas em seu ambiente exige um novo estado de homeostase celular que é alcançado por um delicado equilíbrio entre múltiplas vias ou *pathways* existentes em diferentes compartimentos celulares. A homeostase celular pode, no entanto, ser interrompida durante os estresses hídrico e salino, especialmente quando a célula ou toda a planta é exposta a uma rápida diminuição do potencial hídrico, ou ainda quando existe adicional parâmetro ambiental envolvido (MITTLER et al., 2006).

Na Tabela 1 é possível observar as proteínas diferencialmente expressas e relacionadas à homeostase celular que apresentaram aumento em expressão quando o déficit hídrico foi imposto, em ambos os genótipos.

Neste caso é possível apontar como sendo uma proteína relevante a *thioredoxin*, que foi identificada em diversos acessos em ambos os genótipos apresentando um aumento em expressão na presença do déficit hídrico. A *thioredoxin* é uma enzima antioxidante que é encontrada em diversos organismos, desde arquea até mamíferos. A *thioredoxin* possui uma longa história evolucionária, sendo que a primeira *thioredoxin* foi descoberta em 1964 em *Escherichia coli* como sendo um doador de elétron para a *ribonucleotídeo redutase*, uma enzima requerida para a síntese de DNA (MOORE et al., 1964; LAURENT et al., 1964; COLLET e MESSENS et al., 2010). Segundo Collet e Messens (2010), a partir de então tornou-se claro que a *thioredoxin* desempenha múltiplos papéis celulares, agindo como redutase no controle redox (HOLMGREN, 1985), protegendo proteínas de agregação oxidativa (HOLMGREN e BJORNSTEDT, 1995), ajudando as células a lidarem com diversos estresses ambientais (espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxinitrito, arsenato) (LANDINO et al., 2004; MESSENS e SILVER, 2006), regulando a morte celular programada (RAVI et al., 2005) através da nitrosilação (BENHAR et al., 2008). Alguns textos apontam a *thioredoxin* como um fator de crescimento (POWIS et al., 2000), que modula a resposta inflamatória (NAKAMURA et al., 2005) e promove o dobramento de proteínas (KERN et al., 2006), ou ainda desempenha papéis importantes nos ciclos de vida dos vírus e fagos (HOLMGREN, 1989). A *thioredoxin* pode ser encontrada em diversos compartimentos celulares como no citosol (ARNER e HOLMGREN, 2000), núcleo (HIROTA et al., 1999) ou

mitocôndrias, associada à membrana celular (MARTIN e DEAN, 1991) ou segregada para o ambiente extracelular (XU et al., 2008).

No caso de folhas de *Eucalyptus* a *thioredoxin* responde ao déficit hídrico, aumentando sua expressão em genótipos susceptíveis e tolerantes à seca, aparentemente protegendo as células contra oxidação e ajudando as mesmas a lidarem contra este estresse ambiental. Foi possível encontrar diversos acessos de *thioredoxin* em ambos os genótipos (Tabela 1), todos estes classificados como desempenhando um papel importante na homeostase celular. Observando a Tabela 1 é possível identificar que das 6 proteínas identificadas no genótipo susceptível que estão relacionadas à homeostase celular, 3 correspondem a diferentes acessos de *thioredoxin*. No caso do genótipo tolerante, das 8 *thioredoxin* identificadas, 3 são de diferentes acessos.

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à homeostase celular identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.F02754.1 PACid:23583639	Thioredoxin Superfamily Protein	-	0,91	0,50
Eucgr.H04086.1 PACid:23593372	Mitochondrial Lipoamide Dehydrogenase 1	EC:1.8.1.4	0,70	0,32
Eucgr.J00880.2 PACid:23598756	Thioredoxin X	EC:1.8.4.0	0,81	0,70
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	-	0,70	0,59
Eucgr.L03049.1 PACid:23607585	Thioredoxin M-Type 4	-	0,81	0,79
Eucgr.K00402.3 PACid:23601869	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	-	0,76	na
Eucgr.F03707.1 PACid:23584865	Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein Of 32 Kd	-	na	0,63
Eucgr.F01775.2 PACid:23582511	Catalase 2	EC:1.11.1.6	na	0,76
Eucgr.I01764.1 PACid:23596448	Glutaredoxin Family Protein	EC:1.20.4.1	na	0,62

na: não se aplica (proteína não identificada na respectiva análise comparativa)

As proteínas antioxidantes são muito relevantes às plantas quando estas estão sob déficit hídrico, pois nestas condições as plantas passam a formar as ROS, principalmente quando diferentes vias estão desacopladas e a homeostase celular se encontra alterada. Os elétrons que possuem um estado de alta energia são transferidos para o oxigênio molecular (O_2) para formar as ROS (MITTLER, 2002). As ROS, como por exemplo, $^1O_2$, H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e $HO^{\cdot}$, são moléculas tóxicas capazes de causar danos oxidativos às proteínas, DNA e lipídios (APEL e HIRT 2004). Sob ótimas condições de crescimento, ROS são principalmente produzidas em baixos

níveis em organelas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. No entanto, durante o estresse, sua taxa de produção é drasticamente elevada (MILLER et al., 2010).

5.5.2 Fotossíntese (GO:0015979)

Nas Figuras 9A e 9B, é possível observar que a fotossíntese foi outro processo altamente afetado pelo déficit hídrico em ambos os genótipos. Em situação de estresse, ambos os genótipos apresentaram um aumento no número de proteínas diferencialmente expressas relacionadas à fotossíntese, assim como passaram a expressar proteínas exclusivas sob déficit hídrico (Figura 9A). Maiores detalhes das proteínas relacionadas à fotossíntese podem ser observados na Tabela 2.

Segundo Nouri et al. (2015), apesar do crescimento da planta ser controlado por uma variedade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, a fotossíntese é o mecanismo chave, que fornece grande parte da energia e moléculas orgânicas para crescimento e desenvolvimento das plantas (PINHEIRO e CHAVES, 2011). Geralmente, no reino vegetal e, especificamente, em plantas superiores, as folhas servem como uma parte altamente especializada e que é basicamente apontada nos processos fotossintéticos (KOMATSU e HOSSAIN, 2013). A fotossíntese representa uma das reações fotoquímicas mais importantes em plantas, uma vez que a energia da luz solar é fixada e convertida em energia biológica. A fotossíntese é uma consequência de múltiplos processos que envolvem várias vias biológicas. As vias são: sistema de transporte de elétrons fotossintético (PETs), em que a energia solar é convertida em ATP e NADPH; o ciclo de Calvin-Benson que também é conhecido como um ciclo de fixação de carbono fotossintético em que o CO₂ é fixado em carboidratos; assimilação, transporte e utilização de fotoassimilados como os produtos orgânicos da fotossíntese (EBERHARD et al., 2008; FOYER et al., 2012).

Segundo Nouri et al. (2015), duas etapas importantes, PETs e o Ciclo de Calvin-Benson, estão sob o controle de muitos genes/produtos gênicos codificados no cloroplasto e pelo genoma nuclear. Embora os produtos gênicos envolvidos na fotossíntese tenham funções óbvias, eles operam em conjunto em um trabalho coordenado e complexo de genes, componentes reguladores, fatores de sinalização

e processos metabólicos. A expressão dos genes em ambas as organelas celulares é altamente variável e muito afetada por diversos fatores ambientais (BERRY et al., 2013). Muitos tipos de estresses ambientais, como a seca, salinidade, inundação, luz, temperaturas desfavoráveis ou rápidas flutuações de temperatura afetam adversamente o processo do metabolismo de carbono na fotossíntese em plantas, podendo alterar a ultra-estrutura de organelas, alterar a concentração de vários pigmentos e metabólitos, assim como alterar a regulação estomática (PINHEIRO e CHAVES, 2011; AMBAVARAM et al., 2014).

Conforme Wang et al. (2014) no estresse hídrico leve, a redução da fotossíntese está mais relacionada ao fechamento estomático. Já quando o estresse hídrico se torna mais severo, seriam as limitações estomáticas e não-estomáticas que levariam, conjuntamente, ao declínio da fotossíntese (FLEXAS et al., 2008). Por exemplo, o transporte de elétrons do fotossistema II (PSII) para o PSI, enzimas do metabolismo do carbono (como *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (RuBisCO) e enzimas relacionadas à síntese de *ribulose-1,5-bisphosphate*) são também responsáveis pela menor taxa fotossintética sob condições de estresse hídrico mais intenso. A capacidade diminuída da regeneração da *Ribulose-1,5-bisphosphate* ocorre em decorrência da menor síntese de ATP na presença do estresse hídrico (MEDRANO et al., 2002).

Na Tabela 2 é possível observar que no caso do genótipo susceptível a proteína que se mostrou mais diferencialmente expressa entre S100 e S30 (razão de 0,55) foi a *high cyclic electron flow* ou alto fluxo cíclico de elétron (CEF), mas esta também foi identificada no genótipo tolerante. No trabalho de Singh et al. (2014), o CEF foi muito sensível ao estresse hídrico moderado. O estresse hídrico suave causou um grande decréscimo na capacidade das folhas em utilizar a energia da luz solar. O PSI e PSII estão protegidos da fotoinibição pela alta CEF e atenuação não-fotoquímica sob estresse hídrico moderado. Enquanto que durante o estresse hídrico severo, o fluxo linear de elétrons mostrou uma forte queda em comparação ao CEF. O CEF desempenha um papel importante em folhas de *Gossypium hirsutum* durante um estresse hídrico leve ou severo, e é, portanto, um bom indicador de estresse hídrico. Singh et al. (2014) afirmam a importância de rotas alternativas para o transporte de elétrons na proteção do aparato fotossintético do estresse, como no caso do fluxo cíclico de elétrons. Atualmente é muito aceito que fosforilação cíclica não é requerida para a assimilação de carbono (BUKHOV et al.,

1999; CLARKE; JOHNSON, 2001). As plantas possuem a habilidade de dissipar o excesso de energia da luz em PSII através da dissipação não fotoquímica (NPQ). A ativação da NPQ é dependente da geração de gradiente de próton através da membrana do tilacóide (ΔpH). A formação de ΔpH no cloroplasto é principalmente induzida pelo fluxo de elétrons linear e CEF (MIYAKE et al., 2005). É bem conhecido que a CEF é essencial para a proteção do PSII contra seu excesso de excitação, ativando NPQ e estabilizando complexos envolvendo oxigênio (MUNEKAGE et al., 2002). CEF tem sido documentada como um mecanismo crucial para proteção contra altas temperaturas (CLARKE; JOHNSON, 2001), resfriamento (HUANG et al., 2011), e alta luminosidade (MIYAKE et al., 2005, MIYAKE et al., 2004). Huang et al. (2012) acreditam que a CEF possui um importante papel na proteção do PSI e PSII contra estresse hídrico por restaurar as plantas.

No caso do genótipo tolerante é possível apontar algumas proteínas que se expressaram mais no T30 do que no T100, como *light harvesting complex photosystem II* (com uma razão de 0,26), *photosystem I subunit F* (razão de 0,31) e *light harvesting complex photosystem II* (uma outra isoforma, com diferente acesso, e com razão de 0,32). Estas proteínas e diversas outras identificadas na Tabela 1, como a ferredoxina, também estão relacionadas ao PSI. Segundo Hernández et al. (2012) os cloroplastos são quantitativamente e qualitativamente uma das fontes mais importantes de ROS em células de plantas (FOYER e NOCTOR, 2003). Durante o déficit hídrico, o fechamento estomático previne a difusão de CO_2 para os sítios de carboxilação, que evita sua utilização pela enzima RuBisCO. Nesta condição, NADPH e ATP não são consumidos no Ciclo de Calvin e podem ser acumulados excessivamente. Neste caso, o déficit hídrico resulta na saturação do transporte de elétrons fotossintéticos, especialmente quando combinado à alta luminosidade ou outras condições que resultam no excesso de excitação de energia nos cloroplastos. Ao nível de PSII, que também pode ocorrer ao nível de PSI conforme Cazzaniga et al. (2012), a energia pode ser transferida de um estado energético tão elevado da *clorofila* (estado “triplet”, *clorofila* $^3Chl^*$) diretamente para O_2 em seu estado basal (triplet: $^3O_2$) para originar $^1O_2$. No sítio de redução do PSI, na chamada reação de Mehler, transportadores de elétrons fotossintéticos ligados à membrana, como a ferredoxina reduzida, podem transferir um elétron para O_2 , gerando O_2^- , que é rapidamente convertido a H_2O_2 espontaneamente ou em uma reação catalisada por superóxido dismutase. Para lidar com a formação elevada de ROS que ocorre

durante o déficit hídrico, as plantas expressam diversos tipos de antioxidantes que estão indiretamente relacionados ao processo fotossintético, isso levou a um aumento de expressão de diversas proteínas relacionadas à fotossíntese quando houve a presença do déficit hídrico nas plantas.

A formação excessiva de ROS pode ainda inativar enzimas essenciais à sobrevivência da planta, como algumas envolvidas no processo de fotossíntese. Para tentar compensar esta inativação, a planta passa a tentar produzi-las em maior quantidade, na tentativa de manter processos metabólicos essenciais à sua sobrevivência ativos. O genótipo tolerante, provavelmente está sendo capaz de fazer isso de forma mais eficiente por conseguir tolerar o déficit hídrico mais eficientemente do que o genótipo susceptível. A Ribulose-5-phosphate-3-epimerase, por exemplo, catalisa a interconversão da ribulose-5-phosphate e xylulose-5-phosphate no ciclo de Calvin e na via oxidativa da pentose-fosfato (KOPP et al., 1999) e parece ser vital e muito sensível a H_2O_2 (uma das espécies de ROS). O estresse hídrico aumentando os níveis de H_2O_2 acaba por inativar esta enzima (SOBOTA e IMLAY, 2011). Em resposta a esta inativação a planta pode estar tentando aumentar sua expressão na tentativa de manter o ciclo de Calvin ou outro processo no qual ela participa ativamente.

Por outro lado e segundo Chaves et al. (2009), o aumento em expressão de algumas proteínas de fotossíntese pode estar relacionado a respostas de aclimação das plantas sob déficit hídrico. As respostas que afetam indiretamente a fotossíntese incluem aquelas relacionadas à inibição do crescimento ou desprendimento foliar por restringir o dispêndio de água pelos tecidos de origem, ajudando assim a manter a condição hídrica da planta e, consequentemente permitindo a assimilação de carbono pela planta. Compostos osmóticos que se acumulam em resposta a uma desidratação lenta imposta também têm uma função na manutenção da atividade metabólica do tecido. Respostas de aclimação à salinidade também incluem síntese de solutos compatíveis, bem como ajustes no transporte de íons (tais como a absorção, extrusão e sequestro de íons). Estas respostas tendem a levar à restauração da homeostase celular, desintoxicação e, portanto, a sobrevivência sob estresse.

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à fotossíntese, identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(continua)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.A01769.1 PACid:23563555	Photosynthetic Electron Transfer C	EC:1.10.2.2; EC:1.10.99.1	0,85	0,55
Eucgr.A02039.1 PACid:23563870	Photosystem II Subunit P-1	-	0,81	0,85
Eucgr.B00532.5 PACid:23565646	D-Ribulose-5-Phosphate-3-Epimerase	EC:5.1.3.1	0,90	0,41
Eucgr.B01088.1 PACid:23566205	Photosystem I Subunit D-2	-	0,84	0,85
Eucgr.B02755.3 PACid:23567972	High Cyclic Electron Flow 1	EC:1.3.1.74	0,55	0,41
Eucgr.D00854.1 PACid:23574601	Photosystem II Subunit Q-2	-	0,79	0,76
Eucgr.E04053.1 PACid:23580342	ATPase, F1 Complex, Gamma Subunit Protein	-	0,86	0,70
Eucgr.D00551.1 PACid:23574312	Magnesium Chelatase I2	EC:6.6.1.1; EC:3.6.1.3	0,89	0,59
Eucgr.F04149.2 PACid:23585410	ATP Synthase Delta-Subunit Gene	-	0,76	0,68
Eucgr.H01479.1 PACid:23590938	Chloroplast Stem-Loop Binding Protein Of 41 Kda	-	0,79	0,74
Eucgr.H04456.1 PACid:23593771	Thylakoid Lumen 18.3 Kda Protein	EC:3.1.3.2	0,75	0,57
Eucgr.I00200.2 PACid:23594717	Photosystem I Reaction Center Subunit Psi-N, Chloroplast, Putative / Psi-N, Putative (Psan)	-	0,94	0,64
Eucgr.I01025.1 PACid:23595525	Photosystem II Subunit O-2	-	0,81	0,81
Eucgr.I01374.1 PACid:23595938	Triosephosphate Isomerase	EC:5.3.1.1	0,70	0,83
Eucgr.I01792.1 PACid:23596488	DegP Protease 1	EC:1.3.1.74; EC:3.4.21.0	0,73	0,84
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	EC:5.2.1.8	0,66	0,84
Eucgr.J00617.1 PACid:23598422	Smad/Fha Domain-Containing Protein	-	0,64	0,57
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	-	0,70	0,59
Eucgr.K00389.1 PACid:23601851	Photosystem I Subunit F	-	0,80	0,31
Eucgr.K02765.1 PACid:23604395	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase (Had) Superfamily Protein	-	0,65	0,45
Eucgr.K02983.1 PACid:23604660	Light Harvesting Complex Photosystem II	-	0,92	0,32
Eucgr.B02162.1 PACid:23567250	Photosystem I Subunit E-2	-	0,84	na
Eucgr.B03013.1 PACid:23568241	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	EC:4.1.1.39	0,96	na
Eucgr.E01113.1 PACid:23577830	Photosynthetic Electron Transfer A	-	0,75	na
Eucgr.G02956.1 PACid:23588729	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	-	0,71	na
Eucgr.H03311.1 PACid:23592617	Chloroplast Rna Binding	-	0,78	na
Eucgr.I01025.2 PACid:23595526	Photosystem II Subunit O-2	-	0,73	na
Eucgr.I02340.2 PACid:23597076	Ferredoxin-NADP(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	0,71	na
Eucgr.I02340.4 PACid:23597078	Ferredoxin-NADP(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	0,72	na
Eucgr.J01037.4 PACid:23598950	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	EC:1.1.1.37; EC:1.1.1.82	0,76	na
Eucgr.J01250.1 PACid:23599219	Rna-Binding (Rrm/Rbd/Rnp Motifs) Family Protein	-	0,81	na
Eucgr.K00402.3 PACid:23601869	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	-	0,76	na
Eucgr.H03302.3 PACid:23592607	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase Family Protein	EC:5.4.2.6	S30	na
Eucgr.J01234.2 PACid:23599205	Rubisco Activase	-	S30	na
Eucgr.K01671.1 PACid:23603188	Mog1/PsbP/Duf1795-Like Photosystem II Reaction Center PsbP Family Protein	-	S30	na
Eucgr.A01047.1 PACid:23562782	Photosystem II Light Harvesting Complex Gene 2.2	-	na	0,64
Eucgr.A02039.2 PACid:23563871	Photosystem II Subunit P-1	-	na	0,80
Eucgr.B02306.1 PACid:23567434	Plastid Transcriptionally Active 16	-	na	0,59

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à fotossíntese, identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(conclusão)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	Atpase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	-	na	0,54
Eucgr.D00321.1 PACid:23574101	Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex li Subunit B1	-	na	0,84
Eucgr.E02381.1 PACid:23578899	Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex li Subunit B1	-	na	0,52
Eucgr.G03060.1 PACid:23588848	Light Harvesting Complex Photosystem li	-	na	0,26
Eucgr.I02340.3 PACid:23597077	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	na	0,84
Eucgr.I02744.1 PACid:23597539	2Fe-2S Ferredoxin-Like Superfamily Protein	-	na	0,90
Eucgr.J00242.1 PACid:23597962	Sedoheptulose-Bisphosphatase	EC:3.1.3.37; EC:3.1.3.11	na	0,66
Eucgr.J01502.2 PACid:23599482	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	EC:4.1.1.39	na	0,63
Eucgr.J01758.1 PACid:23599758	Protein Containing PdZ Domain, A K-Box Domain, And A Tpr Region	-	na	0,92
Eucgr.K01362.1 PACid:23602874	Photosystem I Light Harvesting Complex Gene 3	-	na	0,46

na: não se aplica (proteína não identificada na respectiva análise comparativa)

5.5.3 Resposta ao estímulo abiótico (GO:0009628) e resposta ao estresse (GO:0006950)

Na Tabela 3 é possível observar as proteínas que apresentaram um aumento no nível de expressão, relacionadas ao estímulo abiótico, quando o déficit hídrico foi imposto aos diferentes genótipos avaliados. Neste caso também houve a expressão de proteínas exclusivas em ambos os genótipos. Já na Tabela 4 é possível observar as proteínas que apresentaram um aumento no nível de expressão quando o déficit hídrico foi imposto e que estão relacionadas à resposta ao estresse.

É possível identificar algumas proteínas *heat shock* (Hsps) que foram superexpressas na presença do déficit hídrico. Estas foram classificadas em mais de um processo biológico como, por exemplo, na resposta ao estímulo abiótico e resposta ao estresse (Tabelas 3 e 4). Conforme Al-Whaibi (2011), resposta ao estresse ao nível molecular é encontrado em todas as formas de vida, especialmente as mudanças repentinas na expressão genotípica que resultam consequentemente em um aumento na síntese de grupos protéicos chamados de proteínas "*heat-shock*", "proteínas induzidas pelo estresse" ou "proteínas de estresse" (GUPTA et al., 2010). Quase todos os tipos de estresses induzem a expressão gênica e a síntese de Hsps em células que estão submetidas ao estresse (DE MAIO, 1999). Em *Arabidopsis* e algumas outras espécies de plantas, a baixa temperatura, o estresse osmótico, a salinidade, o estresse oxidativo, a seca, as altas

intensidades de radiação, o ferimento e metais pesados são fatores que também levam a indução da síntese de Hsps (SWINDELL et al., 2007). A transcrição de genes de Hsps é controlada por proteínas reguladoras chamadas de fatores de transcrição *heat-stress* (Hsfs). As plantas apresentam pelo menos 21 Hsfs e cada um destes fatores de transcrição possui um papel específico na regulação, mas que também cooperam em todas as fases de respostas periódicas ao estresse (desencadeamento do estresse, manutenção e recuperação da planta). As principais Hsps auxiliam na solução de problemas relacionados à agregação, dobramento incorreto de proteínas, além de apresentarem funções como chaperonas, uma classe especializada de proteínas cuja algumas funções são ajudar outras proteínas a assumirem e manterem o estado de dobramento nativo, auxiliar na translocação de proteínas através de biomembranas, na montagem e desmontagem de proteínas complexas, maturação dos componentes de transdução de sinal e marcação de proteínas desdobrável para a degradação (AL-WHAIBI, 2011).

Outro exemplo de proteína superexpressa na presença do déficit hídrico foi a *malate dehydrogenase*, no entanto esta foi expressa somente pelo genótipo tolerante, quando relacionada ao estímulo abiótico e resposta ao estresse. Segundo Hebbelmann et al. (2012), a malato serve como uma válvula que balanceia a razão ATP/NADPH do cloroplasto, conforme requerido por demandas metabólicas (SCHEIBE, 2004), esta enzima aparentemente desempenha um papel importante no ajuste de curto prazo do estado *redox* NADP(H) do estroma em resposta a mudanças nas condições ambientais, de modo a assegurar a manutenção da homeostase *redox* (SCHEIBE et al., 2005).

A *terpene synthase* foi uma proteína encontrada somente no genótipo tolerante quando relacionada à resposta ao estímulo abiótico e resposta ao estresse. Os terpenos são substâncias constituídas de “unidades do *isopreno*” e segundo Velikova (2008) a emissão de isopreno, produto da síntese desse, representa uma perda de carbono não trivial para a planta. Foi demonstrado que os precursores para a síntese de isopreno são derivados da via de fixação de carbono (MONSON et al. 1992), cerca de 80% do carbono perdido como isopreno é originado do CO₂ muito recentemente assimilado (HAYWARD et al. 2004). Em condições normais de crescimento, as plantas normalmente liberam 0,52% de carbono fixado pela fotossíntese para a atmosfera como isopreno (MONSON e FALL, 1989; SHARKEY et al, 1991). Sob moderado déficit hídrico ou em ambientes quentes, a emissão de

isopreno pode representar uma fração significativa (8-10%) do total de carbono (GUENTHER, 2002; KESSELMEIER et al., 2002). A grande fração de carbono perdida, o alto grau de regulação da sua taxa de síntese, e o fato que nem todas as plantas produzem isopreno sugeriu que a síntese de isopreno pode proporcionar algum benefício às plantas emissoras. Foi demonstrado também, que o isopreno protege as plantas contra estresse por calor (SHARKEY e SINGSAAS, 1995) e danos causados pelo ozônio (LORETO e VELIKOVA, 2001). É provável que a hidrofobicidade da molécula de isopreno permita interações com componentes não-polares da membrana, podendo resultar na estabilização da mesma (SHARKEY e YEH, 2001). Estudos também sugerem que o isopreno pode ter capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio (LORETO e VELIKOVA, 2001).

Muitas outras proteínas foram identificadas e estão relacionadas à resposta ao estímulo abiótico e resposta ao estresse em plantas (Tabelas 3 e 4) e algumas destas proteínas foram identificadas em ambos os genótipos e outras são exclusivas a um determinado genótipo.

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estímulo abiótico identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(continua)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.B02755.3 PACid:23567972	High Cyclic Electron Flow 1	EC:1.3.1.74	0,55	0,41
Eucgr.B03593.2 PACid:23568960	Tcp-1/Cpn60 Chaperonin Family Protein	-	0,59	0,47
Eucgr.C03791.2 PACid:23573167	Glyoxalase/Bleomycin Resistance Protein/Dioxygenase Superfamily Protein	EC:4.4.1.5	0,68	0,64
Eucgr.F01476.1 PACid:23582167	Phosphoglycerate Kinase Family Protein	EC:2.7.2.3	0,79	0,63
Eucgr.F01793.1 PACid:23582537	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase B Subunit	EC:1.2.1.13	0,79	0,38
Eucgr.G01121.1 PACid:23586735	Pyrophosphorylase 6	EC:3.6.1.1	0,55	0,68
Eucgr.H01016.1 PACid:23590433	Cp12 Domain-Containing Protein 2	-	0,90	0,85
Eucgr.H01479.1 PACid:23590938	Chloroplast Stem-Loop Binding Protein Of 41 Kda	-	0,79	0,74
Eucgr.H02605.2 PACid:23591918	Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein	EC:1.6.5.5	0,72	0,69
Eucgr.H02866.1 PACid:23592183	Heat Shock Protein 60	-	0,87	0,87
Eucgr.H04086.1 PACid:23593372	Mitochondrial Lipoamide Dehydrogenase 1	EC:1.8.1.4	0,70	0,32
Eucgr.H04456.1 PACid:23593771	Thylakoid Lumen 18.3 Kda Protein	EC:3.1.3.2	0,75	0,57
Eucgr.I01025.1 PACid:23595525	Photosystem Ii Subunit O-2	-	0,81	0,81
Eucgr.I01790.1 PACid:23596486	Carbonic Anhydrase 1	EC:4.2.1.1	0,83	0,47
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	EC:5.2.1.8	0,66	0,84
Eucgr.I02771.1 PACid:23597572	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	EC:1.3.1.74	0,81	0,93
Eucgr.J00880.2 PACid:23598756	Thioredoxin X	EC:1.8.4.0	0,81	0,70
Eucgr.J02030.1 PACid:23600061	Rubisco Activase	-	0,95	0,95
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	-	0,70	0,59

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estímulo abiótico identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(conclusão)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.K02983.1 PACid:23604660	Light Harvesting Complex Photosystem II	-	0,92	0,32
Eucgr.B03013.1 PACid:23568241	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	EC:4.1.1.39	0,96	na
Eucgr.G02956.1 PACid:23588729	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	-	0,71	na
Eucgr.H03311.1 PACid:23592617	Chloroplast Rna Binding	-	0,78	na
Eucgr.I01025.2 PACid:23595526	Photosystem II Subunit O-2	-	0,73	na
Eucgr.I02340.4 PACid:23597078	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	0,72	na
Eucgr.J00008.1 PACid:23597642	Triosephosphate Isomerase	EC:5.3.1.1	0,73	na
Eucgr.B03110.1 PACid:23568356	Chaperone Protein Htpg Family Protein	-	S30	na
Eucgr.G00235.1 PACid:23585937	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	EC:1.3.1.74	S30	na
Eucgr.J01234.2 PACid:23599205	Rubisco Activase	-	S30	na
Eucgr.B02306.1 PACid:23567434	Plastid Transcriptionally Active 16	-	na	0,59
Eucgr.B03754.1 PACid:23569146	Chaperonin 10	-	na	0,90
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	ATPase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	-	na	0,54
Eucgr.E01261.2 PACid:23577988	Phosphoribulokinase	EC:2.7.1.19	na	0,93
Eucgr.F01775.2 PACid:23582511	Catalase 2	EC:1.11.1.6	na	0,76
Eucgr.F02905.2 PACid:23583830	Udp-Glucose Pyrophosphorylase 2	EC:2.7.7.9	na	0,88
Eucgr.F03433.1 PACid:23584510	Thiazole Biosynthetic Enzyme, Chloroplast (Ara6) (Thi1) (Thi4)	-	na	0,44
Eucgr.F03673.2 PACid:23584817	Heat Shock Protein 81.4	-	na	0,52
Eucgr.F03707.1 PACid:23584865	Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein Of 32 Kd	-	na	0,63
Eucgr.G03042.3 PACid:23588828	Ribosomal Protein L10 Family Protein	EC:4.2.99.18	na	0,59
Eucgr.G03060.1 PACid:23588848	Light Harvesting Complex Photosystem II	-	na	0,26
Eucgr.H00143.2 PACid:23589482	ATP Citrate Lyase (Acl) Family Protein	EC:6.2.1.5; EC:6.2.1.4	na	0,86
Eucgr.H03047.1 PACid:23592367	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	EC:1.1.1.37	na	0,56
Eucgr.H04673.1 PACid:23594007	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C2	EC:1.2.1.12	na	0,75
Eucgr.I02340.3 PACid:23597077	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	na	0,84
Eucgr.I02744.1 PACid:23597539	2Fe-2S Ferredoxin-Like Superfamily Protein	-	na	0,90
Eucgr.K01372.1 PACid:23602888	Adp Glucose Pyrophosphorylase 1	EC:2.7.7.27	na	0,84
Eucgr.K02606.1 PACid:23604206	Thioredoxin Superfamily Protein	EC:1.11.1.7; EC:1.11.1.15	na	0,92
Eucgr.K00881.1 PACid:23602342	Terpene Synthase 03	EC:4.2.3.27	na	T30

na: não se aplica (proteína não identificada na respectiva análise comparativa)

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estresse identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(continua)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.A01555.1 PACid:23563344	Thioredoxin Superfamily Protein	EC:1.11.1.15; EC:1.11.1.7	0,77	0,83
Eucgr.B01112.1 PACid:23566234	Peroxioredoxin Iif	EC:1.11.1.15; EC:1.11.1.7	0,80	0,65
Eucgr.B02755.3 PACid:23567972	High Cyclic Electron Flow 1	EC:1.3.1.74	0,55	0,41
Eucgr.B03593.2 PACid:23568960	Tcp-1/Cpn60 Chaperonin Family Protein	-	0,59	0,47

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estresse identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(continuação)

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.C00774.1 PACid:23570286	Thioredoxin Superfamily Protein	EC:1.11.1.7; EC:1.11.1.15	0,57	0,68
Eucgr.C03791.2 PACid:23573167	Glyoxalase/Bleomycin Resistance Protein/Dioxygenase Superfamily Protein	EC:4.4.1.5	0,68	0,64
Eucgr.C03812.2 PACid:23573187	Thioredoxin-Dependent Peroxidase 1	EC:1.11.1.7	0,79	0,82
Eucgr.E00579.1 PACid:23577319	Glutathione Peroxidase 6	EC:1.11.1.9	0,70	0,64
Eucgr.F01476.1 PACid:23582167	Phosphoglycerate Kinase Family Protein	EC:2.7.2.3	0,79	0,63
Eucgr.F01793.1 PACid:23582537	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase B Subunit	EC:1.2.1.13	0,79	0,38
Eucgr.F04149.2 PACid:23585410	Atp Synthase Delta-Subunit Gene	-	0,76	0,68
Eucgr.F04344.2 PACid:23585603	Thylakoidal Ascorbate Peroxidase	EC:1.11.1.7	0,80	0,84
Eucgr.G01121.1 PACid:23586735	Pyrophosphorylase 6	EC:3.6.1.1	0,55	0,68
Eucgr.H02605.2 PACid:23591918	Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein	EC:1.6.5.5	0,72	0,69
Eucgr.H02866.1 PACid:23592183	Heat Shock Protein 60	-	0,87	0,87
Eucgr.H04086.1 PACid:23593372	Mitochondrial Lipoamide Dehydrogenase 1	EC:1.8.1.4	0,70	0,32
Eucgr.I01025.1 PACid:23595525	Photosystem li Subunit O-2	-	0,81	0,81
Eucgr.I01790.1 PACid:23596486	Carbonic Anhydrase 1	EC:4.2.1.1	0,83	0,47
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	EC:5.2.1.8	0,66	0,84
Eucgr.I02771.1 PACid:23597572	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	EC:1.3.1.74	0,81	0,93
Eucgr.J00880.2 PACid:23598756	Thioredoxin X	EC:1.8.4.0	0,81	0,70
Eucgr.J02030.1 PACid:23600061	Rubisco Activase	-	0,95	0,95
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	-	0,70	0,59
Eucgr.L02773.1 PACid:23607390	Glycine Cleavage T-Protein Family	EC:2.6.1.0; EC:2.1.2.10	0,91	0,35
Eucgr.L03049.1 PACid:23607585	Thioredoxin M-Type 4	-	0,81	0,79
Eucgr.G02956.1 PACid:23588729	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	-	0,71	na
Eucgr.H01473.2 PACid:23590926	Ribosome Recycling Factor, Chloroplast Precursor	-	0,62	na
Eucgr.H03311.1 PACid:23592617	Chloroplast Rna Binding	-	0,78	na
Eucgr.I01025.2 PACid:23595526	Photosystem li Subunit O-2	-	0,73	na
Eucgr.I02340.2 PACid:23597076	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	0,71	na
Eucgr.I02340.4 PACid:23597078	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	0,72	na
Eucgr.J00008.1 PACid:23597642	Triosephosphate Isomerase	EC:5.3.1.1	0,73	na
Eucgr.K02778.1 PACid:23604410	Chloroplast Rna-Binding Protein 31B	-	0,71	na
Eucgr.B03110.1 PACid:23568356	Chaperone Protein Htpg Family Protein	-	S30	na
Eucgr.G00235.1 PACid:23585937	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	EC:1.3.1.74	S30	na
Eucgr.J01234.2 PACid:23599205	Rubisco Activase	-	S30	na
Eucgr.B03754.1 PACid:23569146	Chaperonin 10	-	na	0,90
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	Atpase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	-	na	0,54
Eucgr.E01261.2 PACid:23577988	Phosphoribulokinase	EC:2.7.1.19	na	0,93
Eucgr.F01775.2 PACid:23582511	Catalase 2	EC:1.11.1.6	na	0,76
Eucgr.F02017.1 PACid:23582769	Aldolase Superfamily Protein	EC:4.1.2.13	na	0,78
Eucgr.F02905.2 PACid:23583830	Udp-Glucose Pyrophosphorylase 2	EC:2.7.7.9	na	0,88
Eucgr.F03433.1 PACid:23584510	Thiazole Biosynthetic Enzyme, Chloroplast (Ara6) (Thi1) (Thi4)	-	na	0,44
Eucgr.F03673.2 PACid:23584817	Heat Shock Protein 81.4	-	na	0,52

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à resposta ao estresse identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

(conclusão)				
Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.F03707.1 PACid:23584865	Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein Of 32 Kd	-	na	0,63
Eucgr.G03042.3 PACid:23588828	Ribosomal Protein L10 Family Protein	EC:4.2.99.18	na	0,59
Eucgr.H00143.2 PACid:23589482	Atp Citrate Lyase (Acl) Family Protein	EC:6.2.1.5; EC:6.2.1.4	na	0,86
Eucgr.H01473.3 PACid:23590927	Ribosome Recycling Factor, Chloroplast Precursor	-	na	0,90
Eucgr.H03047.1 PACid:23592367	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	EC:1.1.1.37	na	0,56
Eucgr.H04673.1 PACid:23594007	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C2	EC:1.2.1.12	na	0,75
Eucgr.I02340.3 PACid:23597077	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	na	0,84
Eucgr.J00023.2 PACid:23597668	Heat Shock Protein 70	EC:1.3.1.74	na	0,70
Eucgr.J00242.1 PACid:23597962	Sedoheptulose-Bisphosphatase	EC:3.1.3.37; EC:3.1.3.11	na	0,66
Eucgr.K02198.3 PACid:23603740	Clpc Homologue 1	-	na	0,87
Eucgr.K02606.1 PACid:23604206	Thioredoxin Superfamily Protein	EC:1.11.1.7; EC:1.11.1.15	na	0,92
Eucgr.L02740.1 PACid:23607364	Peroxidase Superfamily Protein	EC:1.11.1.7	na	0,76
Eucgr.K00881.1 PACid:23602342	Terpene Synthase 03	EC:4.2.3.27	na	T30

na: não se aplica (proteína não identificada na respectiva análise comparativa)

5.5.4 Morte celular (GO:0008219)

Segundo Petrov et al. (2015) as plantas são continuamente expostas a uma grande variedade de fatores de estresse abióticos que podem danificar os tecidos e comprometer a sobrevivência do organismo, a não ser que estes fatores sejam adequadamente combatidos. Enquanto os animais podem simplesmente escapar de agentes estressores, as plantas sendo organismos sésseis, acabaram por desenvolver estratégias complexas para resistir ou tolerá-los. Um processo importante de defesa utilizada pelas plantas é a indução de morte celular programada (PCD). Este é um processo ativo, geneticamente controlado que é iniciado para isolar e remover os tecidos danificados, garantindo assim a sobrevivência do organismo. O mecanismo de indução de PCD inclui geralmente um aumento nos níveis de ROS que são utilizados como mediadores do sinal do estresse.

Algumas proteínas diferencialmente expressas, que apresentaram aumento de regulação, estão relacionadas à morte celular em ambos os genótipos. Em condição de boa irrigação não houve a expressão de nenhuma proteína diferencialmente expressa relacionada à morte celular (Figuras 9A e 9B), no entanto, sob déficit hídrico as plantas passaram a expressar as proteínas identificadas na

Tabela 5. Três destas proteínas são comuns aos genótipos susceptível e tolerante, duas são exclusivas do susceptível e duas são exclusivas do tolerante.

Segundo Nouri et al. (2015) o sistema fotossintético reage ao estresse de diferentes maneiras, variando de acordo com o tipo de planta, sistema fotossintético (plantas C3 ou C4), tipo de estresse, tempo e duração da ocorrência e muitos outros fatores. As plantas respondem ao estresse pela expressão coordenada de genes dos cloroplastos e genes nucleares. Cloroplastos, membrana do tilacóide e núcleo são os principais alvos das proteínas reguladas e metabólitos associados as vias fotossintéticas. Respostas rápidas do metabolismo celular vegetal e adaptação à maquinaria fotossintética são fatores chaves para a sobrevivência de plantas em um ambiente flutuante.

Em relação à morte celular, a *Rubisco activase* (RCA) foi somente identificada no genótipo susceptível. Segundo Ristic et al. (2009) a RCA funciona como chaperona da Rubisco (PORTIS, 2003) principalmente durante períodos de estresse por calor quando há uma diminuição na atividade fotossintética por desativação da Rubisco. O estresse por calor leva a uma acumulação endógena de RCA na tentativa de promover um reparo da atividade da Rubisco e fotossíntese. Conforme Sánchez de Jiménez et al., (1995) o estresse por calor levou à um aumento na acumulação de isoformas de RCA em milho. *Rubisco activase* é essencial para a ocorrência da fotossíntese pois ela libera o local ativo da Rubisco para uma espontânea carboxilação pelo CO₂. No caso de folhas de *Eucalyptus* a planta pode estar respondendo ao estresse por calor, em decorrência do déficit hídrico, e assim elevando a acumulação endógena de RCA. Caso a função da RCA como chaperona não seja suficiente para permitir que todo o aparato fotossintético trabalhe satisfatoriamente, e somado a outros fatores, pode ocorrer uma futura morte celular.

A superexpressão de outras proteínas do maquinário fotossintético, relacionadas à morte celular, como a *ferredoxin*, provavelmente esta relacionada à diminuição da eficiência do ciclo de Calvin e ao acúmulo de ROS nas plantas pela presença do déficit hídrico.

Segundo Sharma et al. (2012) a ROS é produzida em diversos sítios das plantas, e um destes sítios é o cloroplasto. As cadeias de transporte de elétrons nos PSI e PSII são as principais fontes de ROS nos cloroplastos e a seca é um dos fatores que levam ao aumento de ROS nos cloroplastos por limitar a fixação de CO₂. Sob condições normais, o fluxo de elétrons ocorre dos centros de fotossistemas para

o NADP, que é reduzido para NADPH. Esse, entra posteriormente no ciclo de Calvin e reduz o aceptor final de elétrons, o CO₂. Em caso de sobrecarga da cadeia de transporte de elétrons, devido à diminuição do suprimento de NADP resultante da condição de estresse, há uma transferência de elétrons da ferredoxina para o O₂, reduzindo este para O₂^{•-} (SHARMA et al., 2012; ELSTNER, 1991). A formação de O₂^{•-} pela redução de O₂ é um passo limitante da taxa. Uma vez gerado O₂^{•-}, haverá a formação de uma ROS mais agressiva, através da protonação para HO₂ ou espontaneamente para H₂O₂. Nos centros Fe-S onde existe Fe²⁺ disponível, o H₂O₂ pode ser transformado em um mais perigoso OH[•] (SHARMA et al., 2012).

Quando o nível de ROS excede os mecanismos de defesa, pode-se dizer que a célula se encontra num estado de "estresse oxidativo". O equilíbrio entre a produção e a limpeza de ROS é perturbado quando a planta se encontra sob condições estressantes como a seca, por exemplo. Um maior nível de ROS pode causar danos às biomoléculas tais como lipídeos, proteínas e DNA. Estas reações podem alterar intrínsecas propriedades da membrana como fluidez, transporte de íons, perda de atividade enzimática, inibição da síntese protéica, danos ao DNA, e assim por diante. Em última análise, resultando na morte celular (SHARMA et al., 2012).

Tabela 5 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas à morte celular identificadas nos genótipos susceptível e tolerante, proteínas que apresentaram aumento de expressão na presença do déficit hídrico

Acesso (http://www.phytozome.net/)	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Código enzimático	S100/S30	T100/T30
Eucgr.B03593.2 PACid:23568960	Tcp-1/Cpn60 Chaperonin Family Protein	-	0,59	0,47
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	EC:5.2.1.8	0,72	0,84
Eucgr.I02340.4 PACid:23597078	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	EC:1.6.99.1; EC:1.18.1.2	S30	0,84
Eucgr.J01234.2 PACid:23599205	Rubisco Activase	-	0,78	na
Eucgr.H03311.1 PACid:23592617	Chloroplast Rna Binding	-	0,66	na
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	Atpase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	-	na	0,54
Eucgr.F01775.2 PACid:23582511	Catalase 2	EC:1.11.1.6	na	0,76

na: não se aplica (proteína não identificada na respectiva análise comparativa)

5.5.5 Participação de enzimas diferencialmente expressas em importantes vias

As três vias metabólicas mais importantes, relacionadas aos cinco processos biológicos comentados acima, das quais participam as proteínas diferencialmente expressas na presença do déficit hídrico e com aumento em expressão, em ambos os genótipos são:

- Fixação de carbono em organismos fotossintéticos (Figura 10A);
- Ciclo TCA (Figura 10B)
- Glicólise / gluconeogênese (Figura 10C).

As enzimas identificadas em azul nas vias metabólicas foram aquelas somente identificadas no genótipo tolerante, em verde aquelas somente identificadas no genótipo susceptível e em laranja, as identificadas em ambos os genótipos.

As Figuras 10A e 10B identificam as enzimas relacionadas ao maquinário fotossintético das plantas e que apresentaram aumento em expressão na presença do déficit hídrico. Estas podem estar respondendo, na tentativa de aclimação da planta ao novo ambiente, ou ainda respondendo ao aumento de ROS na célula, ou respondendo à inativação de algumas proteínas em consequência do aumento de ROS, com o objetivo de manter as funções vitais da planta.

Como já comentado, respostas de aclimação ao déficit hídrico, que também afetam indiretamente a fotossíntese, incluem aquelas também relacionadas à inibição do crescimento ou desprendimento foliar que, ao restringir as despesas de água em tecidos de origem, acaba por ajudar a manter a condição hídrica da planta e, portanto, a assimilação de carbono vegetal. Compostos osmóticos que se acumulam em resposta a uma desidratação lenta imposta, também têm uma função na manutenção da atividade metabólica do tecido. Respostas de aclimação à salinidade também incluem síntese de solutos compatíveis, bem como ajustes no transporte de íons (tais como a absorção, extrusão e sequestro de íons). Estas respostas acabarão por levar a restauração da homeostase celular, desintoxicação e, portanto, a sobrevivência sob estresse (CHAVES et al., 2009).

A curto prazo, a regulação do ciclo de Calvin é obtida por vários mecanismos que otimizam a concentração dos intermediários. Esses mecanismos minimizam reações que operam em direções opostas, as quais desperdiçariam recursos (WOLOSIUK et al. 1993).

Assim, dependendo da intensidade do estresse hídrico, a planta pode responder à tentativa de uma aclimação fazendo com que a fixação de carbono e o ciclo de Calvin (ciclo TCA) não deixem de ocorrer, mesmo que ocorra em menores proporções já que há a presença de uma limitação hídrica. Quando o estresse hídrico se torna mais severo e a aclimação se torna dificultada, pode estar ocorrendo a produção de ROS em diversos sítios da planta, podendo influenciar

negativamente o processo fotossintético, levando a diversas alterações internas nas plantas, que podem resultar futuramente em morte celular.

A Figura 10C identifica algumas proteínas superexpressas que estão envolvidas na via da glicólise ou gluconeogênese em resposta ao déficit hídrico. A sacarose é o ponto de início da glicólise ou o ponto final da gliconeogênese em plantas superiores. Durante ambas, glicólise ou gliconeogênese, enzimas alternativas estão disponíveis em várias etapas para permitir ocorrência destas vias paralelas, como a frutose 2,6-bifosfato que serve como um forte regulador interno, e as plantas usam essas alternativas citoplasmáticas conforme o desenvolvimento das plantas e as mudanças ambientais (SUNG et al., 1988). No trabalho de Ford et al. (2011) foi constatado um aumento em expressão de algumas proteínas, relacionadas à via da glicólise ou gluconeogênese, em trigo tolerante ao déficit hídrico. Estresses ambientais podem causar ajustes sutis na glicólise em plantas (HUMMEL et al. 2010). Duas principais funções da glicólise são produzir energia e blocos construtores necessários para a síntese bioquímica. Existem várias maneiras para que esta via possa ser corretamente controlada, incluindo pH, concentrações de substrato, concentrações de metabólitos efetores e modificação de proteínas (PLAXTON, 1996).

No trabalho de Lenka et al. (2011), que estudaram o déficit hídrico em cultivares de arroz tolerante e susceptível à seca, é possível observar que houve um aumento em regulação de muitos componentes envolvidos no processo de glicólise ou gluconeogênese em resposta à seca. Isto corrobora com o que encontramos em folhas de *Eucalyptus* susceptível e tolerante ao déficit hídrico. Segundo Lenka et al. (2011) a indução de funções relacionadas à energia (glicólise e gliconeogênese) indica que este é um processo conservado evolutivamente com o objetivo de manutenção da célula e de seus processos ativos, mesmo a planta estando sob condições de déficit hídrico. Semelhantes resultados também foram observados em *Selaginella lepidophylla*, uma antiga linhagem de plantas vasculares que podem resistir a uma completa dessecação durante anos e é capaz de reviver após apenas algumas horas de reidratação (ITURRIAGA et al., 2006).

Figura 10- Enzimas diferencialmente expressas na presença do déficit hídrico e identificadas nos cinco principais processos biológicos e a participação destas em três importantes vias metabólicas: A) Via de fixação de carbono em organismos fotossintéticos; B) Ciclo TCA e C) Glicólise / Gluconeogênese

5.6 Importantes processos biológicos afetados negativamente na presença do déficit hídrico

Nas Figuras 9A e 9B é possível observar que a presença do déficit hídrico resultou na diminuição da expressão de proteínas relacionadas a processos biológicos, sendo alguns destes, comuns a ambos os genótipos: “processo metabólico de compostos contendo bases nucleares”, “regulação biológica” e “processo biossintético”. Estes processos estão relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como à manutenção de seus processos vitais, nos quais é imprescindível o dispêndio energético pela célula.

O metabolismo energético é cada vez mais afetado por um estresse que se torna cada vez mais severo (como por exemplo, açúcares, lipídeos e fotossíntese (PINHEIRO; CHAVES, 2011; CRAMER et al., 2007). Existem mudanças graduais e complexas no metabolismo em resposta ao estresse.

Conforme Biamonti e Caceres (2009), agentes estressantes levam a um bloqueio imediato de todos os processos metabólicos importantes, incluindo replicação de DNA, transcrição, exportação de mRNA e tradução, até as células se recuperarem.

Conforme Osakabe et al. (2014), o estresse hídrico impacta negativamente muitos aspectos da fisiologia das plantas, e especialmente a capacidade fotossintética. Quando o estresse é prolongado, o crescimento da planta e a produtividade são severamente diminuídos. O crescimento das plantas tem como base a fotossíntese. O estresse hídrico leva à diminuição da regulação de genes relacionados à fotossíntese, à uma disponibilidade reduzida de CO₂ e consequentemente à um excesso de luz (EL) incidindo na folha. O EL leva à uma fotooxidação induzida, resultando no aumento da produção de intermediários oxidativos que afetam negativamente as moléculas biológicas e, quando muito intenso, levam à uma diminuição significativa na produtividade das plantas.

Segundo Akinci e Lösel (2012), o crescimento das plantas é controlado pelas taxas de divisão e aumento celular, bem como pelo fornecimento de compostos orgânicos e inorgânicos necessários para a síntese de novas paredes celulares e protoplasma. A escassez de água afeta significativamente o crescimento em extensão e a razão parte aérea-raiz em todo o nível da planta. Outros efeitos do estresse hídrico incluem uma redução na absorção de nutrientes, no crescimento

celular, na expansão foliar e também uma redução na assimilação, translocação e transpiração. Muitos nutrientes são absorvidos ativamente pelas plantas, no entanto, a capacidade das raízes das plantas em absorver água e nutrientes geralmente diminui em plantas estressadas, supostamente por haver também um declínio na demanda por nutrientes.

5.7 Metabólitos globais identificados em cada tratamento

Na Tabela 6 é possível observar o número de metabólitos identificados por blocos e tratamentos. Foi possível identificar o maior número de metabólitos em comum aos 3 blocos, no tratamento S100 (85 metabólitos), seguidos dos tratamentos S30, T30, T100 (82, 80 e 78, respectivamente). Enquanto que o maior número de diferentes metabólitos foi encontrado no tratamento S30 (94 metabólitos), seguido pelos tratamentos S100, T30 e T100 (com 93, 91 e 90 metabólitos, respectivamente).

Tabela 6 - Sumário do número de metabólitos identificados por blocos e tratamentos

Tratamento	Nº de metabólitos identificado ^a			Nº de metabólitos em comum ^b	Diferentes metabólitos encontrados por tratamento ^c
	B1	B2	B3		
S100	89	89	88	85	93
S30	89	86	92	82	94
T100	88	89	79	78	90
T30	83	89	89	80	91

^a B1,B2 e B3 se referem às replicatas 1, 2 e 3, que compuseram o design experimental nos blocos 1, 2 e 3, respectivamente. ^b Número de metabólitos em comum identificado nas 3 replicatas. ^c Número total de diferentes metabólitos encontrados por tratamento.

5.8 Contribuição dos metabólitos de folha para a separação dos tratamentos e vias metabólicas

As abundâncias relativas dos metabólitos conhecidos foram determinadas em todas as amostras. Os dados foram submetidos à análise PLS-DA (Figura 11), e seus *scores plot* revelaram uma clara separação dos 4 tratamentos e das 3

repetições biológicas (B1, B2 e B3) de cada tratamento sempre se agrupando conjuntamente, demonstrando a elevada reprodutibilidade das diferentes repetições e o efeito significativo e diferencial dos tratamentos ao nível metabólico.

Figura 11- Análise PLS-DA dos metabólitos de folhas de *E. grandis* x *E. camaldulensis* dos tratamentos S100, S30, T100 e T30

Na Figura 12 é possível observar resultados da análise *VIP score*, no qual foram identificados os metabólitos mais importantes associados ao estresse hídrico em folhas de *Eucalyptus*, estes foram ranqueados em ordem decrescente de importância. É possível observar que os metabólitos com *VIP score* $\geq 1,5$ foram considerados estatisticamente significativos. A legenda central da Figura 12 indica que houve um aumento (identificado em preto) ou diminuição (identificado em branco) em abundância no metabólito. Os metabólitos significativamente mais expressos no tratamento de déficit hídrico são *galactinol*, *creatinine* e *cellobiose*. Estes 3 metabólitos estão mais expressos no T30 em relação aos outros tratamentos. Acredita-se que estes metabólitos estão relacionados ao aumento do potencial osmótico da célula como uma resposta ao estresse hídrico, como poderá ser observado mais adiante.

Figura 12- VIP score (Importância da variável em projeção) dos metabólitos: importantes fatores identificados por análise PLS-DA em uma ordem decrescente de importância. VIP scores $\geq 1,5$ foram considerados estatisticamente significativos. Altos valores de VIP scores indicam uma boa contribuição dos metabólitos para a separação dos grupos. As caixas à direita indicam uma concentração relativa do metabólito correspondente em cada grupo de estudo, as caixas pretas indicam uma maior abundância de determinado metabólito enquanto que a branca indica uma menor abundância

Em relação às vias metabólicas (Figura 12 à direita), é possível indicar o metabolismo da purina e arginina como sendo o mais apontado em relação às alterações existentes entre os tratamentos, já que esta via está relacionada a diversos metabólitos identificados pela análise VIP score. Esta via foi mais frequente nos tratamentos em 100% da CC do que nos de 30% da CC, assim acredita-se que esta via não possui uma relação estreita com o déficit hídrico em plantas.

O déficit hídrico afeta numerosos processos metabólicos em plantas, incluindo a síntese de metabólitos primários, tais como, aminoácidos, ácidos orgânicos e

carboidratos (ZHAOLONG et al., 2012; HU et al., 2010; SEKI et al., 2007). Alguns metabólitos primários servem como reservas de energia, osmólitos que mantêm a turgescência das células, antioxidantes, bioprodutos do estresse, ou como moléculas de transdução de sinais e são os principais solutos responsivos ao déficit hídrico, que são conhecidos por desempenhar papéis críticos na adaptação das plantas à seca como ácidos orgânicos, açúcares, alcoóis de açúcar, aminoácidos e aminas (ZHAOLONG et al., 2012; SEKI et al., 2007; BARTELS; SUNKAR, 2005; SHULAEV et al., 2008).

Diferentes metabólitos podem acumular-se em resposta ao estresse hídrico, em diferentes espécies de plantas, e isto depende do grau de tolerância à seca da planta e da gravidade do déficit hídrico existente (ZHAOLONG et al., 2012.; RIZHSKY et al., 2004).

Conforme Evers et al. (2010), sob prolongado estresse, a *UDP-glucose-4-epimerase* foi fortemente induzida em dois clones de batata que diferiam em tolerância à seca. Esta enzima contribui para a regulação de um conjunto de monossacarídeos disponíveis para a produção de pectina (REITER e VANZIN, 2001), mas esta enzima também está envolvida na biossíntese de *galactinol*, *stachyose* e *raffinose*. Neste trabalho, a síntese de *galactinol* foi significativamente mais expressa em plantas submetidas ao déficit hídrico, e se expressa mais intensamente nas plantas expostas a 49 dias de retenção de irrigação quando comparada às plantas sob 28 dias de retenção de irrigação. Este gene age na síntese de *galactinol* a partir de UDP galactose e myo-inositol. Em *A. thaliana*, a síntese de *galactinol* aumentou durante a seca e sua superexpressão aumentou a tolerância à seca (TAJI et al., 2002). Ambos *UDP-glucose-4-epimerase* e síntese de *galactinol* apresentam papéis chaves na biossíntese da família de oligossacarídeos *raffinose*. A superexpressão de *UDP glucose-4-epimerase* em *A. thaliana* transgênica conferiu tolerância ao estresse salino, à seca e ao congelamento, provavelmente por aumentar os níveis de açúcar-álcool derivado da galactose (LIU et al., 2007).

Conforme Zhou et al. (2015) sob condições de seca, as células das plantas podem acumular uma variedade de pequenas moléculas orgânicas incluindo açúcares, aminoácidos e compostos relacionados (BOHNERT et al., 1995). Açúcares solúveis são conhecidos por regular a pressão osmótica das plantas, como o amido e a sacarose (PATAKAS et al., 2002 e RUAN et al., 2010). A exposição à

seca induz a hidrolização de polissacarídeos e a acúmulo de açúcares solúveis, levando a uma diminuição no potencial osmótico da planta (DEJARDIN et al., 1999 e CHAVES et al., 2003). Em relação à degradação de amido, um único gene da *beta-glucosidase bglX*, que converte celulose em celobiose e outro gene que codifica uma *endoglucanase* podem estar envolvidos na conversão de celobiose em β -D-Glucose. Esses resultados sugerem que os metabolismos dos polissacarídeos e dissacarídeos tendem a promover os processos de degradação de substâncias submetidas a condições de seca para aumentar a solubilidade destas e enfraquecer a pressão osmótica na planta.

Lanaras et al. (2006) e Farres et al. (2002) observaram que a *creatine kinase*, uma enzima chave na homeostase da energia celular em vertebrados oferece um aumento na tolerância a estresses em plantas transformadas. A creatinina funciona quando se liga a fosfatos proporcionando uma recarga de energia e ajudando na recuperação das plantas em condições de seca (AZMAT et al., 2009).

Também houve a identificação do metabólito prolina mais expresso no tratamento T100. Conforme Zhou et al. (2015), a prolina pode ser funcional como um mediador de ajuste osmótico, um estabilizador de macromoléculas, um soluto compatível para proteger as enzimas e servir como um estoque de carbono e nitrogênio para a utilização destes durante o déficit hídrico ou outros tipos de estresses (ASHRAF e FOOLAD, 2007; DELAUNEY e VERMA, 1993). Em *A. thaliana*, as concentrações de prolina aumentaram ligeiramente em condições de estresse hídrico leve e atingiu um nível notável sob estresse hídrico forte (SPERDOULI e MOUSTAKAS, 2012; VERSLUES et al., 2014). A prolina é muito apontada como estando relacionada à estresses, mas no trabalho de Mattioli et al. (2009) é possível observar que a prolina possui outras funções importantes como a de florescimento e desenvolvimento das plantas, e possui importância especial na fase reprodutiva (na transição da fase de florescimento para desenvolvimento de sementes), mas seus mecanismos moleculares e genéticos ainda precisam ser estabelecidos.

Segundo Chaves et al. (2009), alguns açúcares solúveis (como sacarose, glicose e frutose) são alterados pelo déficit hídrico e salino e atuam como moléculas de sinalização do estresse (CHAVES et al., 2004), interagindo com hormônios para auxiliar na rede de sinalização em plantas (ROLLAND et al., 2006). A principal fonte de sinais da glicose é a quebra transitória do amido dos cloroplastos durante a noite.

Em geral, de acordo com o estresse hídrico e salino, açúcares solúveis tendem a aumentar, enquanto o teor de amido diminui (CHAVES, 1991). Os açúcares irão modificar a expressão gênica e os padrões proteômicos, principalmente daqueles relacionados ao metabolismo fotossintético. É reconhecido que os genes transcritos envolvidos na fotossíntese ou em outras atividades como exportação de fotoassimilados e mobilização de nutrientes serão reduzidos sob alto teor de açúcar, enquanto que aqueles relacionados à degradação de carboidratos, síntese e armazenamento de polissacarídeos, lipídeos e proteínas serão induzidos (STITT et al., 2007).

Em ANEXOS (Tabela 9) é possível observar maiores detalhes dos metabólitos identificados como: descrição dos metabólitos, índice do tempo de retenção, VIPs scores, etc.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível observar a ocorrência de mudanças fisiológicas e moleculares, que ocorrem ao nível de proteínas e metabólitos primários, em folhas de genótipos de *Eucalyptus* tolerantes e susceptíveis à seca. Este trabalho nos ajuda a compreender as respostas que estes diferentes genótipos expressam quando estão submetidos ao déficit hídrico e pode nos ajudar a ter uma percepção mais profunda sobre o funcionamento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta e tolerância à seca nesta espécie. Os resultados mostraram que existem diferentes características fisiológicas e moleculares que separam ambos os genótipos em diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico. Foi possível identificar muitas proteínas relacionadas à homeostase celular, fotossíntese, resposta ao estresse, resposta ao estímulo abiótico e morte celular expressas em condições de seca. Muitos metabólitos primários e suas vias são também alterados na presença de déficit hídrico e isso pode variar de acordo com a tolerância do genótipo à seca e a intensidade do estresse hídrico imposto. Estudos relacionados a respostas moleculares das folhas ao déficit hídrico em *Eucalyptus* são escassos de modo que este trabalho complementa estes poucos estudos. Análises adicionais são necessárias para elucidar os comportamentos das proteínas, assim como dos metabólitos primários-chaves relacionados à resposta ao déficit hídrico em folhas de *Eucalyptus*.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P.K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.
- AKINCI, S.; LÖSEL, D.M. Plant water stress response mechanisms. In: Rehman, M. (Ed) **Water stress**. London: In Tech, 2012. p. 15-42.
- ALI, G.M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 2, p. 396–403, 2006.
- AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University (Science)**, Saudi Arabia, v. 23, n. 2, p. 139–150, 2011.
- AMBAVARAM, M.M.R.; BASU, S.; KRISHNAN, A.; RAMEGOWDA, V.; BATLANG, U.; RAHMAN, L.; BAISAKH, N.; PEREIRA, A. Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 5302, 2014.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARANJUELO, I.; MOLERO, G.; ERICE, G.; AVICE, J. C.; NOGUÉS, S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 111-23, 2011.
- ARIKE, L.; PEIL, L. Spectral counting label-free proteomics. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 1156, p. 213-22, 2014.
- ARNER, E.S.J; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 6102–6109, 2000.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, London, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 59, p. 206–16, 2007.
- AZMAT, R.; HAIDER, S.; NASREEN, H.; AZIZ, F.; RIAZ, M. A viable alternative mechanism in adapting the plants to heavy metal environment. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 6, p. 2729-2738, 2009.

BARREIROS, R. M.; GONÇALVES, J. L. M.; SANSÍGOLO, C. A.; POGGIANI, F. Modificações na produtividade e nas características físicas e químicas da madeira de *Eucalyptus grandis* causadas pela adubação com lodo de esgoto tratado. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.1, p.103-111, 2007.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23–58, 2005.

BARTHOLOMÉ, J.; MANDROU, E.; MABIALA, A.; JENKINS, J.; NABIHOUDINE, I.; KLOPP, C.; SCHMUTZ, J.; PLOMION, C.; GION, J.-M. High-resolution genetic maps of *Eucalyptus* improve *Eucalyptus grandis* genome assembly. **New Phytologist**, Oxford, v. 206, p. 1283–1296, 2015.

BAZARGANI, M. M.; SARHADI, E.; BUSHEHRI, A.-A. S.; MATROS, A.; MOCK, H.-P.; NAGHAVI, M.-R.; HAJIHOSEINI, V.; MARDI, M.; HAJIREZAEI, M.-R.; MORADI, F.; EHDAIE, B.; SALEKDEH, G. H. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 10, p. 1959-1973, 2011.

BEDON, F.; VILLAR, E.; VINCENT, D.; DUPUY, J.-W.; LOMENECH, A.-M.; MABIALANGOMA, A.; CHAUMEIL, P.; BARRÉ, A.; PLOMION, C.; GION, J.-M. Proteomic plasticity of two *Eucalyptus* genotypes under contrasted water regimes in the field. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 35, n. 4, p. 790–805, 2012.

BENHAR, M.; FORRESTER, M.T.; HESS, D.T.; STAMLER, J.S. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. **Science**, Washington, v. 320, n. 5879, p.1050–1054, 2008.

BERRY, J.O.; YERRAMSETTY, P.; ZIELINSKI, A.M.; MURE, C.M. Photosynthetic gene expression in higher plants. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 117, n. 1-3, p.91-120, 2013.

BIAMONTI, G.; CACERES, J.F. Cellular stress and RNA splicing. **Trends in Biochemical Sciences**, Glasgow, v. 34, n.3, p. 146–153, 2009.

BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, Hockville, v.7, p. 1099–1111, 1995.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSON, R. D.; KLEINIG, D. A.; MCDONALD, M. W.; TURNER, J. D. **Forest Trees of Australia**, Melbourne: CSIRO, 2006, 736p.

BONHOMME, L.; MONCLUS, R.; VINCENT, D.; CARPIN, S.; CLAVEROL, S.; LOMENECH, A.M.; LABAS, V.; PLOMION, C.; BRIGNOLAS, F.; MORABITO, D. Genetic variation and drought response in two *Populus x euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.70, n. 8, p. 988–1002, 2009a.

BONHOMME, L.; MONCLUS, R.; VINCENT, D.; CARPIN, S.; LOMENECH, A.M.; PLOMION, C.; BRIGNOLAS, F.; MORABITO, D. Leaf proteome analysis of eight *Populus xeuramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 17, p. 4121–4142, 2009b.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Filadélfia, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BUKHOV, N. G.; WIESE, C.; NEIMANIS, S.; HEBER, U. Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 59, p. 81–93, 1999.

BUNDY, J. G.; DAVEY, M.P.; VIANT, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**, Berlin, v.5, p. 3–21, 2009.

BURSSSENS, S.; HIMANEN, K.; VAN DE COTTE, B.; BEECKMAN, T.; VAN MONTAGU, M.; HIZE, D.; VERBRUGGEN, N. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Switzerland, v. 211, p. 632-640, 2000.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T.; (Ed.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.95-105.

CANNON, W. B. Organization for physiological homeostasis. **Physiological Reviews**, Boston, v. 9 n. 3, p. 399-431, 1929.

CAPUANO, F.; BOND, N. J.; GATTO, L. BEAUDOIN, F. NAPIER, J. A.; BENVENUTO, E.; LILLEY, K. S.; BASCHIERI, S. LC-MS/MS Methods for Absolute Quantification and Identification of Proteins Associated with Chimeric Plant Oil Bodies. **Analytical Chemistry**, New York, v. 83, n. 24, p. 9267–9272, 2011.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; VAN ONCKELEN, H.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: Acclimation to osmotic stress. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 1, p. 92–105, 2007.

CAZZANIGA, S.; LI, Z.; NIYOGI, K.K.; BASSI, R.; DALL'OSTO, L. The *Arabidopsis* *szl1* mutant reveals a critical role of β -carotene in photosystem I photoprotection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 159, p. 1745–1758, 2012.

CENTRITTO, M.; LORETO, F.; CHARTZOULAKIS, K. The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive samplings. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 26, p. 585-594, 2003.

CHANDRAMOULI, K.; QIAN, P-Y. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. **Human Genomics and Proteomics**, Bethesda, v. 2009, p. 1-91, 2009.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, p. 239–264, 2003.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, p. 4, p. 551–560, 2009.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1–16, 1991.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 2365–2384, 2004.

CLARKE, J. E.; JOHNSON, G. N. In vivo temperature dependence of cyclic and pseudocyclic electron transport in barley. **Planta**, Switzerland, v.212, p. 808–816, 2001.

COLLET, J.-F.; MESSENS, J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. **Antioxidants & redox signaling**, New York, v. 13, n. 8, 2010.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics: Applications Note**, Oxford, v. 21, n. 18, 3674–3676, 2005.

CORREIA, B.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; NEVES, L.; BROSSA, R.; DIAS, M. C.; COSTA, A.; CASTRO, B. B.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C.; CHAVES, M. M.; PINTO, G. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 150, p. 580–592. 2014.

CRAMER, G.R.; ERGUL, A.; GRIMPLET, J.; TILLET, R.L.; TATTERSALL, E.A.; BOHLMAN, M.C.; VINCENT, D.; SONDEREGGER, J.; EVANS, J.; OSBORNE, C.; QUILICI, D.; SCHLAUCH, K.A.; SCHOOLEY, D.A.; CUSHMAN, J.C. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. **Functional & Integrative Genomics**, Switzerland, v.7, n.2, p.111–134, 2007.

CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PEÑA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M. A. Target Search - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, n. 428, p. 1-12, 2009.

CUTLER, S.R.; RODRIGUEZ, P.L.; FINKELSTEIN, R.R.; ABRAMS, S.R. Absciscic acid: Emergence of a core signaling network. **Annual Reviews in Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 651-679, 2010.

DE MAIO, A., Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock (Augusta, Ga.) Journal**, Toronto, v. 11, p. 1–12, 1999.

DEJARDIN, A.; SOKOLOV, L.; KLECZKOWSKI, L. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, London, v. 344, p. 503–9, 1999.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 215–23, 1993.

DELBONE, C. A. C. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: CONGRESSO DE EDUCAÇÃO DO NORTE PIONEIRO, 10., 2010, Jacarezinho. **Anais...Jacarezinho**: UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná – Centro de Ciências Humanas e da Educação e Centro de Letras Comunicação e Artes, 2010. p. 396-404.

DÍAZ-ESPEJO, A.; WALCROFT, A.S.; FERNÁNDEZ, J.E.; HAFIDI, B.; PALOMO, M.J.; GIRÓN, I.F. Modelling photosynthesis in olive leaves under drought conditions. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, p. 1445-1456, 2006.

DODD, I.C. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of “up” in the up and down world of long-distance signalling in planta. **Plant Soil**, The Hague, v. 274, p. 251-270, 2005.

DREESEN, P.E.; DE BOECK, H.J.; JANSSENS, I.A.; NIJS, I. Summer heat and drought extremes trigger unexpected changes in productivity of a temperate annual/biannual plant community. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 79, p. 21-30, 2012.

EBERHARD, S.; FINAZZI, G.; WOLLMAN, F.A. The dynamics of photosynthesis. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, n. 9, p. 463–515, 2008.

ELSTNER, E. F. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELLAND, E.J.; STEFFEN, K. L. (Eds). **Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism**. Rockville: Ed. American Society of Plant Physiologists, 1991. p. 13–25.

EMERY, F.S.; SANTOS, G.B.; BIANCHI, R.C. **A química na natureza. Coleção química no cotidiano**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. v. 7, 70p.

EVERS, D.; LEFEVRE, I.; LEGAY, S.; LAMOUREUX, D.; HAUSMAN, J.-F.; ROSALES, R.O.G.; MARCA, L.R.T.; HOFFMANN, L.; BONIERBALE, M.; SCHAFLEITNER, R. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-17, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global forest resources assessment** – main report, Rome, 2010. 378 p. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/013/i1757e/i1757e.pdf>>. Acesso em 04 dez. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **State of the world's forests**. FAO, Rome, 2011. 179 p. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/013/i2000e/i2000e00.htm>> Acesso em 20 dez. 2015.

FARRES, J.; HOLMBERG, N.; SCHLATTNER, U.; BAILEY, J.E.; WALLIMANN, T.; KALLIO, P.T. Expressing creatine kinase in transgenic tobacco: a first step towards introducing an energy buffering system in plants. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 11, p. 49-59, 2002.

FÁVERO, O. A.; PAVAN, S. **Botânica Econômica**. São Paulo: Catalise Editora, 1997.175p.

FENNING, T. M.; GERSHENZON, J. Where will the wood come from? Plantation forestry and a role for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 20, n. 7, p. 291–296, 2002.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 48, p. 155–171, 2002.

FLEXAS J.; RIBAS CARBÓ M.; DIAZ ESPEJO A.; GALMES J.; MEDRANO H. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell & Environment**, New York, v.31, p. 602–621, 2008.

FLEXAS, J.; ESCALONA, J.M.; MEDRANO, H. Water stress induced different photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevine. **Plant, Cell & Environment**, New York, v.121, p.39-48, 1999.

FLEXAS, J.; DÍAZ-ESPEJO, A.; BERRY, J. A.; CIFRE, J.; GALMÉS, J.; KALDENHOFF, R.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1533-1543, 2007.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J.M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.29, p.461-471, 2002.

FLEXAS, J.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; KALDENHOFF, R.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 30, p.1284–1298, 2007.

FORD, K. L.; CASSIN, A.; BACIC, A. Quantitative Proteomic Analysis of Wheat Cultivars with Differing Drought Stress Tolerance. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 2, n.44, 2011.

FOYER C.H.; NOCTOR G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, p. 355–364, 2003.

FOYER, C.H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 1637–1661, 2012.

GAMMULLA, C. G.; PASCOVICI, D.; ATWELL, B. J.; HAYNES, P. A. Differential metabolic response of cultured rice (*Oryza sativa*) cells exposed to high- and low-temperature stress. **Proteomics**, Weinheim, v.10, n. 16, p. 3001–3019, 2010.

GAMMULLA, C. G.; PASCOVICI, D.; ATWELL, B. J.; HAYNES, P. A. Differential proteomic response of rice (*Oryza sativa*) leaves exposed to high- and low-temperature stress. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 14, p. 2839–2850, 2011.

GEORGE, I.S.; PASCOVICI, D.; MIRZAEI, M.; HAYNES, P.A. Quantitative proteomic analysis of cabernet sauvignon grape cells exposed to thermal stresses reveals alterations in sugar and phenylpropanoid metabolism. **Proteomics**, Weinheim, v.15, n. 17, p. 3048-60, 2015.

GOMES, A.P.; BLENIS, J. A nexus for cellular homeostasis: the interplay between metabolic and signal transduction pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 34, p. 110–117, 2015.

GONÇALVES, M. R.; PASSOS, C. A. M. Crescimento de cinco espécies de eucalipto submetidas a déficit hídrico em dois níveis de fósforo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 145-161, 2000.

GUENTHER, A. The contribution of reactive carbon emissions from vegetation to the carbon 10 balance of terrestrial ecosystems. **Chemosphere**, Oxford, v. 49, p. 837-844, 2002.

GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, Filadélfia, v. 331, p. 283–295, 2004.

GUPTA, S.C.; SHARMA, A.; MISHRA, M.; MISHRA, R.; CHOWDHURI, D.K. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? **Life Sciences**, Oxford, v. 86, p. 377–384, 2010.

HAJHEIDARI, M.; ABDOLLAHIAN-NOGHABI, M.; ASKARI, H.; HEIDARI, M.; SADEGHIAN, S. Y.; OBER, E. S.; HOSSEINI SALEKDEH, G. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 4, p. 950–960, 2005.

HAND, S.C.; MENZE, M. A.; TONER, M.; BOSWELL, L.; MOORE, D. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p.115-34, 2011.

HARB, A.; KRISHNAN, A.; AMBAVARAM, M. M. R.; PEREIRA, A. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, p. 1254–1271, 2010.

HAYWARD, S.; TANI, A.; OWEN, S.M.; HEWITT, C.N. On-line analysis of volatile organic compound emissions from Sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, p. 721–728, 2004.

HEBBELMANN, I.; SELINSKI, J.; WEHMEYER, C.; GOSS, T.; VOSS, I.; MULO, P.; KANGASJÄRVI, S.; ARO, E.-M.; OELZE, M.-L.; DIETZ, K.-J.; NUNES-NESI, A.; DO, P.T.; FERNIE, A.R.; TALLA, S.K.; RAGHAVENDRA, A.S.; LINKE, V.; SCHEIBE, R. Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, n. 3, p. 1445–1459, 2012.

HERNÁNDEZ, I.; CELA, J.; ALEGRE, L.; MUNNE-BOSCH, S. Antioxidant defenses against drought stress. In: AROCA, R. (Ed.). **Plant Responses to Drought Stress: from Morphological to Molecular Features**. Berlin: Springer, 2012. p. 231–258.

HIROTA, K.; MURATA, M.; SACHI, Y.; NAKAMURA, H.; TAKEUCHI, J.; MORI, K.; YODOI, J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- κ B. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p. 27891–27897, 1999.

HOFFMAN, D. E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 33, p. 1298–1313, 2010.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, p. 13963–13966, 1989.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 54, p. 237–271, 1985.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, New York, v. 252, p. 199–208, 1995.

HU, L.; WANG, Z.; DU, H.; HUANG, B. Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common bermudagrass genotypes differing in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 167, n.2, p. 103–109, 2010.

HUANG, W.; YANG, S. J.; ZHANG, S. B.; ZHANG, J. L.; CAO, K. F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress. **Planta**, Berlin, v. 235, p. 819–828, 2012.

HUANG, W.; ZHANG, S. B.; CAO, K. F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 297–305, 2011.

HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLE, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v.154, n.1, p. 357–372, 2010.

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

IGLESIAS, G.T.; WISTERMANN, D. *Eucalyptus universalis*. Global cultivated *Eucalyptus* forest map. **Eucalyptologics**: Information on *Eucalyptus* cultivation worldwide. GIT Forestry Consulting. Disponível em: <www.git-forestry.com>. Acesso em: 15 jun. 2014.

ITURRIAGA, G.; CUSHMAN, M.A.F.; CUSHMAN, J.C. An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. **Plant Science**, Oxford, v. 170, p. 1173–1184, 2006.

JOHNSON, H. E.; BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; SMITH, A. R. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 919–928, 2003.

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

KELLISON, R.C. Present and future uses of eucalyptus wood in the world. In: DEVELOPING THE EUCALYPT OF THE FUTURE, 2001, Valdivia. **International Symposium Developing the eucalypt of the future**: proceedings...Valdivia: INFOR, 2001. 1 CD-ROM.

KERN, R.; MALKI, A.; HOLMGREN, A.; RICHARME, G. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, London, v. 371, p. 965–972, 2003.

KESSELMEIER, J.; CICCIOLO, P.; KUHN, U.; STEFANI, P.; BIESENTHAL, T.; ROTTENBERGER, S.; WOLF, A.; VITULLO, M.; VALENTINI, R.; NOBRE, A.; KABAT, P.; ANDREAE, M.O. Volatile organic compound emissions in relation to plant carbon fixation and the terrestrial carbon budget. **Global Biogeochemical Cycles**, Malden, v. 16, n. 4, p. 1126, 2002.

KIM, M.; KIM, H.; LEE, W.; LEE, Y.; KWON, S.-W.; LEE, J. Quantitative Shotgun Proteomics Analysis of Rice Anther Proteins after Exposure to High Temperature. **International Journal of Genomics**, London, v. 2015, Article ID 238704, 9 pages, 2015.

KIZIS, D.; PAGÈS, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 679–689, 2002.

KOMATSU, S.; HOSSAIN, Z. Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, 71, 2013.

KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKEMEYER, C.; USADEL, B.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P.; WECKWERTH, W.; GIBON, Y.; STITT, M.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; STEINHAUSER, D. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 1635-1638, 2005.

KOPP, J.; KOPRIVA, S.; SÜSS, K.H.; SCHULZ, G.E. Structure and mechanism of the amphibolic enzyme D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from potato chloroplasts. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 287, n. 4, p. 761-771, 1999.

KUBOTA, K.; KOSAKA, T.; ICHIKAWA, K. Shotgun protein analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 519, p. 483-94, 2009.

LANARAS, T.; MOUSTAKAS, M.; SYMEONIDIS, L.; DIAMANTOGLIOU, S.; KARATAGLIS, S. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 307-314, 2006.

LANDINO, L.M.; SKRESLET, T.E.; ALSTON, J.A. Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: Modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 35101– 35105, 2004.

LATA, C.; YADAV, A.; PRASAD, M. Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. In: SHANKER, A.; VENKATESHWARULU, B. (Eds) **Abiotic Stress Response in Plants**, Rijeka: INTECH Open Access Publishers, 2011. p. 269–296.

LAURENT, T.C.; MOORE, E.C.; REICHARD, P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. B. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 239, p. 3436–3444, 1964.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 25, p. 275–294, 2002.

LEE, J; KOH, H.-J. A label-free quantitative shotgun proteomics analysis of rice grain development. **Proteome Science**, London, v. 9, n. 1, p. 61, 2011.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. 975 p.

LENKA, S. K.; KATIYAR, A.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K. C. Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 315–327, 2011

LI, C.; BERNINGER, F.; KOSKELA, J.; SONNINEN, E. Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 27, p. 231–238, 2000.

LIBARDI, P. L. **Dinâmica da água no solo**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. 335 p.

LIU, H.; DAI, X.; XU, Y.; CHONG, K. Over-expression of OsUGE1 altered raffinose level and tolerance to abiotic stress but not morphology in Arabidopsis. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 164, p. 1384–1390, 2007.

LLUSIA, J.; PENUELAS, J.; ALESSIO, G. A.; ESTIARTE, M. Contrasting species-specific, compound-specific, seasonal, and inter annual responses of foliar isoprenoid emissions to experimental drought in a mediterranean shrubland. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, p. 637–645, 2008.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 4, p. 1781–1787, 2001.

MAGGIO, A.; JOLY, R. J. Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems: Evidence for a channel-mediated water pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n.1, p. 331–335, 1995.

MARTIN, H.; DEAN, M. Identification of a thioredoxin-related protein associated with plasma membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 175, p. 123–128, 1991.

MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Proline accumulation in plants: Not only stress. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 4, n.11, p. 1016–1018, 2009.

MCCREE, K. J.; RICHARDSON, S. G. Stomatal closure vs. osmotic adjustment: A comparison of stress responses. **Crop Science**, Madison, v. 27, n.3, p. 539–543, 1987.

MEDRANO, H.; ESCALONA, J.; BOTA, J.; GULIAS, J.; FLEXAS, J. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 895–905, 2002.

MERCHANT, A.; CALLISTER, A.; ARNDT, S.; TAUSZ, M.; ADAMS, M. Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p. 1507–1515, 2007.

MESSENS, J.; SILVER, S. Arsenate reduction: Thiol cascade chemistry with convergent evolution. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 362, p. 1–17, 2006.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 33, p. 453–467, 2010.

MIRZAEI, M.; PASCOVICI, D.; ATWELL, B. J.; HAYNES, P. A. Differential regulation of aquaporins and small GTPases in rice leaves subjected to drought stress and recovery. **Proteomics**, Weinheim, v. 12, n. 6, p. 864-77, 2012.

MIRZAEI, M.; SOLTANI, N.; SARHADI, E.; PASCOVICI, D.; KEIGHLEY, T.; SALEKDEH, G.H.; HAYNES, P. A.; ATWELL, B.J. Shotgun Proteomic Analysis of Long-distance Drought Signaling in Rice Roots. **Journal of Proteome Research**. Washington, v. 11, p. 348–358. 2012.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 405–410, 2002.

MITTLER, R.; KIM, Y.; SONG, L.; COUTU, J.; COUTU, A.; CIFTCI-YILMAZ, S.; LEE, H.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. Gain- and loss- of function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.580, p. 6537–6542, 2006.

MIYAKE, C.; SHINZAKI, Y.; MIYATA, M.; TOMIZAWA, K. Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, p. 1426–1433, 2004.

MIYAKE, C.; MIYATA, M.; SHINZAKI, Y.; TOMIZAWA, K. CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves: relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of chl fluorescence. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, p. 629–737, 2005.

MONSON, R.K.; FALL, R.R. Isoprene emission from aspen leaves – influence of environment and relation to photosynthesis and photorespiration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 267–274, 1989.

MONSON, R.K.; JAEGER, C.H.; ADAMS, W.W. III; DRIGGERS, E.M.; SILVER, G.M.; FALL, R. Relationships among isoprene emission rate, photosynthesis, and isoprene synthase activity as influenced by temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p.1175-1180, 1992.

MOORE, E.C.; REICHARD, P.; THELANDER, L. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 239, p. 3445–3452, 1964.

MUNEKAGE, Y.; HOJO, M.; MEURER, J.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. **Cell**, Maryland Heights, v. 110, p. 361–371, 2002.

MURAD, A.M.; RECH, E.L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnology**, London, v. 12, n. 82, 2012.

NAKAMURA, T.; NAKAMURA, H.; HOSHINO, T.; UEDA, S.; WADA, H.; YODOI, J. Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. **Antioxid Redox Signal**, New Rochelle, v. 7, p. 60–71, 2005.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. **Plant crop science Physiology**, Rockville, v. 149, p. 88– 95, 2009.

NAM, N.H.; SUBBAROA, G.V.; CHAUHAN, Y.S.; JOHANSEN, C. Importance of canopy attributes in determining dry matter accumulation of pigeon pea under contrasting moisture regimes. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 955-961, 1998.

NEILSON, K. A.; MARIANI, M.; HAYNES, P. A. Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 9, p. 1696–1706, 2011.

NIEHL, A.; ZHANG, Z.J.; KUIPER, M.; PECK, S.C.; HEINLEIN, M. Label-free quantitative proteomic analysis of systemic responses to local wounding and virus infection in Arabidopsis thaliana. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 6, p. 2491-503, 2013.

NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, p.735–742, 1995.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; ALBUQUERQUE, M.B.; SILVA, E.C. Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 22-31.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; BEZERRA NETO, E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas à déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.13, p.75-87, 2001.

NOURI, M-Z.; MOUMENI, A.; KOMATSU, S. Abiotic Stresses: Insight into Gene regulation and Protein Expression in Photosynthetic Pathways of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 9, 2015.

OLIVER, S. Yeast as a navigational aid in genome analysis. **Microbiology**, Berks, v. 143, p. 1483–1487, 1997.

OLIVEROS, J.C. **VENNY: An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams**.2007-2015. Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>. Acesso em: 25 fev.2016.

ORT, D.R. When there is too much light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 29–32, 2001.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.-S. P. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 86, 2014.

PAIVA, A.S.; FERNANDES, E.J.; RODRIGUES, T.J.D.; TURCO, J.E.P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.25, p.161-169, 2005.

PANDEY, S.; ZHANG, W.; ASSMANN, S. M. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. Minireview. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2325–2336, 2007.

PANJABI-SABHARWAL, V.; KARAN, R.; KHAN, T.; PAREEK, A. Abiotic stress responses: Complexities in gene expression. In: PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJE, E. (Eds.). **Abiotic Stress Adaptation in Plants, Physiological, molecular and genomic foundation**. Netherlands: Springer, 2010. p. 177-198.

PATAKAS, A.; NIKOLAOU, N.; ZIOZIOU, E.; RADOGLIOU, K.; NOITSAKIS, B. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, Oxford, v.163, p. 361–367, 2002.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S.ROS-Mediated Abiotic Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.6, 69, 2015.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M.M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.62, p. 869–882, 2011.

PINHEIRO, C.; PASSARINHO, J. A.; RICARDO, C. P. Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v. 161, p. 1203–1210, 2004.

PITA P.; PARDOS J.A. Growth, leaf morphology, water and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. **Tree Physiology**, Victoria, v.21, p. 599–607, 2001.

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.

PORTIS, Jr. A.R. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 75, p. 11–27, 2003.

POWIS, G.; MUSTACICH, D.; COON, A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 29, p. 312–322, 2000.

RAVI, D.; MUNIYAPPA, H.; DAS, K.C. Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 40084–40096, 2005.

REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 47, p. 95–113, 2001.

REZENDE, G. D. S. P.; RESENDE, M. D. V.; ASSIS, T. F. *Eucalyptus* Breeding for Clonal Forestry. In: FENNING, T. (Ed.). **Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century**. Springer: Forestry Sciences, 2014. p. 393-424.

- RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B.K.; YU, G. Arabidopsis transcription factor: genome wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, Washington, v. 290, p. 2105–2110, 2000.
- RISTIC, Z.; MOMČILOVIĆ, I.; BUKOVNIK, U.; PRASAD, P. V. V.; FU, J.; DERIDDER, B.P.; ELTHON, T.E.; MLADENOV, N. Rubisco activase and wheat productivity under heat-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-12, 2009.
- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n.4, p. 1683–1696, 2004.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 675–709, 2006.
- ROLLINS, J.A.; HABTE, E.; TEMPLER, S.E.; COLBY, T.; SCHMIDT, J.; VON, KORFF M. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 3201-3212, 2013.
- RUAN, Y.L.; JIN, Y.; YANG, Y.J.; LI, G.J.; BOYER, J.S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, p. 942–55, 2010.
- SABATÉ, S.; GRACIA, C.A.; SANCHEZ, A. Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 162, p. 23-37, 2002.
- SAIBO, N.J.M.; LOURENÇO, T.; OLIVEIRA, M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, p. 609-623, 2009.
- SALEKDEH, G. H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, Weinheim, v.2, n. 9, p. 1131–1145, 2002.
- SALGADO, P. R. **Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)**. 2009.109p.Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.
- SAMPOL, B.; BOTA, J.; RIERA, D.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. **New Phytologist**, Oxford, v.160, p. 403-412, 2003.

SANCHEZ, D. H.; SIAHPOOSH, M. R.; ROESSNER, U.; UDVARDI, M.; KOPKA, J. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 209–219, 2008.

SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, E.; MEDRANO, L.; MARTÍNEZ-BARAJAS, E. 1995. Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. **Biochemistry**, Washington, v.34, p. 2826–2831.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R.; KOPKA, J. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 1332–1337, 2005.

SCHEIBE, R.; BACKHAUSEN, J.E.; EMMERLICH, V.; HOLTGREFE, S. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p.1481-1489, 2005.

SCHEIBE, R. Malate valves to balance cellular energy supply. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.120, p. 21-26, 2004.

SCHULTZ, H.R. Extension of a Farquhar model for limitations of leaf photosynthesis induced by light environment, phenology and leaf age in grapevines (*Vitis vinifera* L. cvv. White Riesling and Zinfandel). **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, p.673-687, 2003.

SCHULZE, E.D.; TURNER, N.C.; NICOLLE D.; SCHUMACHER J. Leaf and wood carbon isotope ratios, specific leaf areas and wood growth of *Eucalyptus* species across a rainfall gradient in Australia. **Tree Physiology**, Victoria, v.26, p. 479–492, 2006.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n.3, 296–302. 2007.

SEMEL, Y.; SCHAUER, N.; ROESSNER, U.; ZAMIR, D.; FERNIE, A. R. Metabolite analysis for the comparison of irrigated and non-irrigated field grown tomato of varying genotype. **Metabolomics**, Los Angeles, v. 3, p. 289–295, 2007.

SHARKEY, T. D.; SCHRADER, S. M. High temperature stress. In: MADHAVA, R. A. O, K. V.; RAGHAVENDRA, A. S.; JANARDHAN REDDY, K. (Eds.) **Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants**. The Netherlands: Springer, 2006. p. 101-129.

SHARKEY, T.D.; SINGSAAS, E.L. Why plants emit isoprene. **Nature**, London, p. 374-769, 1995.

SHARKEY, T.D.; YE, S. Isoprene emission from plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 407-436, 2001.

SHARKEY, T.D.; LORETO, F.; DELWICHE, C.F. The biochemistry of isoprene emission from leaves during photosynthesis. In: SHARKEY, T.D.; HOLLAND, E.A.;

MOONEY, H.A. (Eds.) **Trace gas emissions by plants**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 153–184.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, 26p., 2012.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, n. 2, p. 199–208, 2008.

SHVALEVA, A. L.; COSTA E. SILVA, F.; BREIA, E.; JOUVE, J.; HAUSMAN, J. F.; ALMEIDA, M. H.; MAROCO, J. P.; RODRIGUES, M. L.; PEREIRA, J. S.; CHAVES, M. M. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, n. 2, p. 239–248, 2006.

SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; VISSERS, J. P.; GEROMANOS, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v.5, p.144–156, 2006.

SINGH, R.; NASKAR, J.; PATHRE, U.V.; SHIRKE, P.A. Reflectance and cyclic electron flow as an indicator of drought stress in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 90, n. 3, p. 544–551, 2014.

SMITH, A. R.; JOHNSON, H. E.; HALL, M. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sófia, v. 29, n. 3–4, p. 153–163, 2003.

SOBOTA, J.M.; IMLAY, J.A. Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v.108, n. 13, p. 5402–5407, 2011.

SOUZA, M.J.H.; RIBEIRO, A.; LEITE, H.G.; LEITE, F.P.; MINUZZI, R.B. Disponibilidade hídrica do solo e produtividade do eucalipto em três regiões da Bacia do Rio Doce. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, p.399–410, 2006.

SPERDOULI, I.; MOUSTAKAS, M. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.169, p. 577–85, 2012.

STITT, M.; GIBON, Y.; LUNN, J.E.; PIQUES, M. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 34, p. 526–549, 2007.

SUNG, S.-J. S.; XU, D.-P.; GALLOWAY, C. M.; BLACK, C. C., JR. A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, p. 650–654, 1988.

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, n. 125, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2002. 690 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 643p.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 417–426, 2002.

TARDIEU, F.; SIMMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p.419-432, 1998.

TIMPERIO, A.M.; EGIDI, M.G.; ZOLLA L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v.71, p. 391–411, 2008.

TUOMELA, K.; KOSKELA, J.; GIBSON, A. Relationship between growth, specific leaf area and water use in six populations of *Eucalyptus microtheca* seedlings from two climates grown in controlled conditions. **Australian Forestry**, Melbourne, v.64, p. 75–79, 2001.

UDVARDI, M.K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANRI, O.; MURRAY, J.; ANDRAIANKAJA, A.; ZHANG, J.-Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J.M.I.; CHENG, F. TOWN, C.D. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 538-549, 2007.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 113-122, 2006.

VALDÉS A. E.; IRAR S.; MAJADA J. P.; RODRÍGUEZ A.; FERNÁNDEZ B.; PAGÈS M. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 79, p. 263–276, 2013.

VELIKOVA, V. B. Isoprene as a tool for plant protection against abiotic stresses. **Journal of Plant Interactions**, Milton Park, v. 3, n. 1, 115, 2008.

VELLINI, A. L. T. T.; PAULA, N. F.; ALVES, P. L. C. A.; PAVANI, L. C.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, 2008.

VERSLUES, P.E.; LASKY, J.R.; JUENGER, T.E.; LIU, T.W.; KUMAR, M.N. Genome-wide association mapping combined with reverse genetics identifies new effectors of low water potential-induced proline accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 164, p.144–59, 2014.

VILLAR, E.; KLOPP, C.; NOIROT, C.; NOVAES, E.; KIRST, M.; PLOMION, C.; GION, J.M. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in *Eucalyptus*. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 538, 2011.

VINCENT, D.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; CORNIC, G.; NEGRONI, L.; ZIVY, M. Water deficits affect caffeate o-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, n. 3, p. 949–960, 2005.

WANG, X.; VIGNJEVIC, M.; JIANG, D.; JACOBSEN, S.; WOLLENWEBER, B. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 22, p. 6441–6456, 2014.

WANG, Z.; XIONG, Y.; WANG, M. Study on expert system of irrigation forecast and decision making for water saving. **Institute of Agricultural Soil Water Engineering of North West Science and Technology University of Agriculture Forestry**, Yangling, 2000.

WARREN, C. R.; ARANDA, I.; CANO, F. J. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 34, p. 1609–1629, 2011.

WARREN, C.R. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO₂ movement is increased by nutrient supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p. 2313–2321, 2004.

WEINHOLD, A.; WIELSCH, N.; SVATOŠ, A.; BALDWIN, I. T. Label-free nano UPLC-MS^E based quantification of antimicrobial peptides from the leaf apoplast of *Nicotiana attenuata*. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, n. 18. 2015.

WHITEHEAD, D.; BEADLE, C.L. Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.193, p.113–140, 2004.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, London, v.13, p. 19–50, 1996.

WILSON, K.B.; BALDOCCHI, D.D.; HANSON, P.J. Quantifying stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation resulting from leaf aging and drought in mature deciduous tree species. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 787–797, 2000.

WOLOSUIK, R. A.; BALLICORA, M. A.; AND HAGELIN, K. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic carbon dioxide assimilation: Enzyme modulation. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.7, p. 622–637, 1993.

WOODWARD, I.; SMITH, T.M.; EMANUEL, W.R. A global land primary productivity and phytogeography model. **Global Biochemical Cycles**, Washington, v. 9, p. 471-490, 1995.

XIA, J.; PSYCHOGIOS, N.; YOUNG, N.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.37, Web Server issue, W652–W660, 2009.

XIAO, X.; YANG, F.; ZHANG, S.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 136, p. 150–168, 2009.

XU, S.Z.; SUKUMAR, P.; ZENG, F.; LI, J.; JAIRAMAN, A.; ENGLISH, A.; NAYLOR, J.; CIURTIN, C.; MAJEED, Y.; MILLIGAN, C.J.; BAHNASI, Y.M.; AL-SHAWAF, E.; PORTER, K.E.; JIANG, L.H.; EMERY, P.; SIVAPRASADARAO, A.; BEECH, D.J. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. **Nature**, London, v. 451, p. 69–72, 2008.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

XU, L.; BALDOCCHI, D.D. Seasonal trends in photosynthetic parameters and stomatal conductance of blue oak (*Quercus douglasii*) under prolonged summer drought and high temperature. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, p. 865-877, 2003.

YANG, F.; WANG, Y.; MIAO, L. F. (2010) Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.139, p. 388–400, 2010.

ZHAOLONG WANG, H. D.; YU, W.; HUANG, B. Metabolic Responses of Hybrid Bermudagrass to Short-term and Long-term Drought Stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 137, n. 6, p. 411–420, 2012.

ZHOU, Z.; MA, H.; LIN, K.; ZHAO, Y.; CHEN, Y.; XIONG, Z.; WANG, L.; TIAN, B. RNA-seq Reveals Complicated Transcriptomic Responses to Drought Stress in a Nonmodel Tropic Plant, *Bombax ceiba* L., **Evolutionary bioinformatics online Journal**, Auckland, v. 11, p. 27–37, 2015.

ZHOU, Y.H.; YU, J.Q.; HUANG, L.F.; NOGUES, S. The relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and water–water cycle in chill-exposed cucumber leaves under low light and subsequent recovery. **Plant, Cell & Environment**, New York, v.27, p. 1503-1514, 2004.

ZINGARETTI, S. M.; INÁCIO, M. C.; PEREIRA, L. M.; PAZ, T. A.; FRANÇA, S. C. Water Stress and Agriculture. In: AKINCI, S. **Responses of Organisms to Water Stress**. 2013. p. 151- 179. Croatia: InTech, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5772/53877>>. Acesso em: 01 jan. 2016.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continua)

Acesso	Análise de expressão S100/S30	PLGS				
http://www.phytozome.net/	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	S100/S30	Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p- Value
Eucgr.J02596.2 PACid:23600754	20S Proteasome Alpha Subunit E2	667,27	1.34	0,29	0,16	1
Eucgr.I02744.1 PACid:23597539	2Fe-2S Ferredoxin-Like Superfamily Protein	15138,7	1.54	0,43	0,07	1
Eucgr.B01439.2 PACid:23566576	2-Phosphoglycolate Phosphatase 1	6004,08	0.95	-0,05	0,1	0,15
Eucgr.B00177.1 PACid:23565240	31-Kda Rna Binding Protein	8705,87	0.62	-0,48	0,07	0
Eucgr.B02495.1 PACid:23567656	4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphate Synthase	581,56	S100	-	-	-
Eucgr.A00378.1 PACid:23562075	60S Acidic Ribosomal Protein Family	5386	0.64	-0,45	0,15	0
Eucgr.F01600.1 PACid:23582310	Aaa-Type Atpase Family Protein	435,69	S100	-	-	-
Eucgr.J00982.3 PACid:23598884	Act Domain-Containing Protein	233,72	S30	-	-	-
Eucgr.B00131.2 PACid:23565188	Adenylate Kinase 1	2225,74	1.15	0,14	0,12	1
Eucgr.B03720.1 PACid:23569105	Alanine:Glyoxylate Aminotransferase	2357,28	1.34	0,29	0,1	1
Eucgr.F02744.5 PACid:23583627	Alcohol Dehydrogenase 1	2261,37	S100	-	-	-
Eucgr.C02594.2 PACid:23572062	Aldehyde Dehydrogenase 11A3	1161,1	1.36	0,31	0,24	1
Eucgr.F02017.1 PACid:23582769	Aldolase Superfamily Protein	3823,67	1.40	0,34	0,06	1
Eucgr.A01538.2 PACid:23563326	Aldolase Superfamily Protein	1702,24	1.77	0,57	0,13	1
Eucgr.K02073.2 PACid:23603584	Aldolase Superfamily Protein	2460,2	1.67	0,51	0,09	1
Eucgr.F01413.2 PACid:23582096	Aldolase-Type Tim Barrel Family Protein	7381,71	1.23	0,21	0,05	1
Eucgr.K02981.1 PACid:23604658	Aldolase-Type Tim Barrel Family Protein	1693,05	1.19	0,17	0,16	0,98
Eucgr.J00965.2 PACid:23598867	Ascorbate Peroxidase 1	2426,35	S100	-	-	-
Eucgr.B02456.1 PACid:23567596	Ascorbate Peroxidase 1	4529,5	S100	-	-	-
Eucgr.G02804.1 PACid:23588544	Atp Synthase D Chain, Mitochondrial	2488,31	1.02	0,02	0,11	0,67
Eucgr.F04149.2 PACid:23585410	Atp Synthase Delta-Subunit Gene	7622,35	0.76	-0,27	0,04	0
Eucgr.J02738.1 PACid:23600870	Atp Synthase Subunit Beta	52757,95	1.00	0	0,16	0,47
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	Atpase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	2707,21	S100	-	-	-
Eucgr.E01702.1 PACid:23578383	Atpase, F1 Complex, Delta/Epsilon Subunit	1828,07	S100	-	-	-
Eucgr.E04053.1 PACid:23580342	Atpase, F1 Complex, Gamma Subunit Protein	9112,5	0.86	-0,15	0,04	0
Eucgr.G01788.2 PACid:23587357	Atpase, V1 Complex, Subunit B Protein	396,09	S100	-	-	-
Eucgr.D01612.1 PACid:23575360	Beta-6 Tubulin	1815,44	S100	-	-	-
Eucgr.D01990.1 PACid:23575797	Calcium-Binding Ef-Hand Family Protein	1274,73	1.58	0,46	0,19	1
Eucgr.G02165.1 PACid:23587748	Calcium-Dependent Lipid-Binding (Calb Domain) Family Protein	702,38	S30	-	-	-
Eucgr.I01790.1 PACid:23596486	Carbonic Anhydrase 1	20167,94	0.83	-0,19	0,04	0
Eucgr.F03557.1 PACid:23584686	Catalase 2	1524,81	0.93	-0,07	0,08	0,08
Eucgr.F01776.1 PACid:23582512	Catalase 2	2489,24	1.14	0,13	0,06	1
Eucgr.G01934.1 PACid:23587507	Ccr-Like	3688,12	S100	-	-	-
Eucgr.B03110.1 PACid:23568356	Chaperone Protein Htpg Family Protein	682,22	S30	-	-	-
Eucgr.B03754.1 PACid:23569146	Chaperonin 10	4902,23	S100	-	-	-
Eucgr.C03295.4 PACid:23572730	Chaperonin 20	7925,84	0.75	-0,29	0,13	0
Eucgr.B02532.2 PACid:23567704	Chaperonin-60Alpha	5140,43	0.66	-0,41	0,04	0

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão S100/S30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	S100/S30	PLGS		
				Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
Eucgr.D00319.1 PACid:23574099	Chlorophyll A/B Binding Protein 1	9041,04	S100	-	-	-
Eucgr.F03789.1 PACid:23584975	Chlorophyll A-B Binding Family Protein	917,85	S100	-	-	-
Eucgr.G00235.1 PACid:23585937	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	4782	S30	-	-	-
Eucgr.I02771.1 PACid:23597572	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	7407,51	0.81	-0,21	0,05	0
Eucgr.H03311.1 PACid:23592617	Chloroplast Rna Binding	756,97	0.78	-0,25	0,09	0
Eucgr.K02778.1 PACid:23604410	Chloroplast Rna-Binding Protein 31B	5909,45	0.71	-0,34	0,11	0
Eucgr.A02571.1 PACid:23564507	Chloroplast Rna-Binding Protein 33	1738,01	0.67	-0,4	0,15	0
Eucgr.H01479.1 PACid:23590938	Chloroplast Stem-Loop Binding Protein Of 41 Kda	958,43	0.79	-0,23	0,12	0
Eucgr.C04235.1 PACid:23573624	Chloroplast Thylakoid Lumen Protein	1554,91	1.02	0,02	0,07	0,66
Eucgr.F03707.1 PACid:23584865	Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein Of 32 Kd	1323,35	0.90	-0,1	0,17	0,13
Eucgr.E01107.1 PACid:23577825	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase	5180,06	1.63	0,49	0,08	1
Eucgr.K02198.3 PACid:23603740	Clpc Homologue 1	843,93	0.93	-0,07	0,1	0,09
Eucgr.K01508.1 PACid:23603016	Cobalamin-Independent Synthase Family Protein	309,02	S100	-	-	-
Eucgr.K01549.2 PACid:23603065	Co-Chaperone Grpe Family Protein	713,92	0.77	-0,26	0,12	0
Eucgr.B03930.6 PACid:23569367	Copper/Zinc Superoxide Dismutase 2	4574,59	1.48	0,39	0,11	1
Eucgr.K03545.1 PACid:23605306	Cp12 Domain-Containing Protein 1	17569,23	0.75	-0,29	0,06	0
Eucgr.H01016.1 PACid:23590433	Cp12 Domain-Containing Protein 2	11068,48	0.90	-0,11	0,09	0,01
Eucgr.H02989.1 PACid:23592313	Cyanase	1146,25	0.88	-0,13	0,25	0,2
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	4341,71	0.66	-0,41	0,06	0
Eucgr.E00118.3 PACid:23576773	Cysteine Synthase C1	698,77	S100	-	-	-
Eucgr.B00038.1 PACid:23565090	Cytochrome C Oxidase 6B	848,78	S100	-	-	-
Eucgr.C00345.1 PACid:23569843	Cytosol Aminopeptidase Family Protein	4651,5	0.87	-0,14	0,08	0
Eucgr.I01792.1 PACid:23596488	Degp Protease 1	2328,15	0.73	-0,31	0,06	0
Eucgr.J01595.1 PACid:23599566	Dehydroascorbate Reductase 1	899,52	0.63	-0,47	0,09	0
Eucgr.H04427.1 PACid:23593731	Dehydroquinase Dehydratase, Putative / Shikimate Dehydrogenase, Putative	1406,03	S100	-	-	-
Eucgr.F03161.3 PACid:23584176	Dihydrolipoamide Acetyltransferase, Long Form Protein	516,98	S100	-	-	-
Eucgr.B00532.5 PACid:23565646	D-Ribulose-5-Phosphate-3-Epimerase	2840,36	0.90	-0,11	0,11	0,04
Eucgr.C01279.1 PACid:23570861	Elongation Factor Ts Family Protein	319,63	0.61	-0,49	0,16	0
Eucgr.G01382.1 PACid:23586970	Eukaryotic Aspartyl Protease Family Protein	996,77	S30	-	-	-
Eucgr.G01561.1 PACid:23587116	Eukaryotic Aspartyl Protease Family Protein	2593,17	0.78	-0,25	0,14	0
Eucgr.C03418.1 PACid:23572844	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	596,89	1.67	0,51	0,12	1
Eucgr.I02340.4 PACid:23597078	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	15284,57	0.72	-0,33	0,06	0
Eucgr.I02340.2 PACid:23597076	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	15692,63	0.71	-0,34	0,06	0
Eucgr.E03981.1 PACid:23580267	Fibrillin	608,69	1.34	0,29	0,16	1
Eucgr.E04322.1 PACid:23580605	Fk506-Binding Protein 13	5001,18	0.73	-0,31	0,09	0
Eucgr.C02176.2 PACid:23571663	Fkbp-Like Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Family Protein	784,33	S100	-	-	-
Eucgr.I01326.1 PACid:23595882	Fructose-Bisphosphate Aldolase 2	10123,47	0.98	-0,02	0,06	0,28
Eucgr.G01726.3 PACid:23587282	Fructose-Bisphosphate Aldolase 2	13517,73	S30	-	-	-
Eucgr.A01933.1 PACid:23563745	Ftsh Extracellular Protease Family	965,74	1.27	0,24	0,07	1

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continuação)

Acesso	Análise de expressão S100/S30	PLGS				
		Score	S100/S30	Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
http://www.phytozome.net/	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)					
Eucgr.F02130.1 PACid:23582885	G-Box Regulating Factor 6	1044,58	1.72	0,54	0,16	1
Eucgr.F02482.1 PACid:23583301	General Regulatory Factor 3	1631,6	S100	-	-	-
Eucgr.J01477.1 PACid:23599456	General Regulatory Factor 7	1888,22	1.55	0,44	0,09	1
Eucgr.E02747.1 PACid:23579213	General Regulatory Factor 9	306,99	1.79	0,58	0,16	1
Eucgr.F04417.1 PACid:23585684	Germin 3	2323,29	1.40	0,34	0,11	1
Eucgr.K02283.3 PACid:23603840	Glutamine Synthase Clone R1	1927,24	S100	-	-	-
Eucgr.F02872.4 PACid:23583782	Glutamine Synthase Clone R1	1021,48	1.54	0,43	0,12	1
Eucgr.E00579.1 PACid:23577319	Glutathione Peroxidase 6	1144,4	0.70	-0,35	0,11	0
Eucgr.H01176.5 PACid:23590598	Glutathione S-Transferase 6	1837,28	0.91	-0,09	0,17	0,18
Eucgr.F03703.1 PACid:23584861	Glutathione S-Transferase Phi 8	314,16	S100	-	-	-
Eucgr.J00657.2 PACid:23598473	Glutathione S-Transferase, C-Terminal-Like; Translation Elongation Factor Ef1B/Ribosomal Protein S6	2842,8	0.94	-0,06	0,09	0,11
Eucgr.J01142.3 PACid:23599083	Glutathione Transferase Lambda 2	2387,85	0.95	-0,05	0,16	0,26
Eucgr.I01564.1 PACid:23596193	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase A Subunit 2	13248,19	0.95	-0,05	0,08	0,18
Eucgr.F01793.1 PACid:23582537	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase B Subunit	12581,04	0.79	-0,23	0,06	0
Eucgr.H04673.1 PACid:23594007	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C2	1166,91	1.45	0,37	0,12	1
Eucgr.L02773.1 PACid:23607390	Glycine Cleavage T-Protein Family	6980,65	0.91	-0,09	0,05	0,02
Eucgr.C03047.1 PACid:23572509	Glycine Decarboxylase P-Protein 1	3458,88	0.93	-0,07	0,05	0,02
Eucgr.L01448.1 PACid:23606413	Glyoxalase I Homolog	2184,98	1.36	0,31	0,1	1
Eucgr.C03791.2 PACid:23573167	Glyoxalase/Bleomycin Resistance Protein/Dioxygenase Superfamily Protein	2372,03	0.68	-0,38	0,09	0
Eucgr.K02346.1 PACid:23603913	Glyoxylate Reductase 1	847,38	S100	-	-	-
Eucgr.D01184.1 PACid:23574949	Groes-Like Family Protein	947,99	0.23	-1,48	0,24	0
Eucgr.K00213.1 PACid:23601662	Groes-Like Zinc-Binding Alcohol Dehydrogenase Family Protein	926,1	0.96	-0,04	0,12	0,22
Eucgr.G02807.1 PACid:23588548	Gtp Binding Elongation Factor Tu Family Protein	1305,52	1.27	0,24	0,11	1
Eucgr.K02765.1 PACid:23604395	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase (Had) Superfamily Protein	2627,03	0.65	-0,43	0,1	0
Eucgr.H04753.1 PACid:23594101	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase (Had) Superfamily Protein	1133,52	0.52	-0,65	0,19	0
Eucgr.H03302.3 PACid:23592607	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase Family Protein	837,65	S30	-	-	-
Eucgr.H02866.1 PACid:23592183	Heat Shock Protein 60	704,79	0.87	-0,14	0,1	0,02
Eucgr.J00023.2 PACid:23597668	Heat Shock Protein 70	7926,46	1.15	0,14	0,05	1
Eucgr.F03673.2 PACid:23584817	Heat Shock Protein 81.4	407,19	1.19	0,17	0,15	0,98
Eucgr.B02755.3 PACid:23567972	High Cyclic Electron Flow 1	2192,73	0.55	-0,59	0,12	0
Eucgr.K03149.1 PACid:23604827	Histone Superfamily Protein	2782,21	S100	-	-	-
Eucgr.D02118.3 PACid:23575939	Hyaluronan / Mrna Binding Family	590,31	0.94	-0,06	0,15	0,2
Eucgr.I01423.2 PACid:23596000	Hydroxypyruvate Reductase	3707,81	1.13	0,12	0,09	0,99
Eucgr.C03704.2 PACid:23573070	Insulinase (Peptidase Family M16) Protein	307,15	1.31	0,27	0,21	1
Eucgr.I01510.2 PACid:23596109	Isocitrate Dehydrogenase 1	357,99	S100	-	-	-
Eucgr.C03020.1 PACid:23572472	Kh Domain-Containing Protein	221,34	1.42	0,35	0,19	1
Eucgr.H03047.1 PACid:23592367	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	2190,29	1.21	0,19	0,09	1

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão S100/S30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	S100/S30	PLGS		
				Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
Eucgr.J01037.4 PACid:23598950	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	564,99	0.76	-0,28	0,15	0
Eucgr.F03251.1 PACid:23584298	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	920,82	1.04	0,04	0,16	0,68
Eucgr.F01209.1 PACid:23581913	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	3461,08	1.11	0,1	0,07	0,99
Eucgr.H00726.1 PACid:23590105	Lactoylglutathione Lyase / Glyoxalase I Family Protein	1019,55	S100	-	-	-
Eucgr.F04099.1 PACid:23585349	Light Harvesting Complex Of Photosystem li 5	5248,71	0.96	-0,04	0,06	0,09
Eucgr.G03060.1 PACid:23588848	Light Harvesting Complex Photosystem li	3599,93	1.15	0,14	0,09	1
Eucgr.K02983.1 PACid:23604660	Light Harvesting Complex Photosystem li	3878,2	0.92	-0,08	0,07	0,01
Eucgr.E02381.1 PACid:23578899	Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex li Subunit B1	5268,04	1.42	0,35	0,05	1
Eucgr.D00551.1 PACid:23574312	Magnesium Chelatase I2	1693,33	0.89	-0,12	0,11	0,01
Eucgr.F03012.1 PACid:23583971	Mar Binding Filament-Like Protein 1	97,91	0.98	-0,02	0,09	0,39
Eucgr.J01950.3 PACid:23599990	Maternal Effect Embryo Arrest 59	2726,88	S100	-	-	-
Eucgr.H04086.1 PACid:23593372	Mitochondrial Lipoamide Dehydrogenase 1	5252,51	0.70	-0,36	0,05	0
Eucgr.E00280.5 PACid:23576977	Mitochondrial Substrate Carrier Family Protein	2114,93	S100	-	-	-
Eucgr.A00188.1 PACid:23561900	Mlp-Like Protein 423	29676,87	1.01	0,01	0,06	0,66
Eucgr.H04013.3 PACid:23593278	Mlp-Like Protein 423	2672,91	1.68	0,52	0,1	1
Eucgr.H03983.1 PACid:23593249	Mlp-Like Protein 423	12523,7	1.51	0,41	0,09	1
Eucgr.K01671.1 PACid:23603188	Mog1/Psbp/Duf1795-Like Photosystem li Reaction Center Psbp Family Protein	1156,19	S30	-	-	-
Eucgr.H00132.1 PACid:23589467	Monodehydroascorbate Reductase 1	1053,35	S100	-	-	-
Eucgr.L03524.1 PACid:23607904	Nad(P)-Linked Oxidoreductase Superfamily Protein	3723,19	S100	-	-	-
Eucgr.H00466.1 PACid:23589824	Nad(P)-Linked Oxidoreductase Superfamily Protein	5282,45	S100	-	-	-
Eucgr.B02711.2 PACid:23567927	Nad(P)-Linked Oxidoreductase Superfamily Protein	621,07	S100	-	-	-
Eucgr.A02717.1 PACid:23564672	Nadh-Ubiquinone Oxidoreductase-Related	416,79	0.96	-0,04	0,11	0,34
Eucgr.E00338.5 PACid:23577058	Nmra-Like Negative Transcriptional Regulator Family Protein	5111,37	S100	-	-	-
Eucgr.B03178.1 PACid:23568447	Nodulin-Related Protein 1	2344,22	1.32	0,28	0,12	1
Eucgr.H01006.1 PACid:23590419	Nuclear Encoded Clp Protease 5	226,83	1.34	0,29	0,12	1
Eucgr.H03464.2 PACid:23592770	O-Acetylserine (Thiol) Lyase (Oas-Tl) Isoform A1	4509,9	0.96	-0,04	0,2	0,32
Eucgr.L00009.2 PACid:23605389	O-Acetylserine (Thiol) Lyase B	948,16	S30	-	-	-
Eucgr.E03874.3 PACid:23580167	O-Methyltransferase 1	3556,08	S100	-	-	-
Eucgr.B01747.2 PACid:23566868	O-Methyltransferase 1	2295,61	S100	-	-	-
Eucgr.I01807.3 PACid:23596514	Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein	5276,73	S100	-	-	-
Eucgr.H02605.2 PACid:23591918	Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein	3374,3	0.72	-0,33	0,08	0
Eucgr.F04345.2 PACid:23585605	Pdi-Like 1-1	1300,54	0.98	-0,02	0,1	0,43
Eucgr.D02028.2 PACid:23575837	Pentapeptide Repeat-Containing Protein	1456,46	1.04	0,04	0,12	0,71
Eucgr.A02929.1 PACid:23564952	Peptide Met Sulfoxide Reductase 4	2429,16	0.62	-0,48	0,1	0
Eucgr.F04195.1 PACid:23585456	Peroxidase Superfamily Protein	2131,73	1.16	0,15	0,14	0,99
Eucgr.B01112.1 PACid:23566234	Peroxiredoxin lif	2430,92	0.80	-0,22	0,11	0
Eucgr.H02358.5 PACid:23591671	Peroxisomal Nad-Malate Dehydrogenase 1	9987,62	0.65	-0,43	0,06	0

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continuação)

Acesso	Análise de expressão S100/S30	PLGS				
		Score	S100/S30	Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
http://www.phytozome.net/	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)					
Eucgr.A00095.1 PACid:23561828	Pfk-Like Carbohydrate Kinase Family Protein	2874,51	S100	-	-	-
Eucgr.A02714.1 PACid:23564668	Phosphatase-Related	842,13	1.03	0,03	0,2	0,62
Eucgr.F01476.1 PACid:23582167	Phosphoglycerate Kinase Family Protein	13078,44	0.79	-0,23	0,04	0
Eucgr.A00868.1 PACid:23562571	Phosphoglycerate Mutase, 2,3-Bisphosphoglycerate-Independent	1193,21	1.13	0,12	0,11	0,99
Eucgr.E00228.3 PACid:23576906	Phospholipid/Glycerol Acyltransferase Family Protein	1675,7	S100	-	-	-
Eucgr.E01261.2 PACid:23577988	Phosphoribulokinase	11005,71	0.99	-0,01	0,05	0,29
Eucgr.E01113.1 PACid:23577830	Photosynthetic Electron Transfer A	1300,79	0.75	-0,29	0,18	0,01
Eucgr.A01769.1 PACid:23563555	Photosynthetic Electron Transfer C	34108,85	0.85	-0,16	0,07	0
Eucgr.K01362.1 PACid:23602874	Photosystem I Light Harvesting Complex Gene 3	4131,25	1.31	0,27	0,07	1
Eucgr.I00200.2 PACid:23594717	Photosystem I Reaction Center Subunit Psi-N, Chloroplast, Putative / Psi-N, Putative (Psan)	24968,66	0.94	-0,06	0,03	0
Eucgr.B01088.1 PACid:23566205	Photosystem I Subunit D-2	9042,33	0.84	-0,17	0,05	0
Eucgr.B02162.1 PACid:23567250	Photosystem I Subunit E-2	8611,39	0.84	-0,17	0,11	0
Eucgr.K00389.1 PACid:23601851	Photosystem I Subunit F	4760,35	0.80	-0,22	0,07	0
Eucgr.A01047.1 PACid:23562782	Photosystem II Light Harvesting Complex Gene 2.2	3306,53	1.42	0,35	0,06	1
Eucgr.I01025.2 PACid:23595526	Photosystem II Subunit O-2	34221,8	0.73	-0,32	0,04	0
Eucgr.I01025.1 PACid:23595525	Photosystem II Subunit O-2	42461,32	0.81	-0,21	0,03	0
Eucgr.A02039.1 PACid:23563870	Photosystem II Subunit P-1	15475,43	0.81	-0,21	0,04	0
Eucgr.D00854.1 PACid:23574601	Photosystem II Subunit Q-2	35181,62	0.79	-0,23	0,03	0
Eucgr.B02306.1 PACid:23567434	Plastid Transcriptionally Active 16	1145,2	1.08	0,08	0,09	0,98
Eucgr.F03922.1 PACid:23585116	Plastid Transcriptionally Active 17	811,41	0.63	-0,47	0,12	0
Eucgr.A00018.2 PACid:23561739	Plastid Transcriptionally Active 4	957,81	0.64	-0,45	0,15	0
Eucgr.H00144.2 PACid:23589484	Plastid-Lipid Associated Protein Pap / Fibrillin Family Protein	5439,6	1.06	0,06	0,07	0,95
Eucgr.D02221.1 PACid:23576073	Plastid-Lipid Associated Protein Pap / Fibrillin Family Protein	4118,84	0.98	-0,02	0,16	0,39
Eucgr.C00962.1 PACid:23570534	Profilin 2	5151,25	1.20	0,18	0,13	1
Eucgr.C00615.1 PACid:23570113	Profilin 3	2740,42	S100	-	-	-
Eucgr.G03205.2 PACid:23589035	Proline-Rich Family Protein	1440,2	S30	-	-	-
Eucgr.J01758.1 PACid:23599758	Protein Containing PdZ Domain, A K-Box Domain, And A Tpr Region	1401,78	1.02	0,02	0,09	0,61
Eucgr.J00682.1 PACid:23598507	Pyrimidine 2	579,03	1.77	0,57	0,14	1
Eucgr.A01238.1 PACid:23562999	Pyrophosphorylase 4	1516,72	1.72	0,54	0,13	1
Eucgr.G01121.1 PACid:23586735	Pyrophosphorylase 6	1201,72	0.55	-0,6	0,11	0
Eucgr.K02786.1 PACid:23604416	Rab Gtpase Homolog E1B	8505,1	1.03	0,03	0,05	0,89
Eucgr.K02786.2 PACid:23604417	Rab Gtpase Homolog E1B	7992,75	0.99	-0,01	0,04	0,39
Eucgr.B00856.1 PACid:23565967	Receptor For Activated C Kinase 1B	850,68	S100	-	-	-
Eucgr.K02544.2 PACid:23604145	Reversibly Glycosylated Polypeptide 3	1314,98	S100	-	-	-
Eucgr.J00687.1 PACid:23598512	Rhodanese-Like Domain-Containing Protein / Ppic-Type Ppiase Domain-Containing Protein	1902,24	0.59	-0,52	0,11	0
Eucgr.B02112.1 PACid:23567192	Ribose 5-Phosphate Isomerase, Type A Protein	2804,8	0.83	-0,19	0,08	0
Eucgr.G03042.3 PACid:23588828	Ribosomal Protein L10 Family Protein	1189,03	S100	-	-	-

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão S100/S30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	S100/S30	PLGS		
				Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
Eucgr.H01473.2 PACid:23590926	Ribosome Recycling Factor, Chloroplast Precursor	3119,87	0.62	-0,48	0,22	0
Eucgr.K02223.1 PACid:23603767	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	8168,17	1.19	0,17	0,11	1
Eucgr.J01502.2 PACid:23599482	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	35548,96	1.13	0,12	0,12	0,99
Eucgr.B03013.1 PACid:23568241	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	15597,72	0.96	-0,04	0,04	0,01
Eucgr.C03525.1 PACid:23572922	Ribulose-Bisphosphate Carboxylases	1974,77	1.97	0,68	0,08	1
Eucgr.J01250.1 PACid:23599219	Rna-Binding (Rm/Rbd/Rnp Motifs) Family Protein	470,85	0.81	-0,21	0,11	0
Eucgr.A00992.4 PACid:23562714	Rotamase Cyp 4	13233,93	0.78	-0,25	0,09	0
Eucgr.A00992.1 PACid:23562711	Rotamase Cyp 4	15718,78	0.76	-0,28	0,04	0
Eucgr.J02030.1 PACid:23600061	Rubisco Activase	33173,59	0.95	-0,05	0,03	0,01
Eucgr.J01234.1 PACid:23599204	Rubisco Activase	24968,63	0.89	-0,12	0,03	0
Eucgr.J01234.2 PACid:23599205	Rubisco Activase	20193,67	S30	-	-	-
Eucgr.J00242.1 PACid:23597962	Sedoheptulose-Bisphosphatase	3150,81	1.11	0,1	0,06	1
Eucgr.G01192.1 PACid:23586805	Serine Carboxypeptidase-Like 17	471,04	S100	-	-	-
Eucgr.H02679.1 PACid:23592002	Serine Hydroxymethyltransferase 4	497,23	S100	-	-	-
Eucgr.I00580.1 PACid:23595119	Serine Transhydroxymethyltransferase 1	3354,62	0.91	-0,09	0,06	0
Eucgr.D02179.2 PACid:23576022	Single Hybrid Motif Superfamily Protein	10211,53	0.97	-0,03	0,04	0,08
Eucgr.J00617.1 PACid:23598422	Smad/Fha Domain-Containing Protein	6793,71	0.64	-0,44	0,11	0
Eucgr.F01406.2 PACid:23582086	Soul Heme-Binding Family Protein	695,65	0.99	-0,01	0,17	0,46
Eucgr.D02024.2 PACid:23575832	Stress-Inducible Protein, Putative	561,94	1.03	0,03	0,13	0,65
Eucgr.F00243.1 PACid:23580931	Succinate Dehydrogenase 5	1662,16	1.09	0,09	0,14	0,88
Eucgr.B03593.2 PACid:23568960	Tcp-1/Cpn60 Chaperonin Family Protein	8139,29	0.59	-0,52	0,06	0
Eucgr.G02956.1 PACid:23588729	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	1297,21	0.71	-0,34	0,09	0
Eucgr.K00402.3 PACid:23601869	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	3590,11	0.76	-0,28	0,07	0
Eucgr.F03433.1 PACid:23584510	Thiazole Biosynthetic Enzyme, Chloroplast (Ara6) (Thi1) (Thi4)	1301,31	1.00	0	0,15	0,48
Eucgr.L03049.1 PACid:23607585	Thioredoxin M-Type 4	6071,83	0.81	-0,21	0,07	0
Eucgr.K02606.1 PACid:23604206	Thioredoxin Superfamily Protein	7422,67	0.93	-0,07	0,11	0,12
Eucgr.A01555.1 PACid:23563344	Thioredoxin Superfamily Protein	15780,3	0.77	-0,26	0,05	0
Eucgr.C00774.1 PACid:23570286	Thioredoxin Superfamily Protein	6104,38	0.57	-0,57	0,08	0
Eucgr.F02754.1 PACid:23583639	Thioredoxin Superfamily Protein	7677,4	0.91	-0,09	0,05	0
Eucgr.J00880.2 PACid:23598756	Thioredoxin X	2477,09	0.81	-0,21	0,19	0,03
Eucgr.C03812.2 PACid:23573187	Thioredoxin-Dependent Peroxidase 1	8804,18	0.79	-0,24	0,07	0
Eucgr.H04456.1 PACid:23593771	Thylakoid Lumen 18.3 Kda Protein	2804,75	0.75	-0,29	0,17	0
Eucgr.E00068.1 PACid:23576707	Thylakoid Rhodanese-Like	4516,76	0.81	-0,21	0,14	0
Eucgr.F04344.2 PACid:23585603	Thylakoidal Ascorbate Peroxidase	2619,78	0.80	-0,22	0,1	0
Eucgr.D02467.1 PACid:23576377	Transketolase	6706,71	0.93	-0,07	0,04	0
Eucgr.D02023.1 PACid:23575830	Translation Elongation Factor Efg/Ef2 Protein	428,41	1.02	0,02	0,21	0,62
Eucgr.I01374.1 PACid:23595938	Triosephosphate Isomerase	7664,91	0.70	-0,35	0,06	0
Eucgr.J00008.1 PACid:23597642	Triosephosphate Isomerase	5288,94	0.73	-0,31	0,06	0
Eucgr.F02183.1 PACid:23582979	Tubulin/Ftsz Family Protein	585,24	S100	-	-	-
Eucgr.F02905.2 PACid:23583830	Udp-Glucose Pyrophosphorylase 2	2305,27	0.96	-0,04	0,1	0,18

Tabela 7 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS S100 vs S30

(conclusão)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão S100/S30		PLGS			
	Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	S100/S30	Log(e)S100/S30	Log(e)Std Dev	p-Value
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	2383,59	0.70	-0,35	0,1	0
Eucgr.J02133.1 PACid:23600207	Voltage Dependent Anion Channel 1	1376,57	0.92	-0,08	0,16	0,22
Eucgr.H00802.1 PACid:23590183	-	2514,35	S30	-	-	-
Eucgr.F03988.1 PACid:23585211	-	1702,72	0.74	-0,3	0,15	0

ANEXO B

Tabela 8 – Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30

(continua)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	T100/T30	PLGS		
				Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.I02744.1 PACid:23597539	2Fe-2S Ferredoxin-Like Superfamily Protein	20970.46	0.90	-0,1	0,03	0
Eucgr.B01439.2 PACid:23566576	2-Phosphoglycolate Phosphatase 1	20075.87	0.45	-0,8	0,06	0
Eucgr.B00177.1 PACid:23565240	31-Kda Rna Binding Protein	8282.28	0.95	-0,05	0,03	0,01
Eucgr.J00982.3 PACid:23598884	Act Domain-Containing Protein	1153.08	T100	-	-	-
Eucgr.I00241.1 PACid:23594778	Actin 7	3179.56	T100	-	-	-
Eucgr.B00131.2 PACid:23565188	Adenylate Kinase 1	2506.7	T100	-	-	-
Eucgr.K01372.1 PACid:23602888	Adp Glucose Pyrophosphorylase 1	1128.39	0.84	-0,18	0,11	0
Eucgr.B03720.1 PACid:23569105	Alanine:Glyoxylate Aminotransferase	1356.06	1.22	0,2	0,06	1
Eucgr.F02744.6 PACid:23583628	Alcohol Dehydrogenase 1	1483.28	T100	-	-	-
Eucgr.K02073.2 PACid:23603584	Aldolase Superfamily Protein	4364.07	0.98	-0,02	0,06	0,24
Eucgr.F02017.1 PACid:23582769	Aldolase Superfamily Protein	9660.51	0.78	-0,25	0,05	0
Eucgr.F01413.2 PACid:23582096	Aldolase-Type Tim Barrel Family Protein	10971.38	1.00	0	0,05	0,6
Eucgr.B01152.1 PACid:23566279	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein	1249.33	T100	-	-	-
Eucgr.K00785.2 PACid:23602248	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein	965.9	T100	-	-	-
Eucgr.H01461.1 PACid:23590913	Ankyrin Repeat-Containing Protein 2	2226.06	0.98	-0,02	0,12	0,39
Eucgr.J00965.1 PACid:23598866	Ascorbate Peroxidase 1	2449.56	1.31	0,27	0,15	1
Eucgr.B02456.5 PACid:23567600	Ascorbate Peroxidase 2	14371.44	T100	-	-	-
Eucgr.H00143.2 PACid:23589482	Atp Citrate Lyase (Acl) Family Protein	1205.88	0.86	-0,15	0,08	0
Eucgr.G02224.1 PACid:23587829	Atp Synthase Alpha/Beta Family Protein	6796.82	1.23	0,21	0,03	1
Eucgr.G02804.1 PACid:23588544	Atp Synthase D Chain, Mitochondrial	3442.9	1.09	0,09	0,08	1
Eucgr.F04149.2 PACid:23585410	Atp Synthase Delta-Subunit Gene	18970.52	0.68	-0,39	0,03	0
Eucgr.J02738.1 PACid:23600870	Atp Synthase Subunit Beta	87882.88	0.66	-0,42	0,04	0
Eucgr.K01258.1 PACid:23602749	Atpase, Aaa-Type, Cdc48 Protein	702.76	T100	-	-	-
Eucgr.K01256.1 PACid:23602745	Atpase, Aaa-Type, Cdc48 Protein	848.88	T30	-	-	-
Eucgr.C02765.1 PACid:23572219	Atpase, F0 Complex, Subunit B/B', Bacterial/Chloroplast	3182.98	0.54	-0,62	0,11	0
Eucgr.E01702.1 PACid:23578383	Atpase, F1 Complex, Delta/Epsilon Subunit	1255.03	0.92	-0,08	0,18	0,15
Eucgr.E04053.1 PACid:23580342	Atpase, F1 Complex, Gamma Subunit Protein	7177.71	0.70	-0,35	0,06	0
Eucgr.D01990.1 PACid:23575797	Calcium-Binding Ef-Hand Family Protein	2352.85	1.57	0,45	0,09	1
Eucgr.I01790.1 PACid:23596486	Carbonic Anhydrase 1	23279.02	0.47	-0,75	0,03	0
Eucgr.F01775.2 PACid:23582511	Catalase 2	1235.17	0.76	-0,28	0,09	0
Eucgr.F03816.1 PACid:23585013	Chalcone-Flavanone Isomerase Family Protein	2039.41	T100	-	-	-
Eucgr.B03754.1 PACid:23569146	Chaperonin 10	5642.48	0.90	-0,11	0,1	0,01
Eucgr.B02532.2 PACid:23567704	Chaperonin-60Alpha	10012.67	0.61	-0,5	0,04	0
Eucgr.D00319.1 PACid:23574099	Chlorophyll A/B Binding Protein 1	9820.61	T100	-	-	-
Eucgr.I02771.1 PACid:23597572	Chloroplast Heat Shock Protein 70-2	9165.72	0.93	-0,07	0,03	0
Eucgr.K02778.1 PACid:23604410	Chloroplast Rna-Binding Protein 31B	3159.42	1.04	0,04	0,08	0,78
Eucgr.A02571.1 PACid:23564507	Chloroplast Rna-Binding Protein 33	3635.56	0.60	-0,51	0,07	0
Eucgr.H01479.1 PACid:23590938	Chloroplast Stem-Loop Binding Protein Of 41 Kda	5457.71	0.74	-0,3	0,05	0

Tabela 8– Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30
(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	PLGS			
			T100/T30	Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.C04235.1 PACid:23573624	Chloroplast Thylakoid Lumen Protein	6503.87	1.08	0,08	0,05	1
Eucgr.F03707.1 PACid:23584865	Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein Of 32 Kd	2245.42	0.63	-0,46	0,11	0
Eucgr.L01277.2 PACid:23606276	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase	6092.39	T100	-	-	-
Eucgr.E01107.1 PACid:23577825	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase	4038.32	1.32	0,28	0,05	1
Eucgr.K02198.2 PACid:23603739	Clpc Homologue 1	1806.64	T100	-	-	-
Eucgr.K02198.3 PACid:23603740	Clpc Homologue 1	2473.65	0.87	-0,14	0,25	0,02
Eucgr.F03503.2 PACid:23584604	Co-Chaperone Grpe Family Protein	374.56	T100	-	-	-
Eucgr.K01549.2 PACid:23603065	Co-Chaperone Grpe Family Protein	5294.14	1.03	0,03	0,06	0,82
Eucgr.H04880.1 PACid:23594235	Copper Ion Binding;Cobalt Ion Binding;Zinc Ion Binding	2982.74	1.00	0	0,06	0,51
Eucgr.B03930.6 PACid:23569367	Copper/Zinc Superoxide Dismutase 2	23009.16	T100	-	-	-
Eucgr.K03545.1 PACid:23605306	Cp12 Domain-Containing Protein 1	24795.29	0.52	-0,66	0,06	0
Eucgr.H01016.1 PACid:23590433	Cp12 Domain-Containing Protein 2	13711.08	0.85	-0,16	0,07	0
Eucgr.I01816.1 PACid:23596522	Cyclophilin 38	5123.78	0.84	-0,17	0,04	0
Eucgr.J00085.3 PACid:23597744	Cystatin B	1551.6	T100	-	-	-
Eucgr.B00038.1 PACid:23565090	Cytochrome C Oxidase 6B	2842.94	T100	-	-	-
Eucgr.C00345.1 PACid:23569843	Cytosol Aminopeptidase Family Protein	4787.57	0.96	-0,04	0,05	0,08
Eucgr.I01792.1 PACid:23596488	Degp Protease 1	3754.35	0.84	-0,17	0,05	0
Eucgr.J01595.2 PACid:23599567	Dehydroascorbate Reductase 1	3272.55	0.80	-0,22	0,06	0
Eucgr.J01595.1 PACid:23599566	Dehydroascorbate Reductase 1	3272.55	0.79	-0,23	0,05	0
Eucgr.H04427.2 PACid:23593732	Dehydroquinase Dehydratase, Putative / Shikimate Dehydrogenase, Putative	469.22	T100	-	-	-
Eucgr.F03161.3 PACid:23584176	Dihydrolipoamide Acetyltransferase, Long Form Protein	203.74	T100	-	-	-
Eucgr.A02874.1 PACid:23564871	Double Clp-N Motif Protein	1586.46	0.60	-0,51	0,13	0
Eucgr.B00532.5 PACid:23565646	D-Ribulose-5-Phosphate-3-Epimerase	2104.94	0.41	-0,88	0,11	0
Eucgr.C01279.1 PACid:23570861	Elongation Factor Ts Family Protein	826.52	0.44	-0,82	0,09	0
Eucgr.G01561.1 PACid:23587116	Eukaryotic Aspartyl Protease Family Protein	2678.24	0.57	-0,57	0,09	0
Eucgr.C03418.1 PACid:23572844	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	471.57	1.45	0,37	0,13	1
Eucgr.J02172.3 PACid:23600251	Ferredoxin Thioredoxin Reductase Catalytic Beta Chain Family Protein	7977.97	0.33	-1,11	0,11	0
Eucgr.I02340.3 PACid:23597077	Ferredoxin-Nadp(+)-Oxidoreductase 1	29716.89	0.84	-0,17	0,03	0
Eucgr.J00176.1 PACid:23597880	Ferritin 4	1335.42	T100	-	-	-
Eucgr.E03981.1 PACid:23580267	Fibrillin	1721.21	1.90	0,64	0,11	1
Eucgr.E04322.1 PACid:23580605	Fk506-Binding Protein 13	6793.46	1.11	0,1	0,06	1
Eucgr.C02176.1 PACid:23571662	Fkbp-Like Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Family Protein	2147.59	0.73	-0,31	0,09	0
Eucgr.G01726.3 PACid:23587282	Fructose-Bisphosphate Aldolase 2	18344.46	T30	-	-	-
Eucgr.A01933.1 PACid:23563745	Ftsh Extracellular Protease Family	2500.12	0.51	-0,68	0,07	0
Eucgr.J01477.1 PACid:23599456	General Regulatory Factor 7	3192.63	1.45	0,37	0,11	1
Eucgr.F04417.1 PACid:23585684	Germin 3	3538.4	0.89	-0,12	0,05	0
Eucgr.B00034.1 PACid:23565086	Gf14 Protein Phi Chain	556.6	1.52	0,42	0,18	1
Eucgr.B01163.2 PACid:23566298	Glutamine Synthetase 2	3887.14	T100	-	-	-
Eucgr.B01163.3 PACid:23566299	Glutamine Synthetase 2	5127.17	0.38	-0,98	0,06	0

Tabela 8– Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	Score	PLGS			
			T100/T30	Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.I01764.1 PACid:23596448	Glutaredoxin Family Protein	17236.95	0.63	-0,47	0,07	0
Eucgr.E00579.1 PACid:23577319	Glutathione Peroxidase 6	2021.86	0.64	-0,45	0,06	0
Eucgr.J00657.2 PACid:23598473	Glutathione S-Transferase, C-Terminal-Like; Translation Elongation Factor E1B/Ribosomal Protein S6	2446.41	0.91	-0,09	0,08	0,01
Eucgr.J01142.3 PACid:23599083	Glutathione Transferase Lambda 2	1922.9	0.93	-0,07	0,13	0,12
Eucgr.I01564.1 PACid:23596193	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase A Subunit 2	17024.33	0.98	-0,02	0,03	0,09
Eucgr.F01793.1 PACid:23582537	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase B Subunit	23084.6	0.38	-0,96	0,05	0
Eucgr.H04673.1 PACid:23594007	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C2	2058.66	0.75	-0,29	0,07	0
Eucgr.E03909.1 PACid:23580202	Glycine Cleavage T-Protein Family	9073.5	T100	-	-	-
Eucgr.L02773.1 PACid:23607390	Glycine Cleavage T-Protein Family	18148	0.35	-1,05	0,04	0
Eucgr.C03047.1 PACid:23572509	Glycine Decarboxylase P-Protein 1	3857.81	1.03	0,03	0,03	0,97
Eucgr.B00593.1 PACid:23565717	Glycine-Rich Rna-Binding Protein 3	612.7	T100	-	-	-
Eucgr.L01448.1 PACid:23606413	Glyoxalase I Homolog	4718.05	0.92	-0,08	0,08	0,03
Eucgr.C03791.2 PACid:23573167	Glyoxalase/Bleomycin Resistance Protein/Dioxygenase Superfamily Protein	6157.62	0.64	-0,45	0,07	0
Eucgr.F00184.1 PACid:23580848	Granulin Repeat Cysteine Protease Family Protein	828.57	T100	-	-	-
Eucgr.G02807.1 PACid:23588548	Gtp Binding Elongation Factor Tu Family Protein	1262.65	0.28	-1,27	0,12	0
Eucgr.H04753.1 PACid:23594101	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase (Had) Superfamily Protein	4605.89	0.26	-1,33	0,1	0
Eucgr.K02765.1 PACid:23604395	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase (Had) Superfamily Protein	6380.17	0.45	-0,8	0,05	0
Eucgr.H02866.1 PACid:23592183	Heat Shock Protein 60	1325.2	0.87	-0,14	0,09	0
Eucgr.J00023.2 PACid:23597668	Heat Shock Protein 70	7941.82	0.70	-0,35	0,03	0
Eucgr.E01024.1 PACid:23577729	Heat Shock Protein 70 (Hsp 70) Family Protein	4283.63	1.06	0,06	0,05	1
Eucgr.F03673.2 PACid:23584817	Heat Shock Protein 81.4	578.5	0.52	-0,66	0,12	0
Eucgr.B02755.3 PACid:23567972	High Cyclic Electron Flow 1	3427.12	0.41	-0,88	0,1	0
Eucgr.K03149.1 PACid:23604827	Histone Superfamily Protein	889.53	T100	-	-	-
Eucgr.J02067.1 PACid:23600114	Histone Superfamily Protein	6758.29	T100	-	-	-
Eucgr.D02015.3 PACid:23575820	Hsp70-Interacting Protein 1	1792.85	0.85	-0,16	0,09	0
Eucgr.C00142.1 PACid:23569636	Hydroxymethylbilane Synthase	3243.55	0.57	-0,56	0,25	0
Eucgr.I01423.2 PACid:23596000	Hydroxypyruvate Reductase	6183.35	0.81	-0,21	0,06	0
Eucgr.C03704.2 PACid:23573070	Insulinase (Peptidase Family M16) Protein	946.57	0.60	-0,51	0,11	0
Eucgr.F03251.1 PACid:23584298	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	3263.07	0.97	-0,03	0,07	0,24
Eucgr.H03047.1 PACid:23592367	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	3723.68	0.56	-0,58	0,07	0
Eucgr.F01209.1 PACid:23581913	Lactate/Malate Dehydrogenase Family Protein	6262.88	0.73	-0,32	0,07	0
Eucgr.F04099.1 PACid:23585349	Light Harvesting Complex Of Photosystem Ii 5	4794.34	1.01	0,01	0,05	0,67
Eucgr.K02983.1 PACid:23604660	Light Harvesting Complex Photosystem Ii	4251.27	0.32	-1,13	0,05	0
Eucgr.G03060.1 PACid:23588848	Light Harvesting Complex Photosystem Ii	8483.49	0.26	-1,35	0,09	0
Eucgr.D00321.1 PACid:23574101	Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex Ii Subunit B1	12522.62	0.84	-0,17	0,08	0
Eucgr.E02381.1 PACid:23578899	Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex Ii Subunit B1	14194.03	0.52	-0,66	0,06	0
Eucgr.D00551.1 PACid:23574312	Magnesium Chelatase I2	1622.28	0.59	-0,52	0,06	0
Eucgr.F03012.1 PACid:23583971	Mar Binding Filament-Like Protein 1	945.51	0.46	-0,77	0,11	0

Tabela 8– Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	PLGS				
		Score	T100/T30	Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.H04086.1 PACid:23593372	Mitochondrial Lipoamide Dehydrogenase 1	10222.11	0.32	-1,15	0,07	0
Eucgr.H04013.3 PACid:23593278	Mlp-Like Protein 423	1766.52	T100	-	-	-
Eucgr.H03981.1 PACid:23593247	Mlp-Like Protein 423	5127.48	T100	-	-	-
Eucgr.A00188.1 PACid:23561900	Mlp-Like Protein 423	17530.55	1.28	0,25	0,04	1
Eucgr.H03983.1 PACid:23593249	Mlp-Like Protein 423	5562.94	0.95	-0,05	0,13	0,2
Eucgr.H02489.1 PACid:23591789	Mog1/Psbp/Duf1795-Like Photosystem II Reaction Center Psbp Family Protein	3012.61	T100	-	-	-
Eucgr.A01273.1 PACid:23563036	Nad(P)-Binding Rossmann-Fold Superfamily Protein	1508.87	1.08	0,08	0,07	1
Eucgr.A02717.1 PACid:23564672	Nadh-Ubiquinone Oxidoreductase-Related	1428.97	0.79	-0,23	0,08	0
Eucgr.B03178.1 PACid:23568447	Nodulin-Related Protein 1	1645.18	0.95	-0,05	0,11	0,18
Eucgr.H01006.1 PACid:23590419	Nuclear Encoded Clp Protease 5	550.54	0.82	-0,2	0,17	0,01
Eucgr.K02753.1 PACid:23604379	Nucleoside Diphosphate Kinase 2	2025.79	T100	-	-	-
Eucgr.L00009.2 PACid:23605389	O-Acetylserine (Thiol) Lyase B	2557.97	T100	-	-	-
Eucgr.H02605.2 PACid:23591918	Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein	3213.76	0.69	-0,37	0,07	0
Eucgr.F04345.2 PACid:23585605	Pdi-Like 1-1	1945.27	1.03	0,03	0,05	0,84
Eucgr.A02929.1 PACid:23564952	Peptide Met Sulfoxide Reductase 4	1442.58	0.74	-0,3	0,07	0
Eucgr.F04198.1 PACid:23585457	Peroxidase Superfamily Protein	1759.49	T100	-	-	-
Eucgr.L02740.1 PACid:23607364	Peroxidase Superfamily Protein	1311.07	0.76	-0,28	0,11	0
Eucgr.B01112.1 PACid:23566234	Peroxiredoxin Iif	3954.48	0.65	-0,43	0,06	0
Eucgr.H02358.5 PACid:23591671	Peroxisomal Nad-Malate Dehydrogenase 1	24456.6	0.64	-0,44	0,04	0
Eucgr.D01807.1 PACid:23575575	Phosphatase-Related	1592.83	T100	-	-	-
Eucgr.F01476.1 PACid:23582167	Phosphoglycerate Kinase Family Protein	28399.1	0.63	-0,47	0,02	0
Eucgr.E01261.2 PACid:23577988	Phosphoribulokinase	9987.83	0.93	-0,07	0,03	0
Eucgr.A01769.1 PACid:23563555	Photosynthetic Electron Transfer C	39326.73	0.55	-0,6	0,04	0
Eucgr.K01362.1 PACid:23602874	Photosystem I Light Harvesting Complex Gene 3	5459.18	0.46	-0,77	0,08	0
Eucgr.I00200.2 PACid:23594717	Photosystem I Reaction Center Subunit Psi-N, Chloroplast, Putative / Psi-N, Putative (Psan)	22891.17	0.64	-0,45	0,04	0
Eucgr.B01088.1 PACid:23566205	Photosystem I Subunit D-2	10757.87	0.85	-0,16	0,06	0
Eucgr.B02162.1 PACid:23567250	Photosystem I Subunit E-2	9180.47	1.13	0,12	0,05	1
Eucgr.K00389.1 PACid:23601851	Photosystem I Subunit F	3844.15	0.31	-1,17	0,08	0
Eucgr.A01047.1 PACid:23562782	Photosystem II Light Harvesting Complex Gene 2.2	9183.28	0.64	-0,44	0,05	0
Eucgr.I01025.2 PACid:23595526	Photosystem II Subunit O-2	58499.36	T100	-	-	-
Eucgr.I01025.1 PACid:23595525	Photosystem II Subunit O-2	42583.19	0.81	-0,21	0,02	0
Eucgr.A02039.2 PACid:23563871	Photosystem II Subunit P-1	39250.96	0.80	-0,22	0,03	0
Eucgr.A02039.1 PACid:23563870	Photosystem II Subunit P-1	47251.52	0.85	-0,16	0,02	0
Eucgr.D00854.1 PACid:23574601	Photosystem II Subunit Q-2	33815.65	0.76	-0,27	0,02	0
Eucgr.E03613.1 PACid:23579938	Plastid Developmental Protein Dag, Putative	1635.83	T100	-	-	-
Eucgr.B02306.1 PACid:23567434	Plastid Transcriptionally Active 16	2496.18	0.59	-0,53	0,07	0
Eucgr.F03922.1 PACid:23585116	Plastid Transcriptionally Active 17	1367.61	0.59	-0,52	0,13	0
Eucgr.K00001.1 PACid:23601380	Plastid Transcriptionally Active 4	299.7	T100	-	-	-
Eucgr.D02221.1 PACid:23576073	Plastid-Lipid Associated Protein Pap / Fibrillin Family Protein	5233.98	0.61	-0,49	0,08	0

Tabela 8– Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30

(continuação)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	PLGS				
		Score	T100/T30	Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.H00144.2 PACid:23589484	Plastid-Lipid Associated Protein Pap / Fibrillin Family Protein	5064.13	0.79	-0,24	0,08	0
Eucgr.I01129.2 PACid:23595641	Poly(A) Binding Protein 8	336.57	1.23	0,21	0,15	1
Eucgr.C00962.1 PACid:23570534	Profilin 2	5323.64	1.20	0,18	0,1	1
Eucgr.G03205.1 PACid:23589034	Proline-Rich Family Protein	2345.84	0.99	-0,01	0,08	0,37
Eucgr.J01758.1 PACid:23599758	Protein Containing PdZ Domain, A K-Box Domain, And A Tpr Region	8866.76	0.92	-0,08	0,04	0
Eucgr.G02904.1 PACid:23588665	PsbP-Like Protein 1	3504.66	0.94	-0,06	0,07	0,07
Eucgr.J00682.1 PACid:23598507	Pyrimidine 2	393.54	1.16	0,15	0,1	0,99
Eucgr.I02418.2 PACid:23597185	Pyrophosphorylase 2	1586.17	T30	-	-	-
Eucgr.A01238.1 PACid:23562999	Pyrophosphorylase 4	3052.91	T100	-	-	-
Eucgr.G01121.1 PACid:23586735	Pyrophosphorylase 6	2570.47	0.68	-0,38	0,05	0
Eucgr.K02786.2 PACid:23604417	Rab Gtpase Homolog E1B	9062.4	0.42	-0,86	0,12	0
Eucgr.J00687.1 PACid:23598512	Rhodanese-Like Domain-Containing Protein / Ppic-Type Ppiase Domain-Containing Protein	4658.22	0.77	-0,26	0,06	0
Eucgr.B02112.1 PACid:23567192	Ribose 5-Phosphate Isomerase, Type A Protein	12469.58	0.74	-0,3	0,09	0
Eucgr.G03042.3 PACid:23588828	Ribosomal Protein L10 Family Protein	1273.51	0.59	-0,53	0,15	0
Eucgr.H01473.3 PACid:23590927	Ribosome Recycling Factor, Chloroplast Precursor	2226.14	0.90	-0,1	0,04	0
Eucgr.J01502.2 PACid:23599482	Ribulose Bisphosphate Carboxylase (Small Chain) Family Protein	30270.86	0.63	-0,47	0,03	0
Eucgr.C03525.1 PACid:23572922	Ribulose-Bisphosphate Carboxylases	8547.46	1.28	0,25	0,04	1
Eucgr.A00992.4 PACid:23562714	Rotamase Cyp 4	9436.3	0.54	-0,61	0,17	0
Eucgr.A00992.1 PACid:23562711	Rotamase Cyp 4	11891.44	0.58	-0,55	0,04	0
Eucgr.J02030.1 PACid:23600061	Rubisco Activase	25642.27	0.95	-0,05	0,02	0
Eucgr.J01234.1 PACid:23599204	Rubisco Activase	21288.82	0.86	-0,15	0,03	0
Eucgr.K00588.3 PACid:23602058	S-Adenosylmethionine Synthetase 1	2330.24	T100	-	-	-
Eucgr.J00242.1 PACid:23597962	Sedoheptulose-Bisphosphatase	5740.58	0.66	-0,42	0,04	0
Eucgr.I00580.3 PACid:23595121	Serine Transhydroxymethyltransferase 1	8150.52	T30	-	-	-
Eucgr.D02179.2 PACid:23576022	Single Hybrid Motif Superfamily Protein	17208.86	0.70	-0,35	0,03	0
Eucgr.J00617.1 PACid:23598422	Smad/Fha Domain-Containing Protein	8978.44	0.57	-0,56	0,12	0
Eucgr.F01406.1 PACid:23582085	Soul Heme-Binding Family Protein	1190.47	T100	-	-	-
Eucgr.C03557.1 PACid:23572950	Stress Responsive Alpha-Beta Barrel Domain Protein	2867.59	0.67	-0,4	0,06	0
Eucgr.F00243.1 PACid:23580931	Succinate Dehydrogenase 5	4239.81	1.31	0,27	0,08	1
Eucgr.B03593.2 PACid:23568960	Tcp-1/Cpn60 Chaperonin Family Protein	11932.64	0.47	-0,76	0,03	0
Eucgr.K00881.1 PACid:23602342	Terpene Synthase 03	600.2	T30	-	-	-
Eucgr.G02956.1 PACid:23588729	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	1652.97	1.13	0,12	0,07	1
Eucgr.K00402.3 PACid:23601869	Tetratricopeptide Repeat (Tpr)-Like Superfamily Protein	1965.97	0.96	-0,04	0,07	0,12
Eucgr.F03433.1 PACid:23584510	Thiazole Biosynthetic Enzyme, Chloroplast (Ara6) (Thi1) (Thi4)	2725.42	0.44	-0,83	0,12	0
Eucgr.L03049.1 PACid:23607585	Thioredoxin M-Type 4	5205.74	0.79	-0,23	0,08	0
Eucgr.D00028.1 PACid:23573825	Thioredoxin O1	989.71	T100	-	-	-
Eucgr.C00774.1 PACid:23570286	Thioredoxin Superfamily Protein	17097.37	0.68	-0,39	0,04	0
Eucgr.K02606.1 PACid:23604206	Thioredoxin Superfamily Protein	19425.6	0.92	-0,08	0,04	0
Eucgr.A01555.1 PACid:23563344	Thioredoxin Superfamily Protein	21938.84	0.83	-0,19	0,04	0

Tabela 8– Descrição e informações das proteínas identificadas na análise comparativa pareada PLGS T100 vs T30
(conclusão)

Acesso http://www.phytozome.net/	Análise de expressão T100/T30 Descrição da proteína (Bartholomé et al., 2015)	PLGS				
		Score	T100/T30	Log(e)T100/T30	Log(e)StdDev	P-Value
Eucgr.F02754.1 PACid:23583639	Thioredoxin Superfamily Protein	12395.23	0.50	-0,7	0,06	0
Eucgr.J00880.2 PACid:23598756	Thioredoxin X	4812.77	0.70	-0,36	0,09	0
Eucgr.C03812.2 PACid:23573187	Thioredoxin-Dependent Peroxidase 1	10123.23	0.82	-0,2	0,03	0
Eucgr.H04456.1 PACid:23593771	Thylakoid Lumen 18.3 Kda Protein	3465.72	0.57	-0,56	0,11	0
Eucgr.E00068.1 PACid:23576707	Thylakoid Rhodanese-Like	6576.42	0.48	-0,74	0,07	0
Eucgr.F04344.2 PACid:23585603	Thylakoidal Ascorbate Peroxidase	3102.61	0.84	-0,18	0,06	0
Eucgr.D02467.1 PACid:23576377	Transketolase	10166.67	0.45	-0,79	0,06	0
Eucgr.H03140.2 PACid:23592456	Translation Elongation Factor Ef1B/Ribosomal Protein S6 Family Protein	1672.62	T100	-	-	-
Eucgr.D02023.1 PACid:23575830	Translation Elongation Factor Efg/Ef2 Protein	339.36	T30	-	-	-
Eucgr.H03928.1 PACid:23593191	Translationally Controlled Tumor Protein	1038.89	1.06	0,06	0,13	0,83
Eucgr.J00008.3 PACid:23597644	Triosephosphate Isomerase	6174.25	T100	-	-	-
Eucgr.I01374.1 PACid:23595938	Triosephosphate Isomerase	12464.59	0.83	-0,19	0,03	0
Eucgr.F02905.2 PACid:23583830	Udp-Glucose Pyrophosphorylase 2	1963.16	0.88	-0,13	0,09	0
Eucgr.C02498.1 PACid:23571970	Uncharacterised Bcr, Ybab Family Cog0718	519.77	T100	-	-	-
Eucgr.J03143.1 PACid:23601309	Uridyltransferase-Related	3302.46	0.59	-0,52	0,1	0
Eucgr.I02018.1 PACid:23596732	Voltage Dependent Anion Channel 1	4575.81	1.17	0,16	0,05	1
Eucgr.J02133.1 PACid:23600207	Voltage Dependent Anion Channel 1	1153.75	1.03	0,03	0,1	0,67
Eucgr.F03988.1 PACid:23585211	-	3829.22	0.45	-0,79	0,09	0
Eucgr.L00742.2 PACid:23605901	-	846.01	0.76	-0,28	0,21	0
Eucgr.B01217.1 PACid:23566341	-	629.75	T100	-	-	-

ANEXO C

Tabela 9 – Descrição e informações dos metabólitos identificados nos diferentes tratamentos (ID: Identificação; RI: Índice do tempo de retenção; C: Componente)
(continua)

ID Biblioteca	Golm metabolome database <gmd.mpimp-golm.mpg.de>				VIPs scores		
	Descrição do Metabólito	Descrição do Analito	Classe	RI	C 1	C 2	C 3
62	3-hydroxypyridine	Pyridine, 3-hydroxy- (1TMS)	Alcohol (N-heterocycle)	1136,97	0,53	0,68	0,72
135	4-methyl-2-oxovaleric acid	Isocaproic acid, 2-oxo- (2TMS)	Acid (Oxo)	1236,8	0,55	0,57	0,57
676	5-Acetamidopentanoic-acid	5-Acetamidopentanoic-acid 1TMS	-	1634,91	0,19	0,38	0,38
287	5-Methyl-2H-1,2,6-oxadiazin-3(6H)-one	5-Methyl-2H-1,2,6-oxadiazin-3(6H)-one (1MEOX) (2TMS)	-	1381,07	-	-	-
653	6-deoxy-Mannopyranose	6-deoxy-Mannopyranose 4TMS	-	1626,43	0,47	0,47	0,5
43	6-epi-castanospermine	6-epi-castanospermine (4TMS)	-	2033,00	0,79	1,03	1,02
2151	a-D-Glcp-1,1-D-Mannitol	alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-mannitol (9TMS)	Conjugate (Hexosyl, Hexitol)	2894,4	0,91	0,87	0,88
1723	Alanine, N-(3-indolylacetyl)-	Alanine, N-(3-indolylacetyl)- (3TMS)	Conjugate (Indolylacetyl, Amino acid)	2371,97	0,23	0,22	0,22
2125	Alpha-Adenosine	Adenosine, alpha- (4TMS) BP	-	2841,21	2,33	2,23	2,21
2074	Alpha-D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-galactopyranoside	alpha-D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-galactopyranoside (1MEOX) (8TMS) BP	-	2782,27	-	-	-
2164	Androst-4-en-3,17-dione, 19-hydroxy-	Androst-4-en-3,17-dione, 19-hydroxy- (2MEOX) (1TMS) BP	-	2888,19	1,53	1,49	1,48
790	Arabitol	Arabitol (5TMS)	Polyol (Pentitol)	1707,57	0,06	0,07	0,1
1880	Arbutin	4-Hydroxyphenyl-beta-glucopyranoside (5TMS)	-	2577,67	0,95	0,9	0,92
730	Asparagine	Asparagine (3TMS)	Acid (Amino)	1666,44	0,54	0,51	0,51
176	Benzoic acid	Benzoic acid, (1TMS)	Acid (Aromatic)	1251,31	0,73	0,71	0,71
381	Benzoic acid, 3-amino-2,3-dihydro-	Benzoic acid, 3-amino-2,3-dihydro- (1TMS)	-	1447,51	0,51	0,51	0,52
661	Benzoic acid, 4-hydroxy-	Benzoic acid, 4-hydroxy- (2TMS)	Acid (Aromatic)	1633,29	0,18	0,21	0,27
1955	B-Estradiol	Estradiol, 17beta- (2TMS)	Terpenoid (Sterols)	2720,66	1,12	1,1	1,14
9	Beta-Alanine	Alanine, beta- (1TMS)	Acid (Amino)	1005,49	0,04	0,08	0,08
221	Caproic acid, 2-oxo-	Caproic acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP	-	1252,87	0,9	1,08	1,09
2073	Cellobiose	Cellobiose, D- (8TMS)	Sugar (Disaccharide)	2768,06	1,55	1,54	1,57
1070	Cinnamic acid, 3,5-dimethoxy-, cis-	Cinnamic acid, 3,5-dimethoxy-, cis- (1TMS)	Acid (Phenylpropanoic)	1854,74	1,59	1,58	1,56
944	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis-	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis- (2TMS)	Acid (Phenylpropanoic)	1789,44	1,76	1,67	1,66
1245	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, trans-	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, trans- (2TMS)	Acid (Phenylpropanoic)	1947,53	0,77	1,02	1,01
546	Creatinine	Creatinine (3TMS)	Amine (N-heterocycle)	1553,67	1,58	1,51	1,51
302	Decan-1-ol	Decan-1-ol, n- (1TMS)	Alcohol (Mono, Primary)	1378,23	1,86	1,77	1,75
164	Diethyleneglycol	Diethyleneglycol (2TMS)	Alcohol (Ether)	1236,16	0,11	0,24	0,24
616	Digitoxose	Digitoxose (1MEOX) (3TMS) BP	-	1602,43	-	-	-
349	Dihydrocinnamic acid	Hydrocinnamic acid (1TMS)	-	1423,84	1,15	1,17	1,15
202	Diisopropanolamine	Diisopropanolamine (2TMS)	-	1305,17	1,1	1,07	1,07
1702	Eicosanoic acid methyl ester	Eicosanoic acid methyl ester (FAME MIX)	Acid (Fatty acid methyl ester)	2342,06	0,69	0,82	0,81
1607	Elaidic acid	Octadecenoic acid, 9-(E)- (1TMS)	Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)	2225,44	1,03	0,97	0,97
532	Erythronic acid	Erythronic acid (4TMS)	Acid (Hydroxy)	1528,56	0	0,2	0,2
409	Erythrose	Erythrose (1MEOX) (3TMS) MP	Sugar (Tetrose)	1440,31	0,25	0,37	0,37
1948	Etiocolan-17beta-ol-3-one	Etiocolan-17beta-ol-3-one (1MEOX) (1TMS)	-	2682,22	0,7	0,67	0,7
268	Fumaric acid	Fumaric acid (2TMS)	Acid (Dicarboxylic)	1346,8	1,15	1,09	1,08
70	Furan-2-carboxylic acid	Furan-2-carboxylic acid (1TMS)	-	1133,08	1,55	1,53	1,52
2246	Galactinol	Galactinol (9TMS)	Conjugate (Hexosyl, Inositol)	2966,29	1,71	1,62	1,61
1228	Galactitol	Galactitol (6TMS)	Polyol (Hexitol)	1924,07	0,53	0,51	0,5
1411	Galactosamine, N-acetyl-	Galactosamine, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) MP	-	2064,31	0,42	0,47	0,48

Tabela 9 – Descrição e informações dos metabólitos identificados nos diferentes tratamentos (ID: Identificação; RI: Índice do tempo de retenção; C: Componente)

(continuação)

ID Biblioteca	Golm metabolome database <gmd.mpimp-golm.mpg.de>				VIPs scores		
	Descrição do Metabólito	Descrição do Analito	Classe	RI	C 1	C 2	C 3
1682	Galactose-6-phosphate	Galactose-6-phosphate (1MEOX) (6TMS) MP	Sugar (Phosphate)	2316,45	0,33	0,36	0,36
1689	Galacturonic acid-1-phosphate	Galacturonic acid-1-phosphate (6TMS)	-	2376,58	0,63	0,59	0,59
1332	Gluconic acid, 2-amino-2-deoxy-	Gluconic acid, 2-amino-2-deoxy- (6TMS)	Acid (Hexonic, amine)	1980,05	-	-	-
1712	Glucose-6-phosphate, 2-amino-2-deoxy-	Glucose-6-phosphate, 2-amino-2-deoxy- (1MEOX) (6TMS) BP	Sugar (Hexose, aldose, amine, phosphate)	2358,48	0,37	0,35	0,35
1147	Glucuronic acid-3,6-lactone	Glucuronic acid-3,6-lactone (1MEOX) (3TMS) MP	Acid (Hexuronic, lactone)	1893,44	0,7	1,03	1,02
893	Glutamic acid, N-acetyl-	Glutamic acid, N-acetyl- (2TMS)	Acid (Amino, N-acyl-)	1780,92	0,55	0,66	0,66
203	Glycinamide	Glycinamide (2TMS) BP1	-	1300,06	0,72	0,8	0,81
30	Glycyl-phenylalanine	Hexanoic acid (1TMS)	-	1062,00	0,4	0,38	0,38
195	Homoserine lactone	Homoserine-lactone 1TMS	Acid (Amino, lactone)	1285,71	0,67	0,98	0,99
1075	Homoserine lactone, N-2-oxocaproyl-	Homoserine lactone, N-2-oxocaproyl- (1MEOX) (1TMS) BP	-	1861,22	0,73	0,69	0,69
1810	Inositol-2-phosphate, myo-	Inositol-2-phosphate, myo- (7TMS)	Polyol (Inositol, Phosphate)	2477,78	0,65	0,62	0,63
218	Isoleucine	Isoleucine (2TMS)	Acid (Amino)	1286,69	0,1	0,55	0,57
2150	Isomaltitol	alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-glucitol (9TMS)	Conjugate (Hexosyl, Hexitol)	2883,12	0,28	0,29	0,44
45	Limonene	Limonene, (-)	Terpenoid (Di)	1036,89	1,82	1,72	1,71
1582	Malic acid, 3-oxalo-	Docosane, n-	-	2200,00	0,93	0,88	0,87
468	Malonamide	Malonamide (2TMS)	-	1497,4	2,3	2,18	2,16
1134	Mannose	Mannose (1MEOX) (5TMS) BP	Sugar (Hexose, aldose)	1885,22	1,15	1,22	1,21
587	M-Hydroxybenzoic acid	Benzoic acid, 3-hydroxy- (2TMS)	Acid (Aromatic)	1568,99	1,18	1,12	1,1
1649	Muramic acid, N-acetyl-	Muramic acid, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) BP	-	2277,4	1,58	1,5	1,5
1775	Nivalenol	Nivalenol (4TMS)	-	2446,55	-	-	-
500	N-methyl cis-4-hydroxymethyl-L-proline	N-methyl cis-4-hydroxymethyl-L-proline (2TMS)	-	1514,37	1,96	1,86	1,88
153	Norvaline	Norvaline, DL- (2TMS)	Acid (Amino)	1229,91	0,03	0,67	0,67
1611	Octadecatrienoic acid	Octadecatrienoic acid, n- (1TMS)	Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)	2226,44	1,48	1,42	1,41
267	O-Toluic-acid	O-Toluic-acid 1TMS	-	1359,08	-	-	-
149	Oxamic acid	Oxamic acid (2TMS)	-	1254,93	0,23	0,78	0,82
222	Oxamide	Oxamide (2TMS)	-	1328,63	0,86	0,87	0,86
2281	Pregnane-3alpha,21-diol-11,20-dione, 5beta-	Pregnane-3alpha,21-diol-11,20-dione, 5beta- (1MEOX) (2TMS) MP	-	3041,53	0,79	0,8	0,8
2203	Pregnenolone, 17alpha-hydroxy-	Pregnenolone, 17alpha-hydroxy- (1MEOX) (2TMS) MP	-	2923,46	-	-	-
2251	Progesterone	Progesterone (2MEOX) BP	-	2995,39	0,75	0,75	0,74
96	Proline	Proline (1TMS)	Acid (Amino)	1176,03	0,4	0,54	0,58
720	Propanoic acid, 3-ureido-	Propionic acid, 3-ureido- (2TMS)	Acid (Ureido)	1674,89	0,5	0,58	0,58
853	Putrescine, N-acetyl-	Putrescine, N-acetyl- (2TMS)	-	1758,1	1,4	1,34	1,35
255	Pyrrole-2-carboxylic acid	Pyrrole-2-carboxylic acid (2TMS)	-	1350,67	0,1	0,27	0,29
21	Pyruvic acid	Pyruvic acid (1MEOX) (1TMS)	Acid (Oxo)	1037,28	1	1,05	1,04
35	Pyruvic acid	Pyruvic acid (2TMS)	Acid (Oxo)	1072,79	0,29	0,28	0,28
173	Sarcosineamide	Sarcosineamide (2TMS)	-	1276,94	1,26	1,25	1,27
923	Shikimic acid, 3-dehydro-	Shikimic acid, 3-dehydro- (1MEOX) (3TMS) BP	-	1789,24	0,47	0,53	0,55
1593	Shikimic acid-3-phosphate	Shikimic acid-3-phosphate (5TMS)	-	2210,86	-	-	-
1625	Sinapic acid, trans-	Sinapic acid, trans- (2TMS)	Acid (Phenylpropanoic)	2216,86	1,39	1,32	1,31
1095	Sorbose	Sorbose (1MEOX) (5TMS) MP	Sugar (Hexose, ketose)	1858,01	0,72	0,75	0,74
1626	Stearic acid	Octadecanoic acid (1TMS)	Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)	2243,45	0,35	0,34	0,35
97	Succinic semialdehyde	Succinic semialdehyde (1MEOX) (1TMS) MP	-	1177,1	0,08	0,16	0,22

Tabela 9 – Descrição e informações dos metabólitos identificados nos diferentes tratamentos (ID: Identificação; RI: Índice do tempo de retenção; C: Componente)

(conclusão)

Golm metabolome database <gmd.mpimp-golm.mpg.de>					VIPs scores		
ID Biblioteca	Descrição do Metabólito	Descrição do Analito	Classe	RI	C 1	C 2	C 3
79	Sulfuric acid	Sulfuric acid (2TMS)	Acid (Sulfate)	1143,43	1,28	1,27	1,26
891	Tetradecan-1-ol	Tetradecan-1-ol, n- (1TMS)	Alcohol (Mono, Primary)	1762,33	0,38	0,53	0,54
274	Thiazole, 4-methyl-5-hydroxyethyl-	Thiazole, 4-methyl-5-hydroxyethyl- (1TMS)	-	1375,95	1,21	1,15	1,14
297	Threonine	Threonine, allo- (3TMS)	Acid (Amino)	1382,98	0,6	0,67	0,66
649	Tridecanoic acid methyl ester, n-	Tridecanoic acid methyl ester, n-	Acid (Fatty acid methyl ester)	1624,69	0,22	0,29	0,32
645	Triethanolamine	Triethanolamine (3TMS)	Alcohol (Amino)	1620,5	1,45	1,4	1,39
501	Trigonelline	Trigonelline (1TMS)	-	1513,09	0,64	0,65	0,67
82	Valine, 2-oxo-	Isovaleric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP	Acid (Oxo)	1095,76	0,6	0,62	0,61
1929	Xanthosine	Xanthosine (5TMS)	Nucleoside	2669,06	0,85	0,8	0,8
235	-	Lumichrome (2MEOX)	-	1332,56	1,12	1,07	1,06
1797	-	RL-1 4TMS	-	2454,46	1,44	1,36	1,35
678	-	Succinyl-lactate 2TMS	-	1641,61	0,93	0,9	0,89