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

Sequenciamento, identificação e análise de proteínas
do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*

Alexander de Andrade

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
2006

ALEXANDER DE ANDRADE
Engenheiro Agrônomo

Sequenciamento, identificação e análise de proteínas
do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*

Orientador:

Prof. Dr CARLOS ALBERTO LABATE

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Andrade, Alexander de

Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de
Eucalyptus grandis / Alexander de Andrade. - - Piracicaba, 2006.
120 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Caule 2. Eletroforese 3. Espectrometria de massas 4. Eucalipto 5. Madeira
6. Proteínas I. Título

CDD634.9734

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

**De todas as invenções, a mais preciosa é o sonho.
Heinrich Heine (1797 – 1856).**

**A minha namorada Daniela pelas
horas de incentivo, paciência,
compreensão e carinho,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade e confiança em mim depositada, pela orientação e amizade.

A Dra. Mônica T. Labate pela amizade, sugestões e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcio Lambais pela confiança e por ter permitido usar o seu laboratório para realizar a focalização isoelétrica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo por ter permitido usar o seu laboratório para realizar a análise dos géis.

Aos professores do Departamento de Genética pelos ensinamentos.

Ao grupo proteoma formado pela Paola, Karen, Mateus e liderado pelo Prof. Labate pela colaboração na realização deste trabalho, constante troca de informações e agradável convivência.

Ao amigo Esteban por toda a ajuda e sugestões durante a realização deste trabalho e no decorrer do curso.

Ao amigo Simão por toda a ajuda durante a realização do gel 2D-PAGE.

Aos amigos do laboratório: Alex, Cris, Daniela, Daniele, David, Eduardo, Felipe, Fernanda, Gisele, Guilherme, Gunta, Inês, Juliana, Juliano, Leandro, Letícia, Lilia, Lívia, Luis, Mayra, Palmira, Raphael, Renan e Simone pela convivência e ajuda no decorrer do trabalho e do curso.

Aos amigos colegas e funcionários do curso de genética e melhoramento de plantas.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	16
2.2 Importância econômica do eucalipto	18
2.3 O proteoma	20
2.3.1 Eletroforese bidimensional	21
2.3.2 Espectrometria de massas	23
2.3.2.1 MALDI “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization”	23
2.3.2.2 ESI “Electrospray Ionization”	25
2.3.2.3 A evolução da espectrometria de massas	26
2.3 Xilogênese	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material vegetal	35
3.2 Extração das proteínas	36
3.2.1 Método de extração fenólica	37
3.2.2 Método de extração ácida.....	37
3.2.3 Método de extração ácida modificado.....	38
3.3 Remoção dos ácidos nucleicos da amostra	39
3.4 Quantificação das proteínas	39
3.5 Eletroforese bidimensional	40
3.5.1 Focalização isoeletrica (1º dimensão).....	40
3.5.2 SDS-PAGE (2º dimensão)	40
3.6 Detecção das proteínas	41
3.7 Obtenção e análise das imagens	41
3.8 Digestão das proteínas	42
3.9 Sequenciamento das proteínas	43
3.10 Análise das informações	44

3.11 Relação entre proteínas e nível de transcritos	47
4 RESULTADOS E DISCUSÕES	48
4.1 Avaliação dos protocolos de extração de proteínas.....	48
4.2 Avaliação da separação das proteínas por eletroforese bidimensional	53
4.3 Avaliação da metodologia de digestão	57
4.4 Proteínas de <i>Eucalyptus grandis</i> identificadas	58
4.5 Perfil do proteoma da madeira.....	79
4.5.1 Metabolismo	80
4.5.1.1 Metabolismo dos aminoácidos	80
4.5.1.2 Metabolismo do nitrogênio.....	81
4.5.1.3 Metabolismo dos nucleotídeos	82
4.5.1.4 Metabolismo dos carboidratos	83
4.5.1.5 Metabolismo secundário	83
4.5.2 Energia	84
4.5.2.1 Fotossíntese	84
4.5.2.2 Transporte de elétrons.....	85
4.5.2.3 Associado ao ATP	86
4.5.2.4 Metabolismo da glicose	86
4.5.3 Processos celulares.....	88
4.5.3.1 Regulação intracelular.....	88
4.5.3.2 Divisão celular	89
4.5.3.3 Estresse	89
4.5.3.4 Redox	90
4.5.4 Transporte.....	91
4.5.4.1 Pequenas moléculas de transporte	91
4.5.5 Componentes estruturais	91
4.5.5.1 Metabolismo da lignina.....	91
4.5.5.2 Citoesqueleto.....	92
4.5.5.2.1 Actina.....	92
4.5.5.2.2 Tubulinas.....	93
4.5.6 Metabolismo macromolecular.....	93
4.5.6.1 Histona	93
4.5.6.2 Biossíntese de proteína	94

4.5.6.3 Ribosomo	94
4.5.6.4 Degradação de proteínas.....	94
4.5.7 Função não definida.....	95
4.5.7.1 Proteínas prováveis	95
4.5.7.2 Proteínas que não apresentaram homologia	95
4.6 Correlação entre proteínas e nível de transcritos	96
5 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS.....	101

RESUMO

Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*

Apesar da importância econômica e ambiental que a madeira representa como fonte natural e renovável de energia e fibras, pouco é conhecido sobre os processos celulares, moleculares e bioquímicos envolvidos com a sua formação. Usando metodologias proteômicas como 2D-PAGE e espectrometria de massas foi iniciada a análise do proteoma do caule de *Eucalyptus grandis* em diferentes estádios de desenvolvimento (5 meses, 3 anos e 6 anos). O presente trabalho baseou-se especificamente na idade de cinco meses. As plantas tiveram suas folhas, raízes e cascas removidas e seus caules foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e as proteínas extraídas pelo método de extração fenólica. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional em fitas IPG com gradiente de pH imobilizado linear de 4-7 na primeira dimensão e gel de poliacrilamida (12,5%) na segunda dimensão. A coloração dos géis foi realizada com coomassie G250. Foram detectados 438 *spots* e um total de 168 *spots* foram retirados do gel, digeridos com tripsina e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massas através do sistema LC-MS/MS. O sequenciamento por MS apresentou uma eficiência de 72,02% possibilitando a identificação de 121 *spots*, enquanto que 35 (20,83%) não apresentaram homologia com nenhuma base de dados. Entre as proteínas identificadas 22 foram representadas por mais de um *spot*, podendo indicar a ocorrência de eventos provenientes do splicing alternativo, modificações pós-traducional, variações alélicas de uma mesma proteína ou degradação da amostra. Entre os *spots* analisados, 22,02% estão relacionados com a produção de energia, (17,86%) metabolismo, (13,69%) processos celulares, (0,60%) transporte, (8,33%) componentes estruturais, (5,36%) metabolismo macromolecular, (4,17%) proteínas putativas, (20,83%) não apresentaram homologia com nenhuma base de dados e (7,14%) não demonstraram resultado. A comparação realizada entre o volume de 59 proteínas e os seus respectivos transcritos demonstrou que não existe correlação entre mRNA e as proteínas do caule. O método possibilitou uma rápida e

precisa separação e identificação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* que são diferencialmente expressas durante a fase de crescimento de cinco meses.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Madeira; Espectrometria de massas; Eletroforese bidimensional; Xilogênese

ABSTRACT

Sequencing, identification and analysis of juvenile *Eucalyptus grandis* xylem proteins

The process of wood formation is an important economical factor for the forestry industry and it is also of ecological importance, although little is known about the proteins involved in wood formation. The sequencing, identification and analysis of proteins provides such information of wood formation. Using proteomics techniques such as two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry we have started a proteomic analysis of wood formation in *Eucalyptus grandis* at different stages of development (5 months, 3 and 6 years old). This work presents data related to the stage of 5 months. Using high resolution 2DE with linear pH gradient ranging from 4 to 7, a total of 438 spots were detected. However, only 168 spots were analyzed by LC ESI-MS/MS and 121 were identified (72.02%) while 35 (20.83%) presented no homology in the database used. Overall, 22 proteins appeared as multiple spots and accounted for most of the proteins found in the group. This observation may reflect post-translation modification, alternative splicing events, isozyme variation, allelic variation of the same protein, but also protein degradation. Over the 168 spots analysed, (22.02%) play a role in energy, (17.86%) metabolism, (13.69%) cellular processes, (0.60%) transport, (8.33%) structural components, (5.36%) macromolecular metabolism, (4.17%) putative protein, (20.83%) no homology and (7.14%) no result. For 59 proteins, the spot volume was compared with their respective transcript with mRNAs extracted from wood forming tissue. The method provided a faster and accurate tool for separation and identify of protein which are differentially expressed under different stages of development in *Eucalyptus grandis*.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; Wood; Mass spectrometry; Two dimensional electrophoresis; Xylogenesis

ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila.

AMBIC - Bicarbonato de amônio.

BSA - Albumina de soro bovina.

DTT - Ditionitrito.

EDTA - Etilenodiaminatetracetato.

ESI - *Electrospray Ionization*.

EST - Expressed Sequence Tags.

M - Molar.

MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*.

MS - Espectrometria de massas.

mgL⁻¹ - Miligramas por litro.

m/z - Razão entre a massa e a carga.

pI - Ponto isoelétrico.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

TCA - Ácido tricloroacético.

TEMED - Tetrametiletilenodiamina.

TOF - *Time-of-flight*.

μM - Micromolar.

μL – Microlitro.

SAGE - *Serial Analysis of Gene Expression*.

p/v - Concentração em peso/volume.

v/v - Concentração em volume/volume.

1 INTRODUÇÃO

Os grandes investimentos realizados nos anos 90 na área da genômica promoveram significativos avanços tecnológicos no campo da biologia. A inovação e consolidação de técnicas de análise genômica tornaram possível o sequenciamento do genoma de seres complexos como plantas, animais e até humanos. A disponibilidade de seqüências genômicas completas tem possibilitado pela primeira vez um estudo e análise do genoma como um todo. Os estudos envolvendo a genômica têm permitido também a análise comparativa de organizações genômicas conservadas e genomas de diferentes organismos (MUSHEGIAN; KOONIN, 1996; MEYEROWITZ, 1999).

Os dados gerados pelo sequenciamento do genoma, embora relevantes, são limitados, sendo imprescindível a integração com outras técnicas que permitem estudar tanto os processos de transcrição das informações contidas nos genes quanto aos seus produtos, as proteínas. Esta constatação deu início a uma nova etapa na pesquisa biológica em larga escala conhecida como “Era Pós-Genômica”, promovendo o desenvolvimento de novas técnicas para o estudo e análise de transcritos de mRNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica), integradas pela bioinformática (PALSSON, 2002; WECKWERTH et al., 2004).

O desenvolvimento da proteômica tem procurado complementar os dados gerados pela genômica e a transcriptômica, representando uma ponte entre os genes e o seu produto, as proteínas. A combinação da genômica funcional com a proteômica pode indicar, se a regulação de um determinado gene acontece durante a transcrição ou tradução (VAN WIJK, 2001). Os recentes avanços na proteômica com o desenvolvimento de diferentes técnicas analíticas têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática das proteínas expressas pelo genoma (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A proteômica tem possibilitado saber se, e quando, um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. Tais informações não podem ser determinadas a partir do genoma e o transcriptoma de um organismo. A análise do

proteoma vai além da simples listagem de proteínas podendo fornecer indícios substanciais quanto à organização e à dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais a célula se desenvolve. Uma das inovações geradas pelos projetos proteomas, além do mapeamento de intrincados caminhos metabólicos celulares, é a possibilidade de identificar novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (PANDEY; MANN, 2000; PIMENTA, 2003).

O melhoramento de arbóreas apresenta limitações como barreiras genéticas além de demandar muito tempo na obtenção de resultados, devido à necessidade de sucessivos cruzamentos dirigidos e as limitações que são impostas pelo longo ciclo de vida das espécies arbóreas, entre elas o *Eucalyptus*. Estas novas tecnologias aliadas ao melhoramento convencional oferecem a oportunidade de obtenção de plantas que apresentam um melhor desempenho no desenvolvimento vegetativo e produção de biomassa, além de mais resistentes a fatores bióticos e abióticos, atendendo com isso a uma demanda crescente da produção de papel e celulose.

Estudos com plantas transgênicas têm demonstrado que a alteração da expressão de genes relacionados com a rota metabólica da lignina pode alterar a sua composição e quantidade em árvores. A principal consequência da redução da quantidade e composição da lignina em árvores é a diminuição do uso de produtos químicos empregados durante o processo de sua extração na produção de papel e celulose, reduzindo custos e minimizando os impactos ambientais (BAUCHER et al., 2003).

O projeto tem por objetivo o estudo de proteínas do caule de plantas de *Eucalyptus grandis* de 5 meses, com a separação por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas. Este projeto é complementado por dois outros projetos de sequenciamento de proteínas do xilema em desenvolvimento em estádios mais avançados 3 anos e 6 anos (próximo da idade de colheita para a indústria de celulose). Com base nos resultados desses projetos será possível traçar um panorama das proteínas expressas durante a formação do caule em diferentes estádios de desenvolvimento do eucalipto. Além disso, está em andamento outro projeto paralelo utilizando a tecnologia "SAGE" para identificar e quantificar o padrão de expressão dos

genes nos mesmos tecidos e estádios de desenvolvimento. O objetivo de todos esses trabalhos é criar um banco de dados com informações do transcriptoma e proteoma associados a xilogênese para posteriormente identificar genes de interesse para a manipulação genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, sub-gênero *Symphyomyrtus* e é composto por mais de 700 espécies, 24 subespécies, 24 variedades e vários híbridos naturais, podendo ser encontrado desde a forma arbustiva até árvores de grande porte, distribuídas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. Possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas como Timor, Indonésia, Papua Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas (Figura 1), em uma faixa compreendida entre latitudes 9° N e 44° S (ELDRIDGE et al., 1993; BROOKER, 2000; POKE et al., 2005).

Figura 1 – Região de origem de espécies do gênero *Eucalyptus*

As plantas de *Eucalyptus* são diplóides com número básico de $2n=22$ cromossomos da mesma forma que a maioria dos gêneros da família Myrtaceae (ELDRIDGE et al., 1993; POTTS; WILTSHIRE, 1997). O gênero apresenta cromossomos pequenos e um conteúdo de DNA nuclear que varia de 370 a 700 milhões de pares de base. As espécies *Symphyomyrtus* possuem em média um genoma haplóide de 650 Mpb algumas espécies com conteúdo de DNA similar (*E.globulus* e *E.dunnii*). Entretanto existe uma variação entre as espécies, o *Corymbia* tendo o menor genoma haplóide com 380 Mpb e o maior *E. saligna* com 710 Mpb (GRATTAPAGLIA; BRADSHAW, 1994).

O eucalipto é atualmente cultivado predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical, entre as latitudes de 40° N e 45° S, em altitudes que variam de 30 a 1000 metros, possui espécies adaptadas a diversas condições de clima e solo, inclusive àqueles com salinidade de 2 a 3 % (CRESSWELL et al., 1985).

O plantio extensivo do *Eucalyptus* está distribuído não apenas na Austrália, também na América do Sul, Ásia, África e Sul da Europa com pelo menos 12 milhões de hectares plantados. *Eucalyptus grandis*, *E. globulus* e *E. camaldulensis* e seus híbridos são as principais espécies plantadas, correspondendo a 80% da área plantada. Os maiores produtores são: Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha e China (TURNBULL, 1999; POKE et al., 2005).

O rápido crescimento, produtividade média de 45 m³.ha⁻¹ por ano em plantios clonais, associado à produção de fibras curtas e polpa de madeira de alta qualidade, com baixo custo em um curto período (5 - 7 anos), e um regime de manejo que permite até 3 rotações sucessivas e econômicas, com ciclo de até 21 anos, são as principais razões do extensivo uso do *Eucalyptus* em reflorestamentos comerciais no Brasil (HO et al., 1998).

A ótima adaptação do eucalipto às condições de clima e solo, levou o Brasil a tornar-se o maior produtor mundial, possuindo uma área estimada em 2,965,880 ha. Os principais estados brasileiros produtores de eucalipto são: Minas Gerais, São Paulo e Bahia (SBS, 2004).

O interesse no melhoramento genético do eucalipto aumentou com a importância econômica das plantações comerciais, o que resultou no desenvolvimento

de programas próprios para atender às necessidades de cada região. Graças ao intenso trabalho realizado por melhoristas nas últimas décadas, o Brasil possui hoje um dos mais importantes bancos de germoplasma do gênero *Eucalyptus*, com alta produtividade e adaptabilidade ao nosso ambiente. Os programas de melhoramento genético de eucalipto têm adotado dois componentes: geração de tipos úteis de variação de natureza genética e epigenética através do melhoramento e seleção, manutenção e multiplicação de caracteres desejáveis, através de métodos de propagação sexual e assexual (MANTELL, 1994).

Os principais obstáculos do melhoramento genético de espécies florestais, são o longo tempo necessário para completar um ciclo de seleção e recombinação dos indivíduos, para características quantitativas e que se expressam somente em idades mais avançadas, e a dificuldade em selecionar de forma eficiente do ponto de vista de indivíduo (QUOIRIN; VIEIRA, 1995).

2.2 Importância econômica do eucalipto

O Brasil ocupa hoje a sétima posição mundial na produção de celulose e a 11º como fabricante de papel. Nos últimos 10 anos, investimentos da ordem de US\$ 12 bilhões usados na ampliação de sua capacidade produtiva, pelo Setor de Papel e Celulose promoveram um aumento na produção de celulose de 1,4 para 6,0 milhões de toneladas por ano, tornando o Brasil o maior produtor mundial de celulose de fibra curta, obtida a partir de eucalipto. O setor brasileiro de papel e celulose contribui de forma relevante para o desenvolvimento do País, em termos de geração de renda, tributos, empregos e divisas, bem como de promoção do desenvolvimento regional (BRACELPA, 2006).

O setor de base florestal brasileiro oferece cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos. O setor apresentou em 2004 um faturamento de US\$ 24,6 bilhões e as exportações brasileiras diretamente ligadas ao setor atingiram US\$ 7 bilhões, correspondendo a 7,3% do total exportado pelo Brasil (LEITE, 2005).

A celulose de eucalipto é o produto de base florestal que possui a participação mais expressiva no mercado mundial representando 5,2% dos negócios internacionais.

Pesquisas realizadas por institutos internacionais indicam que a demanda mundial de celulose deverá crescer a uma taxa média anual de 2,7%. Estas projeções abrem excelentes perspectivas para que as empresas brasileiras retomem seus programas de investimento e participem deste crescimento da demanda mundial de papel e celulose. O consumo per capita brasileiro de papel é um dos mais baixos do mundo, registrando, em 2004, apenas 40,0 kg por habitante ano, ainda muito distantes dos níveis observados em países desenvolvidos como os EUA (312,0 kg) e o Japão (246,0 kg). Os dados demonstram o potencial de crescimento de consumo que existe no mercado interno (BRACELPA, 2006).

O setor de papel e celulose apresentou ao governo um novo programa nacional de investimentos da ordem de US\$ 14,4 bilhões para o período de 2003 a 2012, destinado a expandir a área florestal, bem como à ampliação e modernização de sua capacidade de produção. A concretização desses investimentos possibilitará o aumento de 59 % na produção de celulose, de 9,1 para 14,5 milhões de toneladas e de 46% na produção de papel, aumentando de 7,9 para 11,5 milhões de toneladas. Dessa forma será possível assegurar o pleno atendimento do mercado interno e o crescimento das exportações, principalmente de celulose (BRACELPA, 2006).

As exportações de celulose e papel previstas para o final de 2012 são de US\$ 4,3 bilhões, um crescimento de 54%. O setor apresentará um saldo comercial estimado em US\$ 30,4 bilhões, gerando um adicional de impostos de R\$ 7,1 bilhões, além de 60,7 mil novos empregos. Esse grande programa de investimento dependerá de condições de competitividade para ser realizado ou seja, é necessário que a indústria brasileira de papel e celulose disponha de isonomia com seus concorrentes internacionais (BRACELPA, 2006).

O desafio para o setor de papel e celulose nos próximos anos, não é apenas o de investimentos na área industrial, mas também de aumento da produtividade e qualidade. A biotecnologia através da propagação clonal tem contribuído com o aumento da produtividade e da uniformidade da área cultivada.

Programas de pesquisas desenvolvidos por instituições públicas e privadas usando técnicas como o mapeamento genético, transgenia, genômica, transcriptômica e proteômica, aliadas ao melhoramento convencional, oferecem a oportunidade de obtenção de plantas que apresentam um ótimo desempenho de desenvolvimento vegetativo e de biomassa, além de maior resistência a fatores bióticos e abióticos, atendendo com isso a uma demanda crescente de papel e celulose.

2.3 O proteoma

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo. O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam conforme o contexto, momento ou evento metabólico que é submetido o organismo (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1995; LOPEZ, 1999).

O estudo em larga escala da expressão gênica de proteínas é conhecido como proteômica. A proteômica envolve o isolamento sistemático, identificação, quantificação e sequenciamento de proteínas expressas em uma organela, célula, ou tecido de um organismo, como também a determinação de seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades (ANDERSON et al., 2001).

As diferentes aplicações da proteômica tornaram-se possíveis através da integração e evolução de diferentes técnicas analíticas e da bioinformática, que permitiu gerenciar, analisar e integrar os dados.

As principais técnicas usadas em proteômica no isolamento e identificação de proteínas são: a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), a cromatografia líquida e capilar; por usarem princípios diferentes são técnicas complementares. Já no sequenciamento de peptídeos e proteínas, as técnicas usadas são a degradação de Edman e a espectrometria de massas (MS). Embora a degradação de Edman seja amplamente usada, tem como limitações: baixa sensibilidade, consome muito tempo (em média uma hora por aminoácido) sendo incompatível com proteínas que apresentam a região N-terminal bloqueada (PENG; GYGI, 2001). A eletroforese bidimensional combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massas são atualmente as técnicas mais usadas em proteômica (GÖRG et al., 2004).

As informações geradas via proteômica têm sido complementares ao sequenciamento do DNA e mRNA por focalizar o produto do genoma que é a proteína. Tem-se observado que em muitos casos não existe uma correlação direta entre a expressão do mRNA e o nível protéico, sendo necessária sua avaliação experimentalmente (ZHANG et al., 1997; GRIFFIN et al., 2002). Através da proteômica é possível: determinar a localização do produto de um gene que muitas vezes é impossível de ser obtido a partir da seqüência do DNA; estudar mecanismos como a regulação de proteínas funcionais por proteólise e sua influência na regulação gênica; a interação entre proteínas e a composição molecular de estruturas celulares como organelas podem ser determinadas apenas no nível protéico (KALUME et al., 2003).

As modificações não aparentes na seqüência do genoma, como isoformas e modificações pós-tradução, são extremamente importantes e muitas vezes necessárias para determinar a função, atividade, estabilidade, localização e *turnover* da proteína, podem ser determinadas pela proteômica. Entre as modificações pós-tradução mais de 283 exemplos são conhecidos até o momento, entretanto muitas ainda são esperadas. Identificar qual é a modificação e a sua localização freqüentemente fornece informações cruciais para compreender a função e a regulação de uma certa proteína em uma rota metabólica (KRISHNA; WOLD, 1993; GARAVELLI et al., 2001).

Muitas estratégias são adotadas na análise e estudo das modificações pós-tradução, embora muitas focalizem apenas um tipo específico de modificação, como o estudo da fosforilação de proteínas usando anticorpos específicos e cromatografia de afinidade (GRIFFIN; AEBERSOLD, 2001). A eletroforese bidimensional junto com a espectrometria de massas e modernos softwares tem possibilitado o estudo e detecção de diferentes modificações, com uma grande precisão e rapidez (KUSTER; MANN, 1997).

2.3.1 Eletroforese bidimensional

A técnica da eletroforese bidimensional foi primeiramente descrita por O'FARRELL em 1975. Através da combinação da focalização isoeletrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, a técnica permite a separação,

detecção e quantificação de milhares de proteínas simultaneamente presentes em uma amostra complexa além de revelar modificações pós-tradução. A técnica da eletroforese bidimensional separa as proteínas pela sua carga (focalização isoelétrica ou IEF) na primeira dimensão e pelo seu peso molecular (SDS PAGE) na segunda dimensão. Quando realizadas isoladamente, as técnicas do IEF e do SDS PAGE permitem a separação de aproximadamente 100 proteínas de uma amostra heterogênea, porém, quando combinadas permitem a separação teórica de cerca de 10000 *spots* individuais. Na prática um gel de 2D-PAGE com alta resolução permite a visualização de aproximadamente 3000 proteínas dependendo da amostra e da sensibilidade da técnica de revelação, embora já tenham sido descritos géis com 10000 spots (KLOSE; KOBALZ, 1995).

Por muito tempo o uso da eletroforese bidimensional foi limitado, devido à sua baixa resolução e reprodutibilidade. Nos últimos anos com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e com o aperfeiçoamento da preparação das amostras, a técnica 2D-PAGE sofreu uma evolução tecnológica surpreendente, aumentando a sua resolução, sensibilidade e repetibilidade, tornando-se amplamente usada na separação e identificação de proteínas (GYGI; AEBERSOLD, 2000).

A capacidade da eletroforese bidimensional em separar milhares de proteínas simultaneamente tem possibilitado o seu uso na construção de mapas de padrão estrutural utilizados no estudo das proteínas expressas em órgãos, células, tecidos e organismos. A técnica tem sido amplamente utilizada na comparação dos produtos protéicos produzidos por grupos celulares expostos a diferentes condições biológicas, químicas e ambientais (GUERREIRO et al., 1997).

Através da construção de mapas celulares ou proteoma estruturais, diferentes laboratórios têm realizado análises comparativas entre indivíduos identificando proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas, sob diferentes condições, obtendo uma nova visão e compreensão sobre questões como expressão e regulação genética das proteínas (GUERREIRO et al., 1997; WIJK, 2001). As proteínas detectadas nesses mapas podem ter sua suposta identidade definida por sequenciamento pela espectrometria de massas combinada com ferramentas como a bioinformática (LOPEZ, 1999; NATERA et al., 2000).

2.3.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é provavelmente a mais versátil e abrangente técnica analítica atualmente disponível na química e bioquímica. Desde seu surgimento, no início de 1900 é usada nas mais diferentes áreas como química, física, bioquímica, geologia, cosmoquímica, ciência dos materiais, arqueologia, petroquímica, ciência forense, nuclear e estudos ambientais. A espectrometria de massas mede rapidamente, com grande precisão e sensibilidade, a massa molecular de átomos ou moléculas em Dalton (Da), a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z) (DASS, 2001).

O uso da espectrometria de massas por muito tempo ficou restrito a um pequeno número de moléculas capazes de resistir ao método de ionização e ao processo de análise que envolve a sua transferência para um sistema de alto vácuo e altas temperaturas, sendo um obstáculo no estudo de biomoléculas. No final dos anos 80 com o desenvolvimento de dois novos métodos de ionização branda o MALDI "*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*" (TANAKA, 1987) e o ESI "*Electrospray Ionization*" (FENN, 1989), ocorreu uma revolução na análise de biomoléculas (HILLENKAMP et al., 1991; LIN et al., 2003).

2.3.2.1 MALDI "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization"

O MALDI foi desenvolvido no final dos anos 80 por TANAKA e aprimorado por KARAS e HILLENKAMP, tendo como princípio a ionização de biomoléculas através do bombardeamento com laser. A técnica pode fornecer informações sobre o peso molecular e estrutura de biomoléculas (MANN, 2001; MANN; STEEN, 2004).

Na análise por MALDI a amostra é misturada a um solvente contendo um material com capacidade de absorver luz no comprimento de onda do laser, conhecido como matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico). A matriz absorve e transfere a energia do laser, permitindo a vaporização e ionização da amostra. Além de protegê-la de sofrer uma decomposição por excesso de energia e

prevenir a formação de agregados, prejudicando e comprometendo a análise (HILLENKAMP; KARAS; BEAVIS; 1991; PIMENTA, 2003).

A matriz e a amostra são aplicadas em uma placa de metal e após a evaporação do solvente, as moléculas da amostra cristalizam-se junto com a matriz. Esses cristais são então bombardeados, com um feixe de raio laser ionizando as moléculas, o esquema da ionização é demonstrado na Figura 2. Tradicionalmente, o analisador conjugado com o MALDI tem sido o TOF (*time-of-flight*), o qual determina a razão m/z de um íon através do tempo que ele demora em percorrer um determinado percurso (YATES, 1998; ASHCROFT, 2003).

Figura 2 - Esquema da ionização realizada por MALDI (STEEN; MANN, 2004)

O MALDI apresenta alta sensibilidade detectando moléculas em concentrações de fentomol, pouco consumo de amostra, média tolerância a sais, baixo nível de ruído, pouca fragmentação e predominantemente formação de íons monoprotonados ($M-H^+$) facilitando a interpretação dos espectros. Uma ampla variedade de compostos podem ser analisados por MALDI-TOF MS incluindo peptídeos, proteínas, glicoproteínas, lipídios, glicolipídeos, polímeros sintéticos polares

e não polares, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos, drogas e metabólitos (HARVEY, 1996; WU, 1998; PIMENTA, 2003).

2.3.2.2 ESI “Electrospray Ionization”

O ESI foi desenvolvido por FENN e colaboradores no final dos anos 80, os quais usaram uma descarga elétrica na ionização de biomoléculas. Na análise por ESI a amostra é dissolvida em um solvente volátil e ao passar por um estreito tubo capilar metálico, ao qual é aplicada uma voltagem, é gerado um aerossol de analito e solvente. Com a evaporação do solvente originam-se íons contendo um $(M-H^+)$ ou mais $[(M-nH)^{n+}]$ prótons. Os íons são subsequentemente submetidos a alto vácuo, acelerados através de um campo elétrico para o analisador de massas do MS e separados de acordo com sua razão m/z , (Figura 3), (PITT, 1998).

Figura 3 - Esquema da ionização realizada por ESI (STEEN; MANN, 2004)

Um grande número de compostos pode ser analisado por ESI-MS, o único requerimento da técnica é que a molécula seja suficientemente polar para receber as cargas. Isto inclui peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, sacarídeos e lipídeos polares (MANN; WILM, 1995; SIUZDAK, 1996; MANN, et al., 2001).

O ESI é tolerante a baixas concentrações de tampões, sais e detergentes; estes compostos interferem na análise causando supressão dos íons formados ou uma determinação ambígua das massas quando combinados com o analíto. As melhores respostas são obtidas quando a amostra é livre de sais e detergentes. A principal vantagem do ESI é a possibilidade de combiná-lo com técnicas de separação e purificação como a cromatografia líquida e a eletroforese capilar (YATES, 1998; ASHCROFT, 2002).

2.3.2.3 A evolução da espectrometria de massas

No início dos anos 90, ambas as técnicas de ionização branda associadas com o desenvolvimento de novos algoritmos computacionais, permitiram correlacionar dados obtidos de um espectro de massas de biomoléculas com seqüências existentes em bancos de dados. Este evento marcou a transformação da MS no estudo em larga escala de técnicas usadas na genômica funcional, era o início da era proteômica (MANN; WILM, 1995; MANN et al., 2001).

O sucesso dos métodos de ionização MALDI e ESI e o desenvolvimento de analisadores de massa em seqüência (*tandem*), levaram a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta obrigatória nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas. Os espectrômetros de massa atuais permitem selecionar uma só molécula ionizada, fragmentá-la (colisão com um gás inerte) e através da análise das massas dos fragmentos conhecer a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração química específica em algum resíduo de aminoácido (PIMENTA, 2003; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; STEEN; MANN, 2004).

Atualmente a ultra-sensibilidade e resolução dos espectrômetros de massas têm desempenhado um importante papel no estudo de biomoléculas, permitindo que mesmo aquelas presentes em baixíssimas concentrações possam ser analisadas e identificadas através do uso da MS associada a bancos de dados, com rapidez e robustez nas análises.

Diversos laboratórios têm adotado o uso do MALDI e do ESI em suas estratégias de identificação e sequenciamento de proteínas. Por usarem princípios de ionização diferentes e distintas limitações, o uso dos dois métodos tem levado a um maior número de moléculas identificadas, além de aumentar a rapidez e a confiabilidade das análises. Normalmente o MALDI-TOF-MS é usado primeiramente para determinar a massa da proteína e após a sua digestão com tripsina, seus peptídeos são separados, normalmente por cromatografia líquida acoplada diretamente no espectrômetro de massas (ESI-TOF-MS/MS) e seqüenciadas (GIORGIANNI, 2003).

Dentre os mais freqüentes usos da espectrometria de massas para a análise de biomoléculas podemos citar: estudo de proteínas recombinantes (WOLSCHIN et al., 2005); interações entre DNA e proteínas (OLIVEIRA; LINDBLAD, 2005); diagnóstico de doenças como o câncer (XIAO et al., 2005); estudos de interação planta patógenos (BELLES et al., 2005); projetos de proteômica (SMOLKA et al., 2003); estudo de interações de proteínas e modificações pós-tradução (SCHROEDER et al., 2005); análise de monômeros e dímeros, responsáveis pela formação da madeira (CHRISTIERNIN et al., 2005); identificação de isoformas (REP et al., 2002) e sequenciamento de proteínas e peptídeos responsáveis pela formação da madeira (GION et al., 2005; FERRY-DUMAZET et al., 2005).

2.3 Xilogênese

Em plantas o tecido vascular é composto por duas unidades básicas o xilema e o floema. O xilema transporta e armazena, nutrientes e hormônios, funcionando também como suporte mecânico ao corpo das plantas. O floema é responsável pela distribuição dos produtos derivados da fotossíntese, mRNA e proteínas envolvidas com o crescimento e desenvolvimento da planta. O tecido vascular pode ser formado de dois diferentes tecidos meristemáticos, o procâmbio e o câmbio vascular (YE, 2002).

Em árvores a divisão e diferenciação do câmbio vascular originam o xilema e o floema secundário. O processo responsável pela formação do xilema é chamado de xilogênese, formando o produto mais importante da atividade florestal, a

madeira. Através da atividade do câmbio ocorre uma constante renovação das células do xilema e floema, resultando em um aumento do diâmetro da árvore. As células do xilema, próximas ao câmbio, sempre se dividem mais que as células do floema, explicando a variação de tamanho que existe entre o tecido do floema e xilema (STRASBURGER, 1994; PLOMION et al., 2001; CHAFFEY et al., 2002).

As células do xilema podem se diferenciar formando os elementos traqueais, que conduzem água e solventes orgânicos e inorgânicos, as fibras com a função de sustentação e armazenamento e as células de parênquima relacionadas com atividades vitais variadas (Figura 4). Os elementos traqueais em angiospermas são os elementos de vaso, apresentam células curtas com perfurações em suas paredes terminais, formando uma coluna vazia chamada de vaso. Nas gimnospermas os elementos traqueais (traqueídes) possuem células alongadas, pontiagudas com perfurações pontuais somente nos pólos fundamentais (ESAU, 1981; FUKUDA, 1996).

A madeira é composta principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e proteínas (HIGUCHI, 1997; CARPITA; McCANN, 2001).

A celulose é o principal componente da madeira, correspondendo a 50% de sua constituição, formada pela polimerização de monossacarídeos de β -D-glicose. Os principais estudos envolvendo a celulose procuram encontrar os genes que codificam as subunidades catalíticas da celulose sintase e também conhecer a sua regulação e expressão (READ; BASIC, 2002; TAYLOR et al., 2003). O sequenciamento do genoma de *Arabidopsis* demonstrou que existem 10 genes para a celulose sintase (CESA), sendo que seis são conservados entre as monocotiledôneas e dicotiledôneas (DOBLIN et al., 2002). As evidências genéticas demonstram que nas células em crescimento três isoformas estão envolvidas com a síntese da parede celular primária (ELLIS et al., 2002) e as outras três com a deposição de celulose na parede secundária no xilema (TAYLOR et al., 2003; ROBERT et al., 2005). Os microtúbulos formados por α e β – tubulina determinam a posição e orientação das microfibrilas de celulose durante a formação da parede secundária em plantas (CHAFFEY, 2000).

Figura 4 – Tecidos que compõem a madeira. (A) Esquema demonstrando os diferentes tecidos que compõem a madeira. (B) Corte transversal do caule do álamo, p = floema, cz = zona cambial e x = xilema, (barra = 450 μ m). (C) Elementos traqueais do álamo (barra = 25 μ m). (D) Fibras do álamo (barra = 25 μ m) (CHAFFEY et al., 2002)

A lignina é o segundo principal componente da madeira, correspondendo entre 20 a 30% de sua constituição, formada pela polimerização de compostos fenólicos, caracterizados pela presença de grupos hidróxi-fenólicos parcialmente metilados. Os três monômeros (monolignol) que formam a lignina são: *p-coumaryl alcohol*, *coniferyl alcohol* e *sinapyl alcohol*. O conteúdo de lignina varia conforme a espécie, idade e tecido. Os principais estudos envolvendo a lignina procuram isolar

genes e conhecer a sua regulação durante a formação da madeira. Estudos com plantas transgênicas têm demonstrado que a alteração da expressão de genes relacionados com a rota metabólica da lignina pode alterar a sua composição e quantidade em árvores. A principal consequência da redução da quantidade e composição da lignina em árvores é a diminuição do uso de produtos químicos empregados durante o processo de sua extração na produção de papel e celulose, reduzindo custos e minimizando os impactos ambientais (BAUCHER et al., 2003). Trabalhos com plantas transgênicas de álamo com a superexpressão do gene *ferulate-5-hydroxylase (F5H)*, demonstraram redução na quantidade de lignina polimerizada na madeira, não ocorrendo perda de qualidade nas fibras (HUNTLEY et al., 2003). Árvores com baixa expressão da *cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)*, uma enzima que catalisa o último passo da biossíntese da lignina, necessitaram de menos produtos químicos para removê-la durante a produção de papel (PILATE et al., 2002). Árvores transgênicas de álamo para as duas construções (superexpressão do gene *F5H* e redução na expressão do *CAD*) apresentaram mais celulose e menor conteúdo de lignina. O trabalho demonstra o potencial de isolar genes e alterar vias metabólicas como as da lignina, melhorando a qualidade da madeira e reduzindo custos na produção de papel e celulose (LI et al., 2003).

As hemiceluloses ou polioses correspondem de 20 – 30% da constituição da madeira, formadas pela polimerização de diferentes monossacarídeos como: glicose, manose, galactose, arabinose e ácido glucurônico. A biossíntese, exportação e as modificações das hemiceluloses ocorrem no complexo de Golgi. As modificações são realizadas via reações com diferentes glicosiltransferases (BOLWELL, 1993; KEEGSTRA; RAIKHEL, 2001). No genoma de *Arabidopsis* foram encontrados 39 genes responsáveis pela codificação das glicosiltransferases pertencentes a uma família de 47 genes (LI et al., 2004; ZHONG et al., 2005).

As proteínas são os compostos menos abundantes na madeira. Embora diferentes proteínas estão presentes na parede celular durante o desenvolvimento, sua quantidade na madeira é pequena. Contudo elas desempenham um papel importante na composição e morfologia na parede das células do xilema (CASSAB, 1998). Em plantas a parede celular apresenta uma predominância de proteínas ricas em um ou

dois aminoácidos, contendo domínio de sequência altamente repetidos, podendo apresentar ou não glicosilação. Os quatro grupos predominantes são: proteínas ricas em prolina (PRPs), proteínas ricas em glicina (GRPs), proteínas arabinogalactan (AGPs) e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) também conhecidas como extensinas. Os quatro grupos exibem diferentes abundâncias na parede conforme o tipo de célula onde são encontrados. Acredita-se que esta variação deve-se a função específica que elas desempenham na célula. As proteínas destes grupos cruzam a parede da célula e provavelmente desempenham também um papel estrutural. As extensinas são as proteínas da parede celular mais estudadas, regulam a extensibilidade da parede celular e contribuem com a defesa da planta, protegendo-a contra o ataque de patógenos e ferimentos (SHOWALTER, 1993; CASSAB, 1998).

A xilogênese representa um ótimo modelo em estudos de diferenciação celular, principalmente por apresentar estádios bem definidos de desenvolvimento como: divisão celular, expansão celular, adensamento da parede (envolvendo a biossíntese e deposição de celulose, hemicelulose, ligninas e proteínas), morte celular programada e formação do alburno. O processo é controlado por uma ampla variedade de fatores tanto exógenos (fotoperíodo e temperatura) como endógenos (fitohormônios) e pela interação de ambos. Dirigido pela expressão coordenada de numerosos genes estruturais e regulatórios (muitos dos quais ainda não conhecidos) envolvidos nos diferentes estádios de formação do xilema. A mudança na expressão destes genes é responsável pela diferença observada entre os tecidos que compõem as árvores (LACHAUD et al., 1999; PLOMION et al., 2001; YE, 2002).

Apesar da importância econômica e ambiental que a madeira representa hoje e no futuro, como fonte natural e renovável de energia e fibras (papel e celulose), contribuindo com a redução do aquecimento global com a incorporação de CO₂, o conhecimento de seu desenvolvimento está distante de ser completo. Com poucas exceções, muito pouco é conhecido sobre os processos celulares, moleculares e bioquímicos responsáveis pelo seu desenvolvimento (PLOMION, 2001; CHAFFEY, 2002).

A xilogênese é freqüentemente estudada por métodos anatômicos e mais recentemente por técnicas bioquímicas, fisiológicas e moleculares. Estudos fisiológicos

têm demonstrado que hormônios como, auxinas e citocininas são fundamentais na diferenciação vascular (ALONI, 1987; SACHS, 1991). Várias proteínas e genes, envolvidos em diferentes estádios da formação dos elementos do xilema, da parede secundária e da morte celular foram caracterizados, através de técnicas bioquímicas e de hibridização (FUKUDA, 1997; YE, 2002).

A elucidação do processo da diferenciação é extremamente importante para compreendermos o controle genético da formação da madeira em árvores. Atualmente a integração de diferentes abordagens envolvendo a genômica, transcriptômica, proteômica e a bioinformática, associada ao uso de plantas modelo como a *Zinnia sp* e *Arabidopsis sp*, tem nos oferecido uma nova visão sobre os processos moleculares responsáveis pela formação e crescimento da madeira.

Em *Zinnia elegans* células isoladas do mesofilo de folhas jovens quando submetidas *in vitro* à presença de hormônios como auxinas e citocininas, podem ser induzidas a transdiferenciar-se, sem a ocorrência de divisão celular, formando elementos traqueais (ROBERTS; McCANN, 2000; YE, 2002). O sistema apresenta estádios bem definidos e altas taxas de transdiferenciação. Desta forma aspectos moleculares e bioquímicos relacionados com a diferenciação de um único tipo de célula formando os elementos traqueais podem ser monitorados. Vários genes associados com a formação dos elementos traqueais foram isolados e caracterizados usando este sistema. Este modelo é uma excelente fonte para monitorar a regulação de genes essenciais, envolvidos nos diferentes estádios da diferenciação dos elementos traqueais, incluindo a especificação celular, formação e adensamento da parede secundária (depósito de celulose, hemicelulose, proteínas e biossíntese de lignina) e morte celular programada (FUKUDA, 1997; GROOVER; JONES, 1999; MILIONI, et al., 2001; YE, 2002).

As plantas de *Arabidopsis thaliana* são amplamente usadas como um sistema modelo em estudos de genética de planta. Apresenta características favoráveis como: tamanho reduzido, rápido crescimento, facilidade de transformação genética, de regeneração *in vitro* e um genoma pequeno (125 Mpb). Estas características favoráveis fizeram com que ela fosse a primeira planta a ter o genoma seqüenciado (The

Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Quando submetida a condições apropriadas de desenvolvimento, sofre crescimento secundário no hipocótilo formando o xilema secundário. Ela é um excelente modelo genético para identificar e avaliar genes envolvidos na formação e regulação da madeira em árvores. Principalmente por existir uma grande homologia entre os seus genes e de outras espécies como as lenhosas (HERTZBERG et al., 2001; ROBERT et al., 2005). Segundo Carpita et al. (2001) 15% do genoma da *Arabidopsis* pode estar envolvido de algum modo com a biogênese, rearranjo e *turnover* da parede celular. Entre *Arabidopsis* e *Populus* genes relacionados com o desenvolvimento da parede celular secundária, como a *CESA*, apresentam 91% de similaridade (SAMUGA; JOSHI, 2002). O isolamento e estudo de mutações relacionados à síntese e deposição de celulose e lignina que afetam o desenvolvimento do sistema vascular em *Arabidopsis* têm esclarecido questões sobre as rotas metabólicas envolvidas na formação da parede celular e as enzimas responsáveis pelo processo, auxiliando no isolamento de genes estruturais e que regulam a xilogênese (TURNER et al., 2001; ROBERT et al., 2005; ZHONG et al., 2005).

O sequenciamento de um grande número de ESTs de tecidos como o câmbio, xilema e floema de diferentes espécies como *Pinus taeda* (ALLONA et al., 1998), *Populus sp.* (STERKY et al., 1998), *Zinnia elegans* (DEMURA et al., 2002), *Eucalyptus sp* (RANIK et al., 2004; PAUX et al., 2004) tem permitido a identificação e o isolamento de genes envolvidos direta ou indiretamente no processo da xilogênese. O sequenciamento de ESTs de *Eucalyptus* pelo projeto FOREST e GENOLYPTUS identificou 21 genes relacionados à formação da lignina, demonstrando o potencial do uso desta técnica na identificação de genes (POKE et al., 2005). A categorização de genes expressos nos tecidos vasculares por técnicas como “*microarray*” tem ajudado a elucidar o mecanismo de regulação e expressão de um grande número de genes simultaneamente envolvidos na formação da madeira (DEMURA et al., 2002).

Hertzberg et al., (2001) analisaram em álamo o mRNA de tecidos vasculares em diferentes estádios de desenvolvimento usando as técnicas de

“*microarray*” e demonstraram que mais de 211 genes são diferentemente expressos durante o desenvolvimento do xilema secundário.

O uso da proteômica tem possibilitado a separação, análise e identificação simultânea de várias proteínas presentes na madeira. Trabalhos de proteômica envolvendo a formação da madeira são recentes, o grupo do INRA-França liderados pelo Dr. Christophe Plomion foram os primeiros a usá-la. O grupo realizou a separação e caracterização de proteínas presentes nas folhas e no xilema de *Pinus pinaster*. As comparações entre os géis bidimensionais dos tecidos indicaram que entre as proteínas detectadas 29% são específicas para o xilema e 36% para a folha. A identificação de proteínas por espectrometria de massas demonstrou uma grande similaridade entre as proteínas de angiospermas e gimnospermas (COSTA et al., 1999).

Mijnsbrugge et al. (2000) analisaram a formação da madeira em *Populus trichocarpa* com a identificação e caracterização sazonal de proteínas em diferentes tecidos. A comparação entre os materiais foi realizada através da eletroforese bidimensional e a identificação pelo sequenciamento N-terminal. A avaliação das proteínas do xilema jovem, xilema adulto e casca, colhidos em quatro diferentes períodos do ano, demonstraram similaridade entre os diferentes tecidos e entre as diferentes épocas do ano, porém com uma variação em sua abundância. Os resultados demonstraram através da análise das proteínas o efeito do meio ambiente sobre a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento da madeira. Períodos como o verão onde a atividade metabólica é mais intensa, apresentaram uma abundância de proteínas nos materiais analisados.

Gion et al. (2005) realizaram a comparação entre as proteínas e o mRNA do xilema de *Pinus pinaster*. A comparação entre o número de ESTs e a quantidade de proteínas do xilema estimadas pelo volume, apresentou uma fraca correlação. Os resultados demonstram que a abundância e a atividade das proteínas é regulada através da transcrição, tradução, processamentos e modificações pós-tradução (IBARROLA et al., 2003). A simples quantificação do mRNA muitas vezes não reflete a abundância de uma proteína em um tecido, demonstrando a necessidade dos projetos proteoma no estudo da formação da madeira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Plantas de *Eucalyptus grandis* variedade M33 provenientes de sementes de meios-irmãos, cultivadas em São Miguel Arcanjo, Estado de São Paulo, foram fornecidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. As plantas foram mantidas em vasos plásticos com volume de 3,5 litros, com uma mistura de vermiculita média e substrato orgânico (Plantmax) na proporção de 1:1 e distribuídas em casa de vegetação provida de luz suplementar para perfazer um total de 16 horas de luz (fotoperíodo). Diariamente foram fertirrigadas com solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950).

Ao completar cinco meses, 60 plantas tiveram suas folhas, raízes e cascas removidas, seus caules foram cortados, (Figura 5), sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido, transportadas e mantidos em freezer a -80°C até sua utilização, na extração das proteínas.

Figura 5 – Material vegetal usado no experimento. (A) Plantas de *Eucalyptus grandis* com cinco meses (barra = 10 cm). (B) Caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses sem a casca e cortadas em segmentos, pronto para serem macerados (barra = 2 cm)

3.2 Extração das proteínas

Os caules de *Eucalyptus grandis* foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido. Na extração das proteínas foram avaliados três métodos: método de extração fenólica (HURKMAN; TANAKA, 1986), método de extração ácida (DAMERVAL et al, 1986) e método de extração ácida modificado (FRY, 1991).

3.2.1 Método de extração fenólica

No método de extração fenólica, em 15 mL de solução de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M KCl, 50 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% p/v PVPP, 2% v/v β -mercaptoetanol) pH 7,5 a 4°C, adicionou-se 2,5 g de material vegetal macerado em nitrogênio líquido. Depois de homogeneizada a amostra em “vortex” por 30 minutos, adicionou-se 15 mL de fenol saturado com Tris-HCl pH 7,5. Após centrifugação a 10000 g por 30 minutos a 4°C, coletou-se o sobrenadante que foi transferido para um novo tubo. Em seguida, adicionou-se 15 mL de solução de extração. Após repetir o procedimento acima por três vezes. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo, a esse acrescentou-se cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol. A solução foi mantida por 12 horas a –20°C e em seguida centrifugada a 10000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante, lavado com acetona (80% v/v). Após centrifugação a 16000 g por 30 minutos, o pellet foi submetido a secagem em dissecador a –4°C por 24 horas. As proteínas foram então, ressuspendidas em tampão de solubilização (7 M Uréia, 2 M Tiuréia, 10 mM DTT, 0,4% v/v Triton X-100, 4% p/v Chaps).

3.2.2 Método de extração ácida

No método de extração ácida, em 15 mL de tampão com 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) e 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol em acetona a –20°C, adicionou-se 2,5 g do material vegetal macerado. A amostra foi homogeneizada em “vortex” por 5 minutos e mantida por 1 hora a –20°C e em seguida centrifugada a 16000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com acetona contendo 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol a –20°C. Após 1 hora a –20°C o material foi centrifugado a 16000 g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido duas vezes. O pellet resultante foi submetido à secagem em dissecador a –4°C por 24 horas. As proteínas do pellet foram ressuspendidas em um tampão de solubilização (7 M Uréia, 2 M Tiuréia, 10 mM DTT, 0,4% v/v Triton X-100,

4% p/v Chaps) na proporção de 20 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ de amostra. O material foi homogeneizado em “vortex” por 1 minuto e centrifugados por 2 minutos a 1000 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o processo foi repetido por três vezes, até obter-se uma amostra sem precipitado.

3.2.3 Método de extração ácida modificado

No método de extração ácida modificado foi avaliado o efeito da adição de dois diferentes sais (CaCl_2 e KCl) na solubilização das proteínas do caule. Em tubos com 0,5 g de material vegetal macerado foi adicionado 2 mL das soluções CaCl_2 (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M e 1 M) e KCl (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M e 2 M) a uma temperatura de 4°C. Após cinco minutos foi adicionado 25 mL de tampão com 10% (p/v) TCA e 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol em acetona a -20°C. A amostra foi homogeneizada em “vortex” por 5 min e mantida por 1 hora a -20°C e em seguida centrifugada à 16000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com acetona contendo 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol a -20°C. Após 1 hora a -20°C o material foi centrifugado a 16000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O processo de lavagem foi repetido duas vezes. O pellet resultante foi submetido a secagem em dissecador a -4°C por 24 horas. As proteínas do pellet foram ressuspensas em um tampão de solubilização (7 M Uréia, 2 M Tiuréia, 10 mM DTT, 0,4% v/v Triton X-100, 4% p/v Chaps) na proporção de 20 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ de amostra. O material foi homogeneizado em “vortex” por 1 minuto e centrifugados por 2 min a 1000 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o processo repetido por três vezes, até obter uma amostra sem precipitado. Os tratamentos foram realizados com quatro repetições. A avaliação dos tratamentos foi realizada pela quantificação das proteínas pelo método de Bradford e analisados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Remoção dos ácidos nucléicos da amostra

O produto Polyethyleneimine (PEI) é um polímero com capacidade de ligar-se a moléculas de DNA e lipídios, precipitando-as. Por apresentar esta característica ele pode ser usado na purificação de extratos protéicos que apresentam contaminação com DNA. Em altas concentrações podem precipitar também moléculas de proteínas. A quantidade de Polyethyleneimine necessária para eliminar os ácidos nucléicos presentes na amostra, extraída pelo método da extração ácida modificada, foi determinada através da adição de diferentes concentrações do produto. Em tubos com 1 mL de extrato proteínas foram aplicadas diferentes quantidades de PEI ficando com uma concentração final de (0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, 0.3%, 0.4%, 0.5% v/v) do produto. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo descartando o pellet. A visualização da presença ou ausência dos ácidos nucléicos foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio. A quantificação das proteínas foi determinada pelo método de Bradford, com três repetições por tratamento e analisados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se um kit comercial de quantificação de proteínas da BioRad (Protein Assay catalago: 500-0006). Alíquotas de 1 a 15 µL da amostra, juntamente com 3,5 mL do corante diluído (3:1), foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, tendo suas absorbâncias determinadas a 595 nm em um espectrofotômetro. As concentrações das proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva-padrão de proteínas de albumina de soro bovina como padrão.

3.5 Eletroforese bidimensional

3.5.1 Focalização isoeletrica (1º dimensão)

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), através do processo de focalização isoeletrica (IEF), usando o sistema IPGphor Strip Holder (Immobilized pH Gradient strips – Amersham Biosciences). A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH de 3-10. As amostras de proteínas usadas no sequenciamento foram separadas utilizando-se fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4-7.

As fitas IPG foram reidratadas durante 12 horas a 20°C no aparato de focalização isoeletrica com 400 µL de amostra, contendo aproximadamente 700 µg de proteína dissolvida em tampão (7 M Uréia, 2 M Tiuréia, 10 mM DTT, 0,4% v/v Triton X-100, 4% p/v Chaps, 0,5% v/v Anfólitos e 0,005% p/v azul de bromofenol). Sobre as fitas IPG acrescentou-se 1,5 mL de óleo mineral (Fluid Cover, Amersham Pharmacia Biosciences) para evitar a evaporação dos reagentes durante a reidratação.

A focalização isoeletrica foi realizada nas seguintes condições: 200 V por 1 hora, 500 V por 1 hora, 1000 V por 1 hora e 5000 V até atingir 70000 V-h. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparato de focalização isoeletrica, lavadas com água destilada e armazenadas a -80°C.

3.5.2 SDS-PAGE (2º dimensão)

Após a focalização isoeletrica, as fitas IPG foram lavadas duas vezes com água destilada, mantidas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS, e 2% p/v DTT). Transferidas e mantidas por 15 minutos em solução de alquilação (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 2,5% p/v iodoacetamida e de 0,005% p/v de azul de bromofenol).

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em um gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida (180 x 160 x 1,5 mm), conforme LAEMMLI (1970).

O gel foi preparado com 12,5% Acrilamida/Bis (30/08), 0,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,5% (v/v) persulfato de amônio e 0,075% (v/v) TEMED. Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas as fitas foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1% p/v SDS). A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 10°C, em uma cuba modelo PROTEAN II XI 2-D Cell (BioRad). No primeiro estágio utilizou-se uma corrente fixa de 90 V por 30 minutos e no segundo estágio, utilizou-se uma corrente fixa de 30 mA por gel durante aproximadamente 5 horas. Após a eletroforese, os géis foram lavados em água destilada por 5 minutos e corados com solução de coloração coomassie G250.

3.6 Detecção das proteínas

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração por Coomassie Brilliant Blue G250, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (2004), modificado. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram submetidos por 60 min a uma solução fixadora (40% v/v etanol, 10% v/v ácido acético); lavados duas vezes com água destilada deionizada por 10 minutos e mantidos por 12 horas em solução de coloração (0,1% p/v Coomassie Brilliant Blue G250, 10% v/v ácido ortho-fosfórico, 10% p/v sulfato de amônio, 20% v/v metanol). Depois de corados os géis foram lavados com 1% (v/v) ácido acético até a eliminação completa do corante excedente.

3.7 Obtenção e análise das imagens

As imagens das proteínas separadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e coradas com coomassie blue G250 foram obtidas por meio de um “scanner”. As análises dos géis foram realizadas pelo programa Image Master 2D versão 3.10 (Amersham Pharmacia Biosciences). A detecção dos *spots* e a determinação de seu volume foi realizada de modo automático adotando os seguintes

parâmetros: smooth = 2, área mínima = 21 e saliência = 200. As correções foram realizadas com a adição e remoção manual dos *spots*. As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular ("Brod Range"- Molecular Weight Marker, Bio-Rad).

3.8 Digestão das proteínas

A região do gel, contendo as proteínas (*spot*) foi extraída, com um bisturi, cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , colocadas em tubos eppendorf e armazenados na temperatura de 4°C .

Diferentes concentrações (5, 10, 20 e $40\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) da proteína BSA (soro albumina bovina) foram utilizadas como controle positivo para verificar a eficiência do método de digestão e eluição dos peptídeos. Quantidades (0,15, 0,3, 0,6 e $1,2\text{ }\mu\text{g}$) de BSA foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), coradas conforme descrito no item (3.6), digeridas e ressuspensas em $30\text{ }\mu\text{L}$ de tampão (1% v/v ácido fosfórico e 5% v/v acetonitrila). Posteriormente diferentes tempos (6, 9, 12 e 18 horas) de digestão em gel de poliacrilamida foram avaliados, usando $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de BSA.

A digestão das proteínas em gel foi realizada conforme Parker et al., (1998) com modificações, descrita abaixo:

Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo as proteínas foram lavados em água deionizada, descorados por três vezes na solução contendo 50% v/v de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min, desidratados duas vezes em 100% ACN por 10 min. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel foi deixado para evaporar à temperatura ambiente.

Redução e alquilação: Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 60°C por 40 minutos e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em 25 mM

AMBIC e posteriormente desidratados em 100% de acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas: Os fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram então reidratados com 15 μ L de solução contendo 150 ng de tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37°C por 12 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 μ L de solução bloqueadora (50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com três lavagens de 15 minutos com solução de eluição (60% v/v metanol e 1% v/v ácido fórmico) a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi o ULTRA-SOM (Thornton-INPEC Eletrônica LTDA) modelo G/T, tipo T7, com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em um concentrador (Eppendorf) à temperatura ambiente, por 2-3 horas. Os peptídeos foram ressuspensos em 1% (v/v) ácido fórmico e seqüenciados por espectrometria de massas.

3.9 Sequenciamento das proteínas

As proteínas foram seqüenciadas em espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*) da Waters-Micromass acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapIC (Waters®).

A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pre-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 μ m 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H₂O, 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H₂O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida o fluxo usado foi de 5 μ L.min⁻¹ nos primeiros 15 min, 2

$\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ entre 15 min e 40 min e de $5 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ entre 40 min e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 min, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 min, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 min, 45% (v/v) a 80% (v/v) em 5 min, mantido por 5 min em 80% (v/v) e os últimos 5 minutos em 10% (v/v).

A ionização das moléculas por electrospray foi realizada com uma voltagem fixa de 3000 V, temperatura de 90°C sob 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 25 *counts*, dentro de uma amplitude de 50 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo.

3.10 Análise das informações

Os espectros de massas das amostras foram analisados e processados, conforme os parâmetros demonstrados nas figuras 6, 7 e 8 usando os programas MassLynx NT BioLynx V 4.0 e ProteinLynx V 2.1 da Micromass e submetidas para sua identificação a dois bancos de dados SWISS-PROT (BAIROCH et al., 2005) e GENOLYPTUS (<http://www.genolyptus.ucb.br>), através do programa Blast (ALTSCHUL et al., 1997).

SWISS-PROT é um banco de anotações de seqüências de proteínas, criado em 1986 pelo Departamento de Bioquímica Médica da Universidade de Genebra e EMBL. Atualmente são mantidos pelo Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e EBI/EMBL. Este banco mantém um alto nível de anotações, como a descrição e a função da proteína, estrutura dos seus domínios, modificações pós-tradução, além de ter uma estrutura que facilita o acesso computacional a diferentes campos de informações (BAIROCH et al., 2005).

GENOLYPTUS é um banco de dados de ESTs criado pelo projeto Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*, iniciada em 2002 através de uma parceria de 12 empresas e dez centros de pesquisa. Sob a coordenação geral do Dr.

Dario Grattapaglia (CENARGEN/EMBRAPA e Universidade Católica de Brasília). Formado por 135,000 ESTs de 14 diferentes bibliotecas derivadas de diferentes tecidos e espécies de *Eucalyptus*. Os quais incluem: folhas maduras, folhas jovens, folhas infectadas por Puccinia, plântulas, plântulas submetidas a estresse, xilema e flores de *E. grandis*; xilema de *E. globulus*; xilema de *E. pellita*; xilema de *E. urophylla*; combinação do floema, xilema e raiz de várias espécies.

Figura 6 – Parâmetros de processamento usados pelo programa ProteinLynx V 2.1 na interpretação dos espectros de massa

Figura 7 – Parâmetros usados pelo ProteinLynx V 2.1 na identificação das proteínas pelo SWISS-PROT

Figura 8 – Parâmetros usados pelo ProteinLynx V 2.1 na identificação das proteínas pelo GENOLYPTUS

3.11 Relação entre proteínas e nível de transcritos

A comparação entre as proteínas identificadas por MS e os transcritos de mRNA foi realizada a partir do volume relativo médio dos *spots* de três géis de pH 4-7 analisados pelo programa Image Master 2D e o número de tags de um banco SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) construído a partir do mesmo tecido vegetal. O banco foi construído no mesmo laboratório pelo grupo SAGE.

A análise serial da expressão gênica SAGE foi introduzida como um método de análise da expressão gênica capaz de quantificar o nível de expressão de milhares de transcritos simultaneamente sem que haja a necessidade de conhecimento prévio dos genes em questão. A técnica é sensível até mesmo a seqüências de baixa abundância (2 cópias) (VELCULESCU et al., 1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação dos protocolos de extração de proteínas

Existem vários protocolos de extração de proteínas de plantas publicados e quase sempre estes são adaptados conforme o tecido analisado, a espécie e a proteína de interesse. As recomendações são que o método tenha como princípio básico: ser o mais simples possível, com reprodutibilidade e as modificações durante o preparo da amostra devem ser minimizadas, pois pode resultar em artefatos no gel bidimensional (DUNN, 1993; GÖRG et al., 2004).

Segundo Alfenas et al., (1998) um dos problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a maceração do tecido. Tais fenóis, quando descompartimentalizados, são prontamente oxidados a quinonas por enzimas da própria planta (polifenoloxidasas e peroxidases). Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas, o que resulta em artefatos no gel. Os métodos de extração devem ser desenvolvidos de modo a separar especificamente fenóis de proteínas e, simultaneamente prevenir a oxidação dos compostos fenólicos.

Com o objetivo de encontrar um método eficiente e reproduzível de extração de proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* foram avaliados três diferentes métodos de extração: ácida, ácida modificada e fenólica.

Entre os métodos de extração de proteínas, o método de extração ácida apresentou baixo rendimento na quantidade de proteínas extraídas do caule de *Eucalyptus grandis*. Para melhorar o rendimento foi analisado o efeito de 2 diferentes sais (CaCl_2 e KCl) em diferentes concentrações. Conforme Fry (1991), a adição de sais durante a extração de proteínas altera a valência de suas ligações à parede celular tornando-as livre. A concentração e o sal requerido é variável e dependente do material analisado. Na Figura 9, observa-se que a adição de sais promoveu um aumento de 46,45% na concentração das proteínas do caule quando foi adicionado 1 M CaCl_2 . Entre as diferentes concentrações de cloreto de cálcio não foram observadas diferenças

estatísticas significativas, conforme o teste de Tukey 5%. Estes resultados indicam que a adição de baixas concentrações de cloreto de cálcio é suficiente na extração de proteínas do caule. Entre as diferentes concentrações de cloreto de potássio os melhores resultados foram alcançados com as maiores concentrações. Concentrações de 0,25 M de KCl demonstraram uma melhor recuperação de proteínas quando comparado com a amostra onde não foi adicionado sal, porém, concentrações maiores de cloreto de potássio promoveram melhores resultados que concentrações menores. Os dois sais mostraram-se eficientes na extração de proteínas do caule de *Eucalyptus grandis*, não sendo observada diferença significativa entre 2 M de cloreto de potássio e entre os diferentes tratamentos de cloreto de cálcio.

Figura 9 – Efeito do tratamento com sais na extração de proteínas do caule de *Eucalyptus grandis*, com cinco meses. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey. As barras verticais indicam o desvio padrão da média

Os ácidos nucleicos devem ser removidos da amostra, pois podem interagir com as proteínas e os anfólitos comprometendo a focalização isoeletrica, além de promover o aparecimento de manchas nos géis bidimensionais. Os ácidos nucleicos aumentam a viscosidade da solução e podem obstruir os poros da poliacrilamida, interferindo e comprometendo a migração das proteínas durante a eletroforese. Mesmo em baixas concentrações devem ser removidos (GÖRG et al., 2004).

Os ácidos nucleicos podem ser eliminados através de tratamentos envolvendo a adição de enzimas como a DNAase ou RNAase ou por centrifugação com a adição de poliamina (RABILLOUD, 1999). Entre as poliaminas a polyethyleneimine é um polímero com capacidade de ligar-se às moléculas de DNA e lipídios, precipitando-as. Por apresentar esta característica ele pode ser usado na purificação de extratos protéicos que apresentam contaminação com DNA. Em altas concentrações podem precipitar também moléculas de proteínas, por isso a concentração deste produto deve ser avaliada antes de seu uso (KIRK; COWAN, 1995).

Com base nestas observações, avaliou-se o efeito da adição de diferentes concentrações (0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,4%, 0,5% v/v) de Polyethyleneimine na precipitação de DNA em extrato de proteínas proveniente da extração ácida com modificações. Em gel de agarose corado com brometo de etídio (Figura 10), observou-se que a amostra sem tratamento apresentou a presença de ácidos nucleicos, contudo a adição de 0,025% (v/v) de PEI foi suficiente para eliminá-los do extrato. Através da quantificação das proteínas pelo método de Bradford (Figura 11) foi constatado que a adição 0,025 a 0,20% (v/v) de PEI, não promoveu a perda por precipitação das proteínas no extrato, quando comparado ao extrato não tratado. Concentrações acima de 0,2% (v/v) devem ser evitadas por promoverem perdas significativas das proteínas no extrato.

Figura 10 – Efeito da Polyethyleneimine na precipitação de DNA no extrato de proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses, extraídas pelo método de extração ácida modificada. Gel de agarose corado com brometo de etídio

Figura 11 – Efeito da Polyethyleneimine na precipitação de proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

Os dois métodos de extração, ácida modificada e a fenólica apresentaram um rendimento similar quanto à quantidade de proteínas extraídas do caule de *Eucalyptus grandis* com 5 meses. A quantificação foi realizada pelo método de Bradford, com um rendimento de aproximadamente 300 µg de proteína por grama de tecido vegetal. Porém quando se realizou uma comparação entre os dois métodos através da eletroforese bidimensional usando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH de 3-10, demonstrado na Figura 12, foi observado que a extração fenólica apresentou os melhores resultados.

A extração fenólica apresentou uma melhor resolução e repetibilidade nos resultados quando comparada com a extração ácida modificada, possivelmente por remover os componentes não protéicos que interferem na focalização isoelétrica. Na extração fenólica não é necessário realizar tratamentos adicionais para eliminar os ácidos nucleicos do extrato, pois durante a extração estes são separados, ficando retidos na fase aquosa a qual é descartada, enquanto que as proteínas ficam na fase com fenol. No processo também são eliminados fenóis, polissacarídeos e sais. Um outro aspecto positivo da técnica é o fato da proteólise ser minimizada na presença do fenol (HURKMAN; TANAKA, 1986).

Por apresentar uma melhor resolução e repetibilidade durante a etapa da eletroforese bidimensional foi adotada a extração fenólica na extração das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* usadas durante o sequenciamento por espectrometria de massas.

Figura 12 – Avaliação dos métodos de extração por eletroforese bidimensional das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses. Em (A) foi realizada extração fenólica e na (B) extração ácida modificada. A focalização isoeletrica foi realizada em um gradiente de pH linear de 3-10. Coloração com coomassie brilhante blue G250

4.2 Avaliação da separação das proteínas por eletroforese bidimensional

A separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com 5 meses por eletroforese bidimensional usando um gradiente de pH de 3-10 (Figura 13) demonstrou que ocorre um predomínio de proteínas com pI entre 4-7 e massa molecular entre 14,4 – 97,4 kDa. Testes preliminares de sequenciamento de proteínas por espectrometria de massas separadas com fitas de pH de 3-10 apresentaram baixa eficiência de identificação, com predomínio de mais de uma proteína por *spot*. A baixa eficiência da identificação por MS e o predomínio de mais de proteína por *spot*, possivelmente está relacionada à baixa resolução encontrada com o uso de fitas IPG com um gradiente de 3–10.

A separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* usando fitas IPG com gradiente de 4-7 apresentou uma maior resolução que as fitas de 3-10, possivelmente devido à própria característica do material estudado, o qual apresenta um predomínio de proteínas com pI entre 4 a 7. A comparação entre as duas diferentes

faixas de pH pode ser observada na Figura 14. Resultados preliminares demonstraram que a taxa de identificação por MS foi maior usando fitas com gradiente de 4-7.

Figura 13 – Separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com 5 meses por eletroforese bidimensional. Focalização isoeétrica realizada em gradiente de pH linear de 3 -10. Coloração com coomassie brilhante blue G250

Figura 14 – Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses, em diferentes faixas de pH. Em (A) foi usado um gradiente de pH linear de 3-10 e em (B) gradiente de pH linear de 4-7. Coloração com coomassie brilhante blue G250

A análise dos géis bidimensionais com pH 4-7 (Figura 15) através do programa ImageMaster 2D Platinum demonstrou reprodutibilidade nos resultados. Após a detecção automática, foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*. Através do programa foram detectados 438 *spots* comuns nos três géis. Entre os diferentes *spots* foi encontrada uma grande variação de volume, com o mais intenso apresentando um volume de 4,0838% e o menos intenso 0,0153%. O volume dos *spots* foi determinado através do volume médio de *spots* de três géis, pelo programa Image Master 2D. Uma alternativa para melhorar os resultados seria a realização de um pré-fracionamento previamente à separação por eletroforese bidimensional, reduzindo a complexidade da mistura de proteínas, podendo com isso isolar grupos específicos e aumentar a sua concentração. Entre as diferentes técnicas de pré-fracionamento que poderiam ser adotadas estão a cromatografia líquida e ou uso de tampões com diferentes solubilidades durante a etapa da extração das proteínas (GIORGIANNI, 2003).

Uma das limitações no número de spots detectados no gel é a técnica adotada no momento da revelação das proteínas. A técnica deve ter reprodutibilidade e alta sensibilidade, permitindo a visualização de um maior número possível de proteínas

e ao mesmo tempo ser compatível com o método de identificação usado, como a espectrometria de massas (CANDIANO et al., 2004; GÖRG et al., 2004).

O uso do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* demonstrou repetibilidade e compatibilidade com a espectrometria de massas. Segundo Candiano et al., (2004), o método apresenta uma sensibilidade que permite detectar proteínas com concentrações de até 1ng. Testes preliminares, com detecção por prata não apresentaram bons resultados (dados não demonstrados), apesar de ser mais sensível que o coomassie G-250, não apresentou repetibilidade e compatibilidade com o MS.

Figura 15 – Separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses por eletroforese bidimensional. Focalização isoeétrica realizada em gradiente de pH linear de 4 - 7. Coloração com coomassie brilhante blue G250

4.3 Avaliação da metodologia de digestão

As metodologias de digestão e eluição das proteínas adotadas neste estudo foram primeiramente avaliadas usando uma proteína comercial conhecida. A proteína BSA (albumina soro bovina) foi submetida ao gel de poliacrilamida (12,5%) e corada com coomassie blue G250. A metodologia adotada na digestão e eluição demonstrou ser eficiente, foi possível identificar a proteína por espectrometria de massas com uma probabilidade de 99,99%, até a concentração de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de BSA. Testes preliminares usando concentrações de $2,5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de BSA não apresentaram resultados favoráveis à identificação obtendo-se baixas probabilidades (resultados não apresentados). Os resultados da Tabela 1 mostram que quanto maior a concentração da proteína, maior foi o número de peptídeos encontrados, aumentando a confiabilidade dos resultados e a cobertura da proteína de interesse. Estes resultados demonstram a necessidade de ter uma quantidade mínima de proteína no gel para obter uma boa identificação por espectrometria de massas.

Tabela 1 – Avaliação da metodologia de digestão com proteínas de BSA em gel de poliacrilamida (12%), coradas com coomassie blue G250

Concentração de BSA $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$	Probabilidade %	Peptídeos identificados	Cobertura da proteína %
5	99.99	2	2.627
10	100	5	8.237
20	99.99	8	13.015
40	100	16	21.746

Quanto aos diferentes tempos de digestão (Tabela 2) não foi observada uma grande variação do número de peptídeos de BSA identificados e seqüenciados por MS/MS. Entre nove e doze horas de digestão o número de peptídeos identificados foi o mesmo com uma pequena variação na cobertura da molécula. Porém a massa do erro foi 52,36 % menor com 12 horas de digestão, demonstrando uma maior confiabilidade

nos dados. Com 18 horas de digestão ocorre a presença de peptídeos derivados da autólise da tripsina reduzindo o número de peptídeos identificados da proteína de interesse.

Tabela 2 – Avaliação do tempo de digestão com $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de BSA submetida a gel de poliacrilamida (12%), coradas com coomassie blue G250

Tempo de Digestão (h)	Probabilidade %	Peptídeos identificados	Cobertura da proteína %	Massa do erro
6	99.99	8	12.685	6.02
9	99.99	9	14.827	10.878
12	100	9	15.321	5.696
18	99.99	7	11.862	10.756

4.4 Proteínas de *Eucalyptus grandis* identificadas

Entre os 438 *spots* detectados no gel bidimensional de gradiente de pH 4-7, 168 *spots* (38,35%) foram submetidos ao sequenciamento por LC MS/MS e analisados em duas bases de dados: SWISS-PROT e GENOLYPTUS. Os *spots* escolhidos para realizar o sequenciamento foram aqueles que apresentaram repetibilidade entre os três géis e maior intensidade. O sucesso de identificação foi de 72,02% correspondendo a 121 *spots*. Nos identificados 85,12% (103 *spots*) apresentaram homologia em ambas as bases de dados, 13,22% (16 *spots*) somente com o SWISS-PROT e 3,33% (4 *spots*) com o GENOLYPTUS. Entre os não identificados 20,83% (35 *spots*) não apresentaram homologia com nenhuma base de dados, enquanto que 7,14% (12 *spots*) não produziram espectros de massa onde fosse possível obter seqüências de peptídeos necessários na identificação. Os 168 *spots* analisados são indicados na Figura 16 e os resultados obtidos estão na Tabela 3.

Entre as proteínas identificadas, um grande número apresentou homologia com seqüências de espécies bem divergentes como *Arabidopsis thaliana* e *Solanum*

tuberosum. A homologia indica que estas proteínas são altamente conservadas entre espécies lenhosas e não lenhosas. Um outro aspecto é que estas espécies apresentam um grande número de seqüências de proteínas e genes disponíveis em bancos de dados internacionais como o NCBI e SWISS-PROT.

Poucas proteínas demonstraram homologia com o *Eucalyptus sp.* uma justificativa para esta observação é o reduzido número de proteínas e genes deste gênero depositados em bancos como o SWISS-PROT. Entre as seqüências de *Eucalyptus sp.* depositadas em bancos de dados internacionais ocorre uma predominância de seqüências envolvidas em processos relacionados ao desenvolvimento. Proteínas envolvidas com o metabolismo da lignina como a *Caffeic acid 3 O methyltransferase* e a *Cinnamyl alcohol dehydrogenase* apresentaram homologia com o *Eucalyptus sp.* Elas são bastante estudadas devido a sua importância econômica, principalmente para o setor de celulose e papel, pois estão envolvidas com a formação de um dos principais compostos da madeira, as ligninas.

Entre as proteínas identificadas, vinte e duas foram representadas por mais de um *spot*. Normalmente os spots relativos à mesma proteína ficaram próximos, por exemplo, na Figura 16 podemos observar este padrão de distribuição. As proteínas que apresentaram mais de um *spot* estão indicadas na Tabela 4.

A presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína no gel pode indicar a presença de modificações pós-traducional, ocorrência de variações alélicas de uma mesma proteína, variação isoenzimática e eventos provenientes do splicing alternativo. A ocorrência de degradação e modificações durante as etapas de preparo e isolamento da amostra ou diferentes etapas de processamento de uma proteína também podem promover a presença de múltiplos spots.

A ocorrência de múltiplos *spots* de uma mesma proteína do caule já foram relatados em trabalhos envolvendo diferentes lenhosas como *Pinus pinaster* e *Populus trichocarpa* (COSTA et al., 1999; MIJNSBRUGGE et al., 2000; GION et al., 2005).

Figura 16 – Separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses por eletroforese bidimensional. A focalização isoelétrica realizada em gradiente de pH linear de 4-7. Coloração com coomassie brilhante blue G250. Os círculos indicam os 438 *spots* detectados. Os círculos verdes indicam os *spots* identificados, laranja não apresentaram homologia e amarelo não apresentaram resultado

Figura 17 – Separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses por eletroforese bidimensional. A focalização isoeétrica realizada em gradiente de pH linear de 4-7. Coloração com coomassie brilhante blue G250. Os números indicam os spots removidos para análise

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continua)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
1 Metabolismo Primário										
1.1 Metabolismo dos aminoácidos										
16	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P31155	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	100	4,08	25636 8,30	42656 5,80	(R)VHTILIITQPDETVTNDEIAADLK(E) (K)TIFHLNPSGR(F) (R)FVIGGPHGDAGLTGR(K) (K)SIVASGLKV(R)	
17	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P31155	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	100	1,836	15748 9,80	43840 5,73	(K)IIIDTYGGWGARGGGAQSGK(D) (K)SIVASGLKV(R) (K)SIVASGLVK(R) (R)TDPDFTWEVVKPLK(W)	Methyl N-TERM
18	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P49613	<i>Pisum sativum</i>	SP/GL	99,99	0,458	40950 5,286	43941 6,10	(K)TNMVMVFGEITTK(A) (K)VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK(R) (R)VHTVLISTQHDETVTNDEIAADLK(E) (K)EHVIKPIPEK(Y) (K)TIFHLNPSGR(F) (K)IIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPTK(V)	
85	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P31155	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	73	0.702	25636 8,302	41662 5,88	(R)FVIGGPHGDAGLTGR(K) (K)SIVASGLAR(R) (K)TIFHLNPSGR(F)	
127	<i>Adenosylhomocysteinase</i> EC 3.3.1.1	P50246	<i>Medicago sativa</i>	SP/GL	100	0.071	53116 5,922	52984 5,89	(R)TEFGPSQPFK(G) (R)DSAAVFAWK(G) (R)ATDVMIAKG(V) (K)SGIIVLAEGR(L)	
59	<i>5 methyltetrahydropteroyltri glutamate homocystein</i> EC 2.1.1.14	Q42699	<i>Catharanthus roseus</i>	SP/GL	99,99	0.249	84803 6,43	65067 4,70	(K)YLFAGVVDGR(N) (K)SWLAFAAQK(V) (K)VVEVNALAK(A) (K)AGINVIQIDEAALR(E) (K)TLVAGIVDGRNIWR(T)	
112	<i>D 3 phosphoglycerate dehydrogenase chloroplast pr</i> EC 1.1.1.95	O04130	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP	99,99	0.1824	66412 6,04	61458 5,71	(R)GGVIDEDALVR(A)	
1.2 Metabolismo do nitrogênio										
42	<i>Glutamine synthetase nodule isozyme</i> EC 6.3.1.2	O04867	<i>Alnus glutinosa</i>	SP/GL	100	0.3186	39299 6,888	38257 5,50	(R)YLLER(I) (R)NKGGEIHK(K)	Deamidation N (1)
100	<i>Glutamine synthetase nodule isozyme</i> EC 6.3.1.3	P14636	<i>Lupinus angustifolius</i>	SP/GL	99,64	0.1886	34440 5,79	40455 5,73	(R)YILER(I) (R)HETADINTFLWGVANR(G)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
25	Glutamate dehydrogenase EC 1.4.1.3	P93541	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP/GL	99,99	0.1808	44785 7.12	43146 7,32	(R)LLGLTSK(L) (K)GAHANIPYGGAK(G) (K)TAVANIIFGGAK(G) (R)GVLFATEALLNEYGK(S) (K)VVAVSDITGAIK(N) (R)MGFTVGVKR(V)	Methyl C-TERM
101	Glutamate dehydrogenase EC 1.4.1.3	P93541	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP	100	0.2829	44813 6.68	60484 5,65	(R)GVLFATEALLNEYGK(S) (K)VVAVSDITGAIK(N)	
110	Glutamate ammonia ligase adenyltransferase EC 2.7.7.42	P30870	<i>Escherichia coli</i>	SP	99,99	0.1255	108350 5.128	99026 5,34	(R)VSFLFLR(R)	
28	1.3 Metabolismo dos nucleotídeos UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase EC 2.7.7.9	P19595	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	99,99	0.3849	51710 5.899	52503 6,10	(-)ATATTLSPADAAK(L) (K)YANSNIDIHTFNQIQHPR(L) (K)LDALLSKGK(E) (K)GGTLISYVSK(V) (R)LVEAKALK(M) (K)FEIIPNPK(E) (K)VLLKETAAGAAIK(F) (K)VLQLKTAAGAAIK(F) (K)SIPSIILDSLK(V) (K)LEIPDRAVIATK(D)	Dehydration ST (2) Deamidation Q (3) Carbamyl N-TERM Methyl N-TERM
29	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase EC 2.7.7.9	O64459	<i>Pyrus pyrifolia</i>	SP/GL	100	0.1838	51813 6.309	53106 5,74	(K)NGFINLVSR(Y) (R)LVVEDFSRLPDK(G) (R)FFNVAIGINVPR(S) (K)SIPSILELVCLK(V)	Hydroxyl DKNP (3)
41	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase EC 2.7.7.9	O64459	<i>Pyrus pyrifolia</i>	SP/GL	100	0.0773	51813 6,309	50160 6,09	(K)NGFINLVSR(Y) (R)LVVEDFSRLPDK(G) (R)FFNVAIGINVPR(S) (K)SIPSILELVCLK(V)	Hydroxyl DKNP (3)
4	1.4 Metabolismo dos carboidratos Triosephosphate isomerase cytosolic EC 5.3.1.1	P21820	<i>Coptis japonica</i>	SP/GL	84,68	0.1614	27073 5.68	26492 6,70	(K)TAYALAQGLK(V) (K)TAYALKSGLK(V) (K)VIACVGETLEQR(E)	Hydroxyl DKNP (10) Carbamidomethyl C (4) Carbamidomethyl C (4)
5	Triosephosphate isomerase cytosolic EC 5.3.1.1	P48491	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	99,99	0.3190	27152 5,468	27652 7,42	(K)FFVGDNKK(C) (K)VIACVGETLEKR(E) (K)NVSADVAATTR(I)	Carbamidomethyl C (4) Myristoyl N-TERM

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)										
Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
67	Triosephosphate isomerase cytosolic EC 5.3.1.1	P21820	<i>Coptis japonica</i>	SP/GL	100	0.2252	27073 5.676	27035 5,71	(K)TAYALSQGLK(V) (R)EAGATIEVVAAQTK(A)	
68	Triosephosphate isomerase cytosolic EC 5.3.1.1	P21820	<i>Coptis japonica</i>	SP/GL	100	0.1575	27073 5.676	27157 5,74	(-)KLLGESNEFVWK(-) (-)SLGATLEVVAATK(-)	
70	Alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.1	P48977	<i>Malus Domestica</i>	SP	100	0.0775	41408 6,48	42143 6,73	(K)KGNPLFPR(I) (K)FITHKVPFSEKVK(A)	
26	Phosphoglycerate kinase cytosolic EC 2.7.2.3	Q42962	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP/GL	100	1,6408	42337 5.891	41723 6,30	(R)VDLNVPLDPKFNITDDTR(I) (R)LSELLGVEVK(I) (K)LASLADLYVNDARGTAKR(A) (K)YVKPAVAGFLFQK(E) (K)IGVIESLLEK(V) (K)SFGSILDTTK(T) (K)GVTTIIGGGDSVAAVEK(V)	
27	Phosphoglycerate kinase cytosolic EC 2.7.2.3	Q42962	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP/GL	100	0.7018	42337 5,891	41662 5,88	(R)LSELLGVEVK(I)	
66	Phosphoglycerate kinase cytosolic EC 2.7.2.3	Q42962	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP/GL	100	0.0477	42337 5,891	40514 5,75	(R)VDLNVPLDENFNITDPTR(I) (K)HSLKPLVPR(L) (R)LSELLGVEVK(I) (K)YVKPAVAGFLMQK(E) (K)FAAGTSVIK(K) (K)GVTTIIGGGDSNAAVEK(V) (K)GVTVIIGGGDSVAAVEK(V) (K)GVTTIIGGGVCVAAVEK(V)	Formyl N-TERM Dehydration ST (11)
6	1.5 Metabolismo secundário Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	100	2,0126	33715 5.86	34719 5,70	(K)VLIIGGTGYIGK(F) (K)AVINKYEDIAAFTK(A)	
7	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.3188	33830 6.538	34719 5,62	(R)FFPSEFGNDVTR(V) (R)LYIPEERVLK(N)	Methyl C-TERM
8	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	99,99	0.0864	33830 6.538	35860 5,75	(K)FIVEASAK(A) (R)FFPSFFGNDVDR(V)	Dehydration ST (4)
9	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	99,99	0.8348	33830 6,538	29956 5,62	(K)VLVIGGTGYIGK(F) (K)FLVEASAK(A) (R)FLPSEFGQTVDR(T) (K)VVILGDGNVK(G) (K)VVILGDGRGK(G)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
10	<i>Isoflavone reductase</i> EC 1.3.1.45	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	99,99	0.0793	33830 6,538	35441 6,61	(K)KIVEASAC(A) (K)FIVEASAK(A) (R)VYVPEEQVLK(N)	
84	<i>Isoflavone reductase</i> EC 1.3.1.45	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	100	0.1570	33715 5.863	33075 5,70	(K)VLIIGGTGYIGK(F) (K)QADVIVISTVDSMQILDQTK(I) (R)FFPSFFGNDVDR(V)	Dehydration
126	<i>Isoflavone reductase</i> EC 1.3.1.45	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.5089	33715 5.863	31975 5,62	(K)VLIIGGTGYIGK(F) (R)FFPSEFGNDVDRVHAVEPAK(A)	
2 - Energia										
2.1 Fotossíntese										
80	<i>Oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplast pr</i>	P11594	<i>Sinapis alba</i>	SP/GL	100	0.1640	27925.03 6.83	21169 4,72	(R)SVEYPGQVLR(Y)	Acetyl N-TERM
81	<i>Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplast pr</i>	O49079	<i>Fritillaria agrestis</i>	SP/GL	100	0.1136	23333 4.928	19474 4,84	(K)ITLSVTK(S) (R)VPFLFTIK(Q) (R)GGSTGYTNAVALPAGGR(G)	Methyl
87	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain</i> EC 4.1.1.39	Q31674	<i>Anemia mexicana</i>	SP	100	0.1849	46497 6.962	38595 7,39	(K)YGRPLLGNFIKPK(L) (R)GGLDFTKDQETVNSQPFFR(W) (R)FLFKCEALFK(S) (R)DPGLLLHIHR(A) (R)DDGLLLHIHR(A) (K)LEGEREVTLGFDLLR(D)	
88	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain prec</i> EC 4.1.1.39	P30401	<i>Cuscuta reflexa</i>	SP	100	0.2276	55.343 6.564	54830 7,43	(K)YGRPLLGNFIKPK(L) (R)GGLDFTKDDINVNSQPFMR(W) (R)PNGLLLHIHR(A) (R)ESGLLLHIHR(A)	
2.2 Transporte de elétrons										
22	<i>ATP synthase beta chain mitochondrial precursor</i> EC 3.6.3.14	Q01859	<i>Oryza sativa</i>	SP/GL	99,99	1,2833	59022 6.68	50160 5,38	(R)TIAFDGTEGLVR(G) (K)VVDLLAPYRK(G) (R)FTQANSEVSALLGR(I)	
74	<i>ATP synthase beta chain mitochondrial</i> EC 3.6.3.14	P19023	<i>Zea mays</i>	SP/GL	99,99	0.3652	59103 6.01	52623 5,33	(R)IINVIGEPIDEKGDIK(T) (K)TVLIMELINNVAK(A) (R)VGLTGLTVVEHFK(D) (R)FTQANSFVSALLGR(I)	Dehydration

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)										
Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
75	ATP synthase beta chain mitochondrial EC 3.6.3.14	Q01859	<i>Oryza sativa</i>	SP/GL	100	0.1066	58934 5.95	53227 5,29	(R)TIAMDGTEGLVR(G) (R)VLNTGSPMTVPVGR(A) (R)VPNTGSPITVPVGR(A) (K)IGLFGGAGVGK(T) (K)TVLILYLINNVAK(A) (R)VGLTGLTVAYCFR(D)	Oxidation M (4) Dehydration ST (6) Hydroxyl DKNP (3)
76	ATP synthase beta chain mitochondrial EC 3.6.3.14	P29685	<i>Hevea brasiliensis</i>	SP/GL	99,99	0.2129	60258 5.95	52623 5,22	(R)VLSKGSPITVPVGR(A) (K)TSHFLPIHR(E) (K)TTHFLPIHR(E) (K)VVDLLAPYQR(G) (K)IGLFGGAGVGK(T) (K)TVLIMELINNVAK(A) (R)VGLTAVTVAEHFR(D)	Methyl N-TERM Methyl N-TERM
23	ATP synthase alpha chain mitochondrial EC 3.6.3.14	P05492	<i>Oenothera biennis</i>	SP	100	0.1746	55562 6.55	54456 6,68	(R)AAELTTLLES(R) (R)AVTLTTLLES(R) (R)VVDALGVPIGK(G) (K)TAIAIDTILKNK(Q) (K)LELARYK(E)	Methyl C-TERM
73	ATP synthase alpha chain mitochondrial EC 3.6.3.14	P05492	<i>Oenothera biennis</i>	SP	100	0.1035	55562 6.547	74277 5,62	(R)VATLTTLLES(R) (K)SVLGRVWDALGVPIGK(G) (R)QMSLLLR(R)	
115	ATP synthase alpha chain mitochondrial EC 3.6.3.14	P05492	<i>Oenothera biennis</i>	SP	99,99	0.4085	55562 6,547	55459 6,92	(R)AAELTTLLES(R) (R)AVTLTTLLES(R) (R)VISVDGIVK(V) (R)VVDALGVPIGK(G) (K)TAIAIDTILKNK(Q) (K)LELARYK(E)	
35	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A EC 3.6.3.14	Q9SM09	<i>Citrus unshiu</i>	SP/GL	100	0.2072	68637 5.37	66874 5,54	(K)LAADTPLLTGRK(V) (K)TVISQALSK(Y) (R)LASFYER(A) (R)NIIHFYNLANQAVEK(G)	Methyl C-TERM (C-term)
99	Quinone oxidoreductase ADH_zinc_N, EC 1.-.-.-	Q9ZUC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GL	88,11	0.1255	83987 8.9	38200 5,60	(K)LVPDVGVPKEDQVLVK(V) (K)QHGTAEYTAVER(L) (K)LNPFLESQK(I) (K)VVIHPA(I)	
24	Malate dehydrogenase mitochondrial precursor EC 1.1.1.37	P46487	<i>Eucalyptus gunnii</i>	SP/GL	100	0.1202	36439 8.913	39747 5,88	(R)DTLFNINAGIVK(S) (R)DVLFNINAGIVK(S) (R)DDLFNINAGIVK(S) (K)ANLADIDIK(A) (K)ANLADEIHK(A)	Methyl CDEHKNRQ (1) Hydroxyl DKNP (1) Hydroxyl DKNP (7) Hydroxyl DKNP (9)

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
107	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial precursor</i> EC 1.1.1.37	P17783	<i>Citrullus lanatus</i>	SP/GL	99,99	0,0892	36200 8.88	36231 5,96	(K)VVVLGAAGGIGQPLALLFK(L) (R)DVLFNINAGIVK(S) (K)YCPNTLINMISNVVNSTVPIAAEVFK(K) (K)KLFQVTTLDVVR(A) (K)LFGVTTLTIVR(A)	Hydroxyl DKNP (1)
106	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial precursor</i> EC 1.1.1.37	P46487	<i>Eucalyptus gunnii</i>	SP/GL	99,99	0.1502	36439 8.913	36231 5,82	(K)VAVLGAAGGIGKPLALLMK(L) (K)VAVLGAAGGIGQPLALLFK(L) (K)TFIAGKAK(V) (K)EGKGSATLSMAYAGALFADKCLK(G) (K)TGPEILPELK(A) (K)PGLLEILPELK(A)	Formyl N-TERM Methyl N-TERM
93	<i>Aconitate hydratase cytoplasmic</i> EC 4.2.1.3	P49608	<i>Cucurbita maxima</i>	SP/GL	100	0.2181	97942 5.996	90180 6,16	(R)ILLESAR(N) (K)YLLER(G)	
31	<i>Phosphoglyceromutase</i> EC 5.4.2.1	O24246	<i>Prunus dulcis</i>	SP/GL	100	0.6180	53361 5.496	61318 5,38	(R)LDQVKLLVK(G) (R)YENDMGVVK(R) (K)QGRVTFFWNGNR(S)	SMA K (9)
33	2.3 Associado ao ATP <i>NADP dependent malic enzyme</i> EC 1.1.1.40	P51615	<i>Vitis vinifera</i>	SP/GL	100	0.1702	65185 6.42	72435 7,57	(K)YGSIFR(R) (R)IQRIVVTDGER(I) (K)VLVQFEDFANHKAFDLLAK(Y) (K)IWLSDVK(G) (K)IWLSDIK(G) (K)VIKAVLIGSSGVGK(A)	
37	<i>Succinate dehydrogenase ubiquinone flavoprotein subunit mitochondrial</i> EC 1.3.5.1	O82663	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	99,99	0.1896	69612 6.194	67333 5,95	(K)AVIELENYGLIFAR(T) (R)LGGKSLLDIVVFGR(A) (R)AFGGQSLVYGK(G)	
96	<i>Transketolase 7</i> EC 2.2.1.1	Q42677	<i>Craterostigma plantagineum</i>	SP/GL	85	0.1451	73364 6.53	78818 7,05	(R)FLAIDAVEK(A) (K)SPYWFNR(D) (K)LPQLPGTSIEGMSK(G) (K)ESVLPAAVSAR(V) (R)VLLLGGHAIKR(G) (R)VLLLGHNHIAK(G) (R)VLLLGKHAIAR(G)	
122	<i>Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit</i> EC 1.2.7.8	O58495	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	SP	100	0.2095	70854 6.965	35026 5,65	(R)VLLLGGHAIKR(G) (R)VLLLGHNHIAK(G) (R)VLLLGKHAIAR(G)	
103	<i>Peroxisome biosynthesis protein PAS5 Peroxin 6</i>	P33289	<i>Pichia pastoris</i>	SP/GL	99,99	0.0297	129056 5.067	97457 5,78	(R)YNEELPEK(S)	
11	2.4 Metabolismo da Glicose <i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase A chloroplast</i> EC 1.2.1.13	P09315	<i>Zea mays</i>	SP/GL	99,99	0.1361	42840 7.554	46627 7,42	(R)AAALNIVVSTGAAG(A) (K)AVSLVLPKLK(G)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)										
Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
102	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase B chloro EC 1.2.1.13	P25857	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	99	0.2193	35511 6.474	42270 6,86	(R)AIAANIVPTSTGAAK(A) (K)AVSLVLPQLK(G) (R)VVDLAHLVAVK(W)	
12	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic EC 1.2.1.12	P26519	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	99,99	0.1670	36348 7.593	43442 7,62	(R)AASFNIIISATGAAK(A) (R)VPTVDVSVVKKTAR(L)	Hydroxyl DKNP (7) Acetyl N-TERM (N-term)
86	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic EC 1.2.1.12	P09094	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP/GL	100	0.0857	35511 6.474	36125 6,94	(R)NP EEIPWGEVGA EYVVESTGVFTDKDK(A) (R)FGIVEGLMTTVHSITATQK(T) (K)LVSWYDNDWGYSSR(V)	Methyl CDEHKNRQ (7)
113	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic EC 1.2.1.12	P26519	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	100	0.0804	36348 7.593	35860 7,59	(K)MKIGINGFGR(I) (K)FGIVEGLMTTVHSITATKK(T) (R)SSIFDAK(A)	Formyl N-TERM
13	Enolase EC 4.2.1.11	P42896	<i>Ricinus communis</i>	SP/GL	100	1,5743	47008 7.5	53106 5,61	(K)SVLELLKTAIGK(A) (K)KNVIGSVTESIEAVR(M)	
14	Enolase EC 4.2.1.11	Q9LEI9	<i>Hevea brasiliensis</i>	SP/GL	100	0.6448	47883 6.206	53349 5,56	(R)GNPTVEADVTLS DGYLAR(A) (K)LAMRTFMILPVGASSFK(E) (K)LAMQEFFILPVGASSFK(E) (K)EGLELLKSAIAK(A) (K)VVIGFDVAASEFYVSDK(T) (K)SYDLNFK(E) (K)EKSCNALLK(V) (K)VNQIGSVTESIEAVK(M) (K)YNQLKR(I)	Methyl C-TERM) Carbamidomethyl C4 Amidation C-TERM
15	Enolase EC 4.2.1.11	P26300	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP/GL	99,99	0.2086	47768 5.876	57129 6,39	(R)AAVPSGASTGIYTVLELR(D) (R)AAVPSGASTGIYEALKKR(D) (K)AVGKVN SIIGPALVGK(D) (K)LGANAILAVKLAVCK(A) (K)LGANAILAVKLAVCK(A) (K)LAMQEFMILPVGAAHIK(E) (K)SYDLNFK(E) (K)VNQIGSVTESIEAVK(M) (K)YNQLKR(I)	Hydroxyl DKNP (15) Hydroxyl DKNP (15) Methyl C-TERM Amidation C-
39	Fructokinase EC 2.7.1.4	P37829	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	98,03	0.0571	33743 5.62	37093 4,95	(R)TALAFVTLR(A) (K)ITGALLSYDPNLR(L)	
43	Fructokinase EC 2.7.1.4	P37829	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.9802	33743 5,62	33762 5,34	(K)APGGAPANVAIVTR(L) (R)TALAFVTLR(A) (K)GAGELLSYDPNLR(L) (K)SAGALLSYDPNLR(L)	Formyl N-TERM

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
65	Fructokinase EC 2.7.1.4	P37829	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	99,99	0.2183	33743 5.62	34719 5,22	(K)APGGAPANVAIAVTR(L) (R)TALAFVTLR(A) (K)TAGALLSYDPNLR(L) (R)LPLWPIEAER(K)	Methyl N-TERM
120	Fructokinase EC 2.7.1.4	P37829	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.1425	33743 5.62	31834 5,20	(R)TALAFVTLR(A) (-)VSLDLATRSVK(-)	
94	Sucrose synthase EC 2.4.1.13	P49034	<i>Alnus glutinosa</i>	SP/GL	100	0.0892	91572 6.729	98126 7,31	(K)LLDGAFGEVLK(S) (R)IQNVHALQYVLR(K) (K)NITGLVEWYGK(N) (R)YIEMFYALK(Y)	
95	Sucrose synthase EC 2.4.1.13	P49035	<i>Daucus carota</i>	SP/GL	100	0.0647	92415 6.589	97457 7,17	(R)LLPDVAGTTCNQR(L) (K)LGVTQCTIAHALEK(T)	Carbamidomethyl C (6)
40	3 Processos celulares 3.1 Regulação intracelular 14 3 3 like protein	P93342	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP/GL	99,98	0.2122	30551 5.029	29553 4,68	(K)TVDVEELTVEER(N) (R)KVLSVAYK(N) (K)VFYK(M) (R)YLAEFK(T) (K)SAQDIALAELAPVHVIR(L) (K)DSTLMRLK(D) (K)DSTLIFQLLR(D)	
61	14 3 3 like protein	Q9SP07	<i>Lilium longiflorum</i>	SP/GL	99,98	0.1509	29234 4,824	29956 4,77	(R)NLLSVPHK(N) (K)SIAESTLLAYK(S) (K)SAQDIALAELAVVHPIR(L)	
62	14 3 3 like protein	Q9SP07	<i>Lilium longiflorum</i>	SP/GL	100	0.1927	29234 4,824	30912 4,68	(R)KVLSVAYK(N) (K)VFYK(M) (K)SIAESTLLAYK(S) (K)SAQDIALAGLACTHPIR(L) (K)SAQDIALAELAVVHPIR(L)	
63	14 3 3 like protein	P46077	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	100	0.3012	30175 4,819	30159 4,60	(R)NLLSVPHK(N) (K)ICDGLGLLDTR(L)	
91	14 3 3 like protein	Q9SP07	<i>Lilium longiflorum</i>	SP/GL	100	0.2201	29234 4.824	32736 4,77	(R)EEYVYMAK(L) (R)NLLSVAYK(N) (K)VFYK(M) (K)SAQDIAGAELASTHPIR(L) (K)DSTLMQLLR(D)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)										
Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
2	3.2 Divisão celular <i>Cell division cycle protein 48 homolog</i>	Q96372	<i>Capsicum annuum</i>	SP	99,99	0.5174	89275 5.115	89769 5,40	(R)KNVELPLR(H) (K)GKPSIIFIDEIDSIAPK(R) (R)EITIGVPDEVGR(L)	Methyl N-TERM
30	3.3 Estresse <i>Chaperonin CPN60 mitochondrial precursor HSP60</i>	P29197	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	100	0.2484	61242 5.717	59119 5,48	(K)GVEDLATAIK(V) (R)GITLAVDAVVTNLK(S) (K)VLELALK(R) (R)SAIELSTSDYDKSK(L) (K)IGVQIIQKGLK(T)	Acetyl K (14)
32	<i>RuBisCO subunit binding protein beta subunit chloroplast 60 kDa chaperonin beta subunit CPN 60 beta</i>	P84581	<i>Populus euphratica</i>	SP/GL	97,32	0.2297	2517 4.519	60761 5,32	(-)VVAAGANPVLITR(D) (R)DLVKVLEDAIR(-)	
55	<i>RuBisCO subunit binding protein alpha subunit 60 kDa chaperonin alpha subunit CPN 60 alpha</i>	P08824	<i>Ricinus communis</i>	SP/GL	100	0.1542	52346 4.79	62734 4,91	(R)NVVLMIFGSPK(V) (R)NVVLDIFGSIK(V) (K)LGLLSVTSGANVVAIK(R) (K)VGAATETELEDK(R)	
54	<i>Chaperone protein dnaK Heat shock protein 70</i>	O87712	<i>Coxiella burnetii</i>	SP/GL	98,82	0.1826	70711 5.18	35807 4,67	(K)IAGLRGKR(I) (R)TPVETSLR(D) (K)DLDEVILVGGSTR(I) (R)IPAVQALVK(K)	
48	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q08276	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.4530	73077 6.37	70801 5,34	(K)VQEIVSNKFGK(S) (K)GVNPDEAVALGAALQGGILR(G)	
49	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	P11143	<i>Zea mays</i>	SP/GL	100	1,5735	70603 5.22	68731 5,28	(K)KNAEAYLGSTIK(N) (K)VQKLLQDFFNGK(E)	
50	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	P34933	<i>Bos taurus</i>	SP/GL	100	0.3077	69156 5.37	74787 5,19	(K)FTLTGIPPAPR(G)	Methyl N-TERM
56	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q02028	<i>Pisum sativum</i>	SP/GL	100	0.1879	75469 5.26	46309 5,67	(R)TPVETSLR(D) (K)TIDEVILVGGSTR(I) (R)IPAVAKLVK(K)	Methyl C-TERM Methyl N-TERM
77	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q08276	<i>Solanum tuberosum</i>	SP/GL	100	0.9327	73077 6.37	69520 5,23	(K)VQEIVSNKFGK(S) (K)GVNPDEAVALGAALQGGILR(G)	
118	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q05944	<i>Hydra magnipapillata</i>	SP/GL	99,85	0.1535	71423 5.818	70801 5,16	(R)TTPSYVAFTDTER(L) (K)DAGVIASLNCLR(I) (K)FELSGIPLPPK(G)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)										
Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
119	Heat shock 70 kDa protein	P11143	<i>Zea mays</i>	SP/GL	100	0.0211	70559 5.258	66266 5,35	(K)QFAAEEISSHVLK(M) (K)EIAEAHLGPTIK(N) (K)EIAEAYLGSTIK(N) (K)KGVTVVPAYFNDSQR(Q) (R)FEELNMTLFR(K)	Dehydration ST (9) Methyl C-TERM
109	Heat shock protein 80	P36181	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP/GL	99,99	0.1613	80085 4.989	77746 4,62	(R)ELVSNSSVALDK(I) (K)ETQLEYLEER(R) (K)HSYIISYPISLWVEK(T) (K)GIVPSFDLPLNISR(E)	Methyl CDEHKNRQ (3)
71	Heat shock protein 90	O43109	<i>Podospira anserina</i>	GL	100	0.1006	79273 4.931	74787 5,02	(R)ELVSNASDALDK(I) (K)ADLVNNLGTIAR(S) (K)GIVDSEDLPLNISR(E)	
105	Luminal binding protein precursor BiP 78 kDa	P49118	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP/GL	99,99	0.1047	73189 5,132	86156 5,50	(K)VFSPEEISAFILTK(M) (K)FTLTGIPPAPR(G) (K)IQIDEIVLVGGSTR(I)	Methyl N-TERM Deamidation Q (2)
121	3.4 Redox Formate dehydrogenase mitochondrial precursor EC 1.2.1.2	Q07511	<i>Solanum tuberosum</i>	SP	100	0.0710	42038 6.64	42292 7,13	(K)GVLIVNNAR(G)	
111	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoredu EC 1.6.5.2	gij18414 298	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GL	99,98	0.0616	47349 5.3	32353 6,61	(K)AYLFPEGFAR(L) (K)TLLSAAGEIFK(Y) (K)FGSYWVK(D) (K)VVGAFLEGGNPEENK(A) (K)LQPPVESLEK(L)	
19	5 Componentes estruturais 5.1 Metabolismo da lignina Caffeic acid 3 O methyltransferase EC 2.1.1.68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	SP/GL	100	1,3944	39888 5.72	38652 5,52	(K)TAVLEGGIPFNK(A) (K)GINVYLPHVIEDAPPLPGVK(H)	Methyl N-TERM
20	Caffeic acid 3 O methyltransferase EC 2.1.1.68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	SP/GL	100	0.9936	39888 5.721	38709 5,58	(K)ILMEIWHYLK(D)	
116	Caffeic acid 3 O methyltransferase EC 2.1.1.68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	SP/GL	100	0.1579	39888 5.721	27902 5,29	(K)AAIELDLLEIMAK(A) (K)PHGMTAFEYHGTDPF(F) (K)ILETYK(G) (K)GINFDLPHVIEDAPPLPGVK(H)	
64	Caffeoyl CoA O methyltransferase EC 2.1.1.104	P28034	<i>Petroselinum crispum</i>	SP/GL	100	0.2393	27096 5.39	26672 4,91	(K)ILAMDINR(E) (K)ILAFDINR(E) (R)LIDLVK(I) (R)DFVIELNK(A)	Carbamidomethyl C (2)

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
38	<i>Cinnamyl alcohol dehydrogenase</i> EC 1.1.1.195	O64969	<i>Eucalyptus globulus</i>	SP/GL	99,99	0.1079	38780 5.91	42228 6,12	(R)NTGPMILYIK(V) (R)GGILGLGGVGPMPVK(I) (K)SITGSFIGAFK(E) (K)GLTSQIEVIK(M) (K)MDYVNTVLTR(L) (R)FVVDVVGSK(L) (R)FVVDVVGSKLT(-)	Methyl N-TERM
104	<i>Phenylalanine ammonia lyase</i> EC 4.3.1.5	O64963	<i>Prunus avium</i>	SP/GL	100	0.09079	67832 6.54	77746 6,85	(R)TSPQWLGPQIEVIR(Y) (R)NPSLDYGFK(G) (K)IVAFEEELK(V) (R)FEILEAITK(L) (R)EINSVNDNPLIDVAR(S)	
44	5.2 Citoesqueleto <i>Actin</i>	Q96483	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SP/GL	100	2.3833	37150 5.378	41846 5,50	(R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A) (R)GYMFTTTAER(E) (K)EITALAPSSMK(I)	Dehydration ST (7)
45	<i>Actin</i>	Q99023	<i>Trichoderma reesei</i>	SP/GL	99	0.5056	41717 5.602	42270 5,55	(R)AVFPSIVGR(S) (R)VAPEEHPVLLTEAPINPK(S)	
83	<i>Actin</i>	P53492	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GL	3e-131	0.6670	41735 5.1	42079 5,33	(R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A) (R)GYMFTTTAER(E)	
117	<i>Actin</i>	Q99023	<i>Trichoderma reesei</i>	SP/GL	99,99	0.1181	41717 5.602	42613 5,62	(R)AVFPSIVGR(S) (R)VAPEEHPVLLTEAPVKPK(S)	
46	Actin depolymerizing factor like At1g01750 ADF li	Q9LQ81	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	100	0.4458	16341 5,54	17516 5.73	(K)FLELK(A) (K)IIFIAWSPDTSK(V)	
1	Profilin 6 Pollen allergen Hev b 8 0204	Q9LEI8	<i>Hevea brasiliensis</i>	SP/GL	99,99	0.2637	13997.954 5.014	13364 4,55	(K)FFVIQGEPEGAVIR(G) (K)YFVIQGEPEGAVIR(G) (R)LGTYLLDQGL(-)	Methyl C-TERM Methyl N-TERM
79	<i>Tubulin alpha</i>	P33629	<i>Prunus dulcis</i>	SP/GL	100	1,4031	49526 4.9	47486 5,20	(-)LAVNLLGKVGR(-) (R)AVFVDLEPTVIDEVR(T) (-)QRFSTTRLRYRCK(-)	
125	<i>Tubulin beta</i>	P29512	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	2e-13	1,1345	70854 6.965	47055 5,15	(K)VALNLLIEVR(N) (K)MASTFIGNSTSIQEMFR(R)	
3	6 Metabolismo macromolecular 6.1 Histona <i>Histone H4</i>	P62792	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	SP/GL	100	0.1661	11228 11.445	17997 7,37	(R)ISGLIYEFTR(G) (K)IFLEGRIR(D) (K)TVTAFDVVYALK(R)	Dehydration ST (9) Dehydration ST(9)

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
51	6.2 Biossíntese de proteínas <i>Elongation factor 2 EF 2</i>	O23755	<i>Beta vulgaris</i>	SP/GL	100	0.2074	93738 6.225	90799 6,80	(R)FFAFGR(V) (R)TVIWMGK(K) (K)FSVSPVVR(V)	
52	<i>Elongation factor 2 EF 2</i>	O23755	<i>Beta vulgaris</i>	SP/GL	100	0.1342	93738 6.225	90386 6,57	(K)STLTDSLVAAGIIAQEVAGDVR(M) (R)KGNDYLINLIDSGHVDFSSIVTAALR(I) (R)FFAFGR(V) (K)FSVSPVVR(V) (R)LLEPVYLVEIQAPEKALGGIYSVLNQK(R) (K)EQFTPLSEFEDKL(-)	
53	<i>Elongation factor 2 EF 2</i>	O23755	<i>Beta vulgaris</i>	SP/GL	100	0.2361	93738 6.225	91215 6,34	(R)FFAFGR(V) (K)FSVSPVVR(V) (K)FSVSPVVR(V)	
57	<i>Eukaryotic initiation factor 4A</i> <i>eIF4A eIF 4A</i> EC 3.6.1.-	P41378	<i>Triticum aestivum</i>	SP	100	0.3679	46897 5.39	45471 5,57	(R)GIYAYGFEKPSAIQRK(G) (R)ALGDYLGVK(V) (K)DQIYDIFQLLIGK(I) (K)VDWLTDK(M) (R)VLITTDLLVK(G) (R)VLITTTLLVR(G)	Methyl C-TERM
36	6.3 Ribossomo <i>30S ribosomal protein S5P</i>	Q9YF95	<i>Aeropyrum pernix</i>	SP	99,99	0.1493	24228 10.232	68574 6,04	(R)FAIEKGIR(N) (R)FAIEKAVR(N)	Methyl C-TERM
129	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i> <i>Light induced 34</i>	P29764	<i>Chenopodium rubrum</i>	SP/GL	100	0.0864	34351 5.22	37809 5,20	(R)GDSIVLFGK(N) (K)VGSSEAALLAK(L) (K)GTVFIITPVELIK(K)	Dehydration ST
58	6.4 Degradação de proteínas <i>26S protease regulatory subunit</i> <i>6B homolog TAT binding</i> <i>protein homolog 2</i>	Q9SEI4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SP/GL	34,9	0.2031	45513 6.85	48472 5,59	(R)GVLLYGPVGVGK(T) (R)YVILPK(D)	
72	<i>Proteasome subunit alpha type</i> <i>2</i> EC 3.4.25.1	Q9LSU2	<i>Oryza sativa</i>	SP/GL	100	0.1096	25844 5.39	29420 5,76	(K)KLPSILVDETSKVK(I)	
34	7 Função não definida 7.1 Proteínas putativas <i>Hypothetical protein in nit 5</i> <i>region orf2</i>	P82606)	<i>Bacillus sp</i>	SP/GL	100	0.2119	29089 9.18	67951 5,52	(K)SVEDYFLISLQTK(G) (R)SLLLVAVRK(Q)	SMA N-TERM
78	<i>Putative 60S ribosomal protein</i>	Q45KX4	<i>Rheum australe</i>	SP/GL	100	0.0942	33666 5,2	25931 5,28		

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
92	<i>Hypothetical GST like protein ytcF</i>	P77544	<i>Escherichia coli</i>	SP	100	0.2393	24310 5.372	24510 6,04	(R)FIALSAKQSG(-)	
98	<i>Probable protein disulfide isomerase A6 precursor</i>	P38661	<i>Medicago sativa</i>	SP/GL	100	0.2358	40466 5.541	37865 5,64	(K)YGVSGYPTIQWFPK(G) (K)SEDGVVIANLDADKYK(D) (K)YGVSGFPTLK(F) (K)EFVAATGEEK(K) (K)IEEEAEKLEGSSAR(Y)	
108	<i>Probable tartrate utilization transcriptional regu</i>	P52669	<i>Agrobacterium vitis</i>	SP	99,99	0.1320	33833 9.643	55968 7,57	(R)LLEESLGTR(L)	
21	<i>Hypothetical UPF0229 protein bll6755</i>	P44946	<i>Haemophilus influenzae</i>	SP/GL	99,99	0.1992	48270 6,231	34668 5,74	(R)VLLANKEK(L) (K)IVGLVK(E)	Methyl C-TERM
114	<i>Hypothetical 15 7 kDa protein</i>	Q05104	<i>Gallid herpesvirus</i>	SP/GL	100	0.0669	15652 9.97	16334 7,14	(K)RVYNPLSSR(L)	
90	7.2 Proteínas que não apresentaram homologia Unspecified				100	0.1079		32881 4,83	(K)SITFNLTG(K)	
123	Unspecified				100	0.4628		20442 7,14	(K)FGEAVWFK(A)	
172	Unspecified				38,49	0.0766		52383 5,57	(-)YFVLKGERKPLR(-)	
130	Unspecified				37,2	0.2334		16463 5,11	(-)ALLVWLHRRR(-)	
131	Unspecified				68,23	0.3653		16991 4,93	(-)LLTFWTLAMR(-) (-)YLSTNALLRLAY(-)	
132	Unspecified				53,2	0.0900		33417 4,64	(-)LPVVLHQQLK(-)	
133	Unspecified				66,58	0.3042		16934 7,44	(-)LYGLAGLWK(-)	
134	Unspecified				94,13	0.3573		17875 5,60	(-)YLRNLK(-) (-)LPTDDALLGKLK(-) (-)ATYLVLK(-)	
135	Unspecified				100	0.2350		17556 5,62	(-)FPELFAPKRAK(-)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
136	Unspecified				100	0.5850		18784 5,71	(-)PTERYLVLK(-)	
137	Unspecified				66,58	0.1242		29587 6,89	(-)LYGLAGLWK(-)	
138	Unspecified				69,41	0.6030		39167 5,65	(-)SVVLEGGLKMKV(-)	
139	Unspecified				58,15	0.5023		28732 5,67	(-)KNLKLVPCK(-)	
140	Unspecified				100	0.2874		31140 4,95	(-)LDVLTEER(-)	
141	Unspecified				99,9	0.3019		67027 5,60	(-)VLNDTYRR(-) (-)LWAKKKAR(-)	
142	Unspecified				63,57	0.0741		60484 5,60	(-)YVRSRLRK(-) (-)VLNDTLYAK(-) (-)RGLDELSLVR(-) (-)LWAKKKVK(-)	
143	Unspecified				63,58	0.2190		71287 5,78	(-)LAVKLGAASKK(-)	
144	Unspecified				68	0.2874		31140 4,95	(-)ALELYLCLLR(-) (-)VSLVALTLWKR(-)	
145	Unspecified				98,81	0.1628		43741 4,83	(-)TVLALLR(-)	
146	Unspecified				36,88	0.1185		41973 4,87	(-)LGLFRTL(-)	
147	Unspecified				100	0.1479		26048 5,05	(-)LAVNLLGRKR(-) (-)LRRFAFGFASLLK(-)	
148	Unspecified				44,74	0.0822		69361 6,59	(-)LLRLLHMKAYLK(-)	
149	Unspecified				73,50	0.4534		51201 6,61	(-)FLALPSVFK(-) (-)LCVLPRLRSK(-)	

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
150	Unspecified				84,21	0.1235		63599 6,23	(-)LKAYQVRK(-) (-)VFQALGVLVKKV(-) (-)NPTSVKLYLK(-) (-)YVEPALVCKFR(-)	
151	Unspecified				71,9	0.1236		67951 5,70	(-)LGALRRLV(-)	
152	Unspecified				99,9	0.1389		27496 7,07	(-)VLDLGALLMFEK(-)	
153	Unspecified				99,9	0.1953		29453 7,29	(-)SLLLFKNLNRKK(-) (-)TVLLLFLLNRKK(-) (-)TLAFDRSLTVR(-) (-)VGLTWLLKRWK(-)	
154	Unspecified				98,67	0.1931		35233 5,51	(-)LGLFSGFVK(-)	
155	Unspecified				69,57	0.1521		23245 5,73	(-)LLATLLLLAK(-)	
156	Unspecified				82,65	0.7614		16297 5,65	(-)FLDLKVFR(-) (-)TFLPFK(-)	
157	Unspecified				100	0.5306		16334 5,68	(-)PFLDLVK(-) (-)GLPEVLAEHLLR(-)	
158	Unspecified				65,21	0.6939		26166 5,55	(-)LYGLLRP(-) (-)VPELVKKPL(-)	
159	Unspecified				99,9	0.1567		26136 7,44	(-)TLFHLNLQR(-) (-)TVVATKVR(-)	
160	Unspecified				25	0.1006		84984 4,75	(-)GKLVVFFWLWLR(-)	
161	Unspecified				100	0.3057		13501 4,37	(R)NAELEILKR(T)	
Spots que não apresentaram resultado										
69	Não foi observado peptídeos					0.1705		37865 5,27		
97	Não foi observado peptídeos					0.1620		26914 6,42		
124	Não foi observado peptídeos					0.3602		18180 5,77		

Tabela 3 – Proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas

(conclusão)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécies (b)	Base (c)	Prob. %	Vol. %	PM/pl teórico	PM/pl exp.	Peptídeos encontrados	Modificações
162	Não foi observado peptídeos					0.1280		16426 4,83		
163	Não foi observado peptídeos					0.1259		16151 5,28		
164	Não foi observado peptídeos					0.8166		50968 4,94		
165	Não foi observado peptídeos					0.1259		31555 6,35		
166	Não foi observado peptídeos					0.2574		51318 6,94		
167	Não foi observado peptídeos					0.1838		17775 6,20		
168	Não foi observado peptídeos					0.0783		15456 5,66		
169	Não foi observado peptídeos					0.2518		26343 5,63		
170	Não foi observado peptídeos					0.1907		26077 5,42		
171	Não foi observado peptídeos					0.0850		17735 5,30		

(a) - Número de acesso da proteína ao EBI/EMBL.

(b) - Espécie onde a proteína encontrou maior homologia.

(c) - Bases de dados onde a proteína foi identificada: SP = SWISS-PROT, GL = GENOLYPTUS.

PM - Peso molecular (kDa).

pI - Ponto isoelétrico.

Figura 17 – Exemplos de proteínas encontradas em diferentes *spots*; (A) *S adenosylmethionine synthetase*, (B) *Isoflavone reductase*, (C) *Actin*, (D) *14 3 3 protein* e (E) *Caffeic acid 3 O methyltransferase*

Tabela 4 - Proteínas que foram representadas por mais de um *spot* no gel de pH 4-7

Proteína	Spot	Proteína	Spot
<i>S adenosylmethionine synthetase</i>	16, 17, 18, 85	<i>14 3 3 protein</i>	40, 61, 62, 63, 91
<i>Phosphoglycerate kinase cytosolic</i>	26, 27, 66,	<i>Heat shock 70 kDa</i>	48, 49, 50, 56, 77, 118, 119
<i>Glutamine synthetase nodule isozyme</i>	42, 100	<i>Caffeic acid 3 O methyltransferase</i>	19, 20, 64, 116
<i>Glutamate dehydrogenase</i>	25, 101	<i>Actin</i>	44, 45, 83, 117
<i>Triosephosphate isomerase cytosolic</i>	4, 5, 67, 68	<i>Elongation factor 2 EF 2</i>	51, 52, 53
<i>UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase</i>	28, 29, 41	<i>ATP synthase alpha chain mitochondrial</i>	23, 73, 115
<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain</i>	87, 88	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial precursor</i>	24, 106, 107
<i>Isoflavone reductase</i>	6, 7, 8, 9, 10, 84, 126	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase A chloroplast</i>	11, 102
<i>Oxygen evolving enhancer protein</i>	80, 81	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic</i>	12, 86, 113
<i>ATP synthase beta chain mitochondrial precursor</i>	22, 74, 75, 76	<i>Enolase</i>	13, 14, 15
<i>Fructokinase</i>	39, 43, 65, 120	<i>Sucrose synthase</i>	94, 95

4.5 Perfil do proteoma da madeira

Os *spots* avaliados foram classificados em categorias funcionais e a sua distribuição está representada na Figura 18. A categoria que apresentou o maior número de proteínas identificadas foi a de energia, com 37 *spots* relacionados ao transporte de elétrons, metabolismo da glicose e fotossíntese. No metabolismo macromolecular foram identificados 30 *spots* com proteínas envolvidas no metabolismo secundário dos aminoácidos, nitrogênio, nucleotídeos e carboidratos. Fazem parte desta categoria as duas proteínas mais abundantes encontradas no caule de *Eucalyptus grandis* a *S-adenosylmethionine synthetase* e a *isoflavone reductase*, as quais foram representadas por múltiplos *spots* (Tabela 4). Na categoria das proteínas relacionadas a processos celulares ocorreu uma predominância de proteínas envolvidas em mecanismos ligados ao estresse, entre elas as *Heat shock protein* (HSP). Na categoria das proteínas envolvidas com os componentes estruturais foram identificados 14 *spots* relacionados ao metabolismo da lignina e da formação da parede celular. A actina foi a terceira proteína mais abundante encontrada no caule indicando a sua importância no metabolismo celular.

A metodologia adotada na extração e separação das proteínas do caule possibilitou identificar proteínas citoplasmáticas (*Triosephosphate isomerase*) e de diferentes organelas como o cloroplasto (*glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*), mitocôndria (*ATP synthase*, *malate dehydrogenase*), vacúolo (*vacuolar ATP synthase*) e o núcleo (*histone*).

Figura 18 – Distribuição por categoria funcional dos *spots* analisados, separados por eletroforese bidimensional e seqüenciados por LC/MS/MS

4.5.1 Metabolismo

4.5.1.1 Metabolismo dos aminoácidos

Neste grupo funcional foram identificados seis *spots*, correspondendo às proteínas: *S-adenosylmethionine synthetase*, *adenosylhomocysteinase*, *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocystein* e *D 3 phosphoglycerate dehydrogenase chloroplas*. Os *spots* 16, 17, 18 e 85 foram identificados como sendo a proteína *S adenosylmethionine synthetase* (SAM-S). Entre as proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* identificadas por MS, a SAM-S foi a mais abundante

correspondendo a 7,077% do volume total das proteínas presentes no gel. Esta abundância possivelmente é devida a sua importância em diferentes mecanismos ligados a formação da madeira. A proteína SAM-S é uma enzima que atua como doadora universal de grupos metil em numerosas reações de trans-metilação envolvendo diferentes receptores moleculares como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos (MENG; CAMPBELL, 1998). A enzima ocupa um papel fundamental na metilação de precursores de monolignol durante a formação da lignina (YE et al., 1994) e também na biossíntese do etileno (KENDE, 1993). Tem sido proposto que a enzima está envolvida na tolerância a estresse abiótico (SÚLE et al., 2004). Na diferenciação do xilema de pinus e álamo foi encontrado alto nível de transcritos relativos a SAM-S (ALLONA et al., 1998; STERKY et al., 1998; PILATE et al., 2004). Gion et al. (2005) ao realizarem a identificação de proteínas do xilema de *Pinus pinaster* encontraram 14 *spots* relativos a SAM-S, sendo a terceira proteína mais abundante. O *spot* 127 foi identificado como sendo a proteína *adenosylhomocysteinase* (AdoHycase) a qual catalisa a hidrólise da *adenosylhomocysteine* formando adenosina e homocisteína. A proteína *adenosylhomocysteine* é um inibidor competitivo da *adenosylmethionine* e também desempenha um importante papel na modulação da atividade de várias metiltransferases, via regulação de sua concentração intracelular (SGANGA et al., 1992). O *spot* 112 foi identificado como *D-3 phosphoglycerate dehydrogenase*. Em plantas a enzima está envolvida com a síntese da serina, encontrada no cloroplasto realizando a oxidação da *3-phosphoglycerate* para *phosphohydroxypyruvate* (HO et al., 1999).

4.5.1.2 Metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio é fundamental em diferentes vias metabólicas como a dos aminoácidos e nucleotídeos. O metabolismo do nitrogênio envolve as etapas de sua fixação e assimilação. Neste grupo funcional foram identificados cinco *spots* correspondendo às proteínas: *glutamine synthetase*, *glutamate dehydrogenase* e *glutamate ammonia ligase adenyllyltransferase*. Os *spots* 42 e 100 foram identificados como *glutamine synthetase* (GS), uma das principais enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio, responsável por catalisar a reação entre glutamato e NH_4

formando glutamine. A enzima GS também participa da reciclagem do nitrogênio gerado em diversos processos metabólicos tais como a fotorrespiração, o *turnover* de proteínas, o catabolismo de aminoácidos, reações de biossíntese de aminoácidos e de lignina. A enzima é o primeiro ponto de regulação no metabolismo do nitrogênio, plantas transgênicas de álamo, que superexpressam a GS apresentaram um aumento do diâmetro de 36 % e 41 % de altura aos três anos (JING et al., 2004). Estes resultados demonstram que um único gene pode promover um aumento substancial na produção de madeira. Os *spots* 25 e 101 foram identificados como *glutamate dehydrogenase* (GDH), a enzima está envolvida na fixação do carbono e nitrogênio, catalisando a formação de 2-oxoglutarate + NH₃ + NAD(P)H a partir da L-glutamate e NAD(P)⁺. O *spot* 110 foi identificado como *glutamate ammonia ligase adenyltransferase*, a enzima promove a adenilação e a deadenilação da *glutamine synthetase* durante a fixação do nitrogênio.

4.5.1.3 Metabolismo dos nucleotídeos

Os *spots* 28, 29 e 41 foram identificados como sendo a proteína *UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase*. A enzima é responsável por catalisar a formação de *UDP- glucose* através da fosforilação da *alpha-D-glucose 1-phosphate*. Para a ativação da enzima é requerido um íon metal como o Mg²⁺, sendo regulada por inibição com moléculas livres de UTP. A enzima ocupa um papel central no metabolismo dos açúcares de nucleotídeos, atuando também na síntese de celulose e hemicelulose, os principais compostos da madeira (HIGUCHI, 1997). Por estar envolvida com a síntese da celulose e hemicelulose, o estudo de sua regulação e expressão pode contribuir para o aumento da qualidade e produtividade da madeira. Foi encontrado um volume considerável da proteína (0,6461%) no caule do *Eucalyptus grandis* indicando a sua importância nos mecanismos envolvendo a formação da madeira.

4.5.1.4 Metabolismo dos carboidratos

Foram identificados oito *spots* para este grupo funcional, correspondendo às proteínas: *triosephosphate isomerase cytosolic*, *alcohol dehydrogenase* e *phosphoglycerate kinase*. Os *spots* 4, 5, 67 e 68 foram identificados como *triosephosphate isomerase*, a proteína desempenha um importante papel em várias rotas metabólicas relacionadas à produção de energia. A enzima possui um papel fundamental no metabolismo de todas as células, catalisando a interconversão entre gliceraldeído-3 fosfato e diidroxiacetona fosfato – uma etapa central da glicólise e da gliconeogênese (KNOWLES, 1991). Devido à sua importância na produção de energia para a célula, foi encontrado um volume considerado da proteína (0,8633%), porém apenas 2 tags foram encontrados. O *spot* 70 foi identificado como *alcohol dehydrogenase*, a enzima é encontrada em diversos organismos catalisando a oxidação reversível do etanol para acetaldeído com a redução de NAD (PERSSON et al., 1993). Os *spots* 26, 27 e 66 foram identificados como sendo a proteína *phosphoglycerate kinase*, a enzima catalisa a formação de ATP para ADP em ambas as direções. Ela é encontrada em todos os organismos atuando na segunda fase da glicólise e na fixação de CO₂ durante a fotossíntese (KUMAR et al., 1999). A proteína foi uma das mais abundantes correspondendo a sétima em volume, entretanto apenas um tag correspondente à enzima foi encontrado.

4.5.1.5 Metabolismo secundário

As proteínas *isoflavone reductase* estão envolvidas em respostas a estresse biótico e abiótico (HIBI et al., 1994; BABIYCHUK et al., 1995; PETRUCCO et al., 1996; LERS et al., 1998). A atividade das IFR em mecanismos de defesa confere, durabilidade, longevidade e resistência do alburno de diferentes lenhosas contra o ataque microbiano e também previne o apodrecimento da madeira por fungos (LEWIS; DAVIN, 1999; DIXON, 1999). Nos últimos anos um grande número de genes com significativa homologia a *isoflavone reductase* foram encontrados (GANG et al., 1999)

em diferentes plantas lenhosas e não lenhosas como *Arabidopsis thaliana* (BABYCHUK et al., 1995), álamo (GANG et al., 1998), pereira (KATAYAMA et al., 1993), tabaco (SHOJI et al., 2002) entre outras espécies.

Foram identificados no caule de *Eucalyptus grandis* sete spots (6, 7, 8, 9, 10, 84 e 126) relacionados à proteína *isoflavone reductase* (IFR). A IFR foi uma das proteínas mais abundantes encontradas neste trabalho, correspondendo a segunda em volume total e terceira em intensidade (spot 6). A abundância desta proteína indica a sua importância em processos relacionados à formação da madeira em *Eucalyptus grandis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Mijnsbrugge et al. (2000) no estudo das proteínas do xilema de *Populus trichocarpa*. Em *Pinus pinaster* foram encontradas três isoformas de IFR, sendo a segunda proteína mais intensidade do xilema e terceira em abundância (GION et al., 2005).

4.5.2 Energia

4.5.2.1 Fotossíntese

Estudos de microscopia têm demonstrado a presença de plastídeos em células iniciais do xilema e floema (RESING et al., 2002). Neste grupo foram identificados quatro spots correspondendo às proteínas *ribulose biphosphate carboxylase large chain* e *oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplast*. Os spots 87 e 88 foram identificados como *ribulose biphosphate carboxylase large sub*, responsável pela fixação do carbono durante a fotossíntese. A proteína catalisa duas reações a carboxilação da D-ribulose 1,5-bisphosphate, o primeiro evento da fixação do carbono, bem como a fragmentação oxidativa do substrato pentose. Ambas as reações ocorrem simultaneamente competindo com o mesmo sitio ativo. A *ribulose biphosphate carboxylase* é um heterômero, formado por oito subunidades grandes de 50-55 kDa e oito pequenas subunidades. As grandes têm seu genoma no DNA cloroplástico (rbcL), e as pequenas subunidades no genoma nucleolar (rbcS). A proteína representa mais de 50% das proteínas do cloroplasto, acredita-se que seja a proteína mais abundante do planeta (SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Os spots 80 e 81

foram identificados como *oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplast*. A proteína é localizada no lúmen do tilacóide e atua na proteção de estruturas do fotossistema II relacionados à fotossíntese (SEIDLER, 1996; BRICKER; FRANKEL, 1998). Foi encontrado um volume considerável da proteína no caule (0,2777%), entretanto não foi encontrado nenhum tag.

4.5.2.2 Transporte de elétrons

Neste grupo foram identificados doze *spots* correspondendo às proteínas: *ATP synthase mitochondrial* subunidade beta e alfa, *vacuolar ATP synthase* subunidade alfa, *quinone oxidoreductase*, *malate dehydrogenase*, *aconitate hydratase* citoplasmática e *phosphoglyceromutase*. Os *spots* 22, 74, 75 e 76 foram identificados como subunidade beta e os *spots* 23, 73 e 115 como subunidade alfa da *ATP synthase* mitocondrial. A ATP sintase é um complexo enzimático formado por cinco subunidades, encontrado na membrana interna da mitocôndria e no cloroplasto na membrana tilacóide. O complexo é responsável por catalisar a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese (ZHANG et al., 2006). As subunidades da *ATP synthase* foram uma das mais abundantes proteínas identificadas, possivelmente devido à alta energia requerida durante a elongação e crescimento dos elementos traqueais durante a formação da madeira. O *spot* 35 foi identificado como subunidade alfa da *vacuolar ATP synthase*, enzima heteromultimerica formada por oito subunidades, responsável pela acidificação de compartimentos intracelulares em células eucarióticas (GRUBER et al., 2001; NISHI; FORGAC, 2002). O *spot* 99 foi identificado como *quinone oxidoreductase* e está envolvida em mecanismos relacionados à glicólise, fotossíntese e em respostas a estresse oxidativos, removendo radicais tóxicos. Os *spots* 24, 106 e 107 foram identificados como *malate dehydrogenase* (MDH), é uma proteína encontrada nas mitocôndrias, sendo uma enzima chave no ciclo do ácido cítrico, promovendo a conversão de malato para oxaloacetato. O ciclo do ácido cítrico responde por cerca de dois terços da oxidação total dos compostos de carbono da maioria das células e os seus produtos finais são CO₂ e elétrons de alta energia, os quais passam, via NADH e FADH₂, para a cadeia

respiratória (GIETL, 1992). Devido à sua importância no metabolismo celular foi observado um volume considerável da proteína no caule (0,360%), entretanto apenas três tags foram encontradas. O *spot* 93 foi identificado como *aconitate hydratase* citoplasmática, a enzima está envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico catalisando a transformação reversível do citrato para isocitrato. Em eucariotos são conhecidas duas isoenzimas *aconitate hydratase*, uma encontrada na matriz da mitocôndria e a outra no citoplasma (GRUER et al., 1997). O *spot* 31 foi identificado como *phosphoglyceromutase* é uma metaloenzima dependente de Mg^{2+} , encontrada particularmente em eubactérias e plantas superiores. A enzima catalisa a transferência reversível de um grupo fosfato entre o C_2 e o C_3 do *glycerate* (HUANG et al., 1993).

4.5.2.3 Associado ao ATP

Foram identificados cinco *spots* para este grupo funcional correspondendo às proteínas *NADP dependent malic enzyme*, *succinate dehydrogenase*, *transketolase*, *indolepyruvate oxidoreductase* e *peroxisome biosynthesis* (PAS5). O *spot* 33 foi identificado como *NADP dependent malic*, a enzima está associada à fixação do carbono. A determinação da atividade das enzimas NADPH, através da avaliação do estado redox de um sistema celular, podem ser usados na avaliação de diferentes estresses (BÉRIAULT et al., 2005). O *spot* 37 foi identificado como *succinate dehydrogenase flavoprotein* são proteínas encontradas na mitocôndria formando um complexo enzimático ligado ao ciclo de Calvin, catalisando reações de oxido-redução (EUBEL et al., 2004). O *spot* 96 foi identificado como *transketolase*, a proteína está envolvida no ciclo de Calvin, catalisando a transferência reversível de um grupo *ketol* ($CH_2OH-CO-$) da *ketose phosphate* para um receptor *aldose* (SCHENK et al., 1998). O *spot* 122 foi identificado como *indolepyruvate oxidoreductase*, a enzima realiza a fosforilação do piruvato formando acetil fosfato (KOLAND; GENNIS, 1982). O *spot* 103 foi identificado como *peroxin 6*, a proteína está envolvida com a biogênese e reunião do peroxissoma (VIZEACOMAR et al., 2003)

4.5.2.4 Metabolismo da glicose

Foram identificados 14 *spots* para este grupo funcional correspondendo às proteínas *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase chloroplast*, *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosol*, *enolase*, *fructokinase* e *sucrose synthase*. Os *spots* 11 e 102 foram identificados como *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase chloroplast* (GAPDH), e os *spots* 12, 86 e 113 como *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic*. As angiospermas e algas possuem duas distintas enzimas (GAPDH), uma encontrada no citosol envolvida na glicólise e outra localizada no cloroplasto a qual participa do ciclo de Calvin (MEYER et al., 1994). A translocação e acúmulo da enzima no núcleo da célula atua como um mecanismo de sinalização para a apoptose ou morte celular programada, através da ativação de fatores de transcrição envolvidos no processo (BERRY; BOULTON, 2000). Foi encontrado um volume considerável da proteína (0,6885%) e de transcritos (79) no caule de *Eucalyptus grandis* indicando uma alta atividade metabólica no tecido. Os *spots* 13, 14 e 15 foram identificados como *enolase*, a enzima é encontrada no citoplasma e está envolvida na glicólise, catalisando a interconversão da *phosphoenolpyruvate* e da *phosphoglycerate* (LAL et al., 1991). Por sua importância no ciclo da glicólise a proteína correspondeu ao sexto maior volume (2,4278%) entretanto foi encontrado apenas 4 tags. O estudo do proteoma do arroz demonstrou que na presença de estresse ocorre uma superexpressão desta enzima com a presença de três diferentes *spots* (YAN et al., 2005). Os *spots* 39, 43, 65 e 120 foram identificados como *fructokinase*, a proteína é encontrada em plantas e bactérias. A enzima está envolvida no metabolismo do amido e da glicólise, responsável por catalisar a fosforilação da *fructose* formando a *fructose-6-phosphate* (PLOMION et al., 2000). No caule foi encontrado um alto volume da enzima 1,3982%, indicando a sua importância em mecanismos envolvendo a formação da madeira. Apesar do alto volume da proteína não foi encontrado nenhum tag correspondente. Os *spots* 94 e 95 foram identificados como *sucrose synthase*, a proteína catalisa a síntese de sacarose transferindo um resíduo da *UDP-glucose* para a frutose. A enzima é um tetrâmero de subunidades idênticas de aproximadamente 90 kDa. Na formação das fibras de algodão (*Gossypium hirsutum*) metade das enzimas

sucrose synthase estão altamente associada à membrana plasmática, sugerindo seu envolvimento direto na síntese de celulose ou callose (HIGUCHI, 1997).

4.5.3 Processos celulares

4.5.3.1 Regulação intracelular

A família das proteínas 14-3-3 é encontrada em todos os eucariotos, são altamente conservadas entre as espécies ocorrendo em distintas isoformas (FERL, 1996). Em *Arabidopsis* foram encontradas trinta diferentes isoformas das proteínas 14-3-3, com genes distribuídos em cinco cromossomos (DELILLE et al., 2001). Algumas isoformas são induzidas por patógenos (BRANDT et al., 1992) ou baixas temperaturas (JARILLO et al 1994), altas concentrações de sais reduzem a expressão dos genes relacionados às proteínas 14-3-3 (CHEN et al., 1994). Os resultados sugerem o envolvimento da família das proteínas 14-3-3 na transdução de sinais relacionados ao estresse (LAPOINTE, 2001), podendo interagir com enzimas envolvidas em mecanismos relacionados a respostas de defesa, incluindo *ascorbate peroxidase* (ZHANG et al., 1997b) e *caffeate O-methyl transferase* (ZHANG et al., 1997 a). Em plantas diferentes isoformas da proteína associam-se com fatores de transcrição promovendo a ativação de vários genes ligados ao estresse (FERL, 1996; DRÖGE-LASER et al., 1997; FINNIE et al., 1999). As proteínas 14-3-3 desempenham um papel importante na regulação do metabolismo celular, atuando na regulação da *nitrate reductase*, *sucrose phosphate synthase* (SEHNKE; FERL, 1996; CHUNG et al., 1999; LAPOINTE et al., 2001) e da *ATP synthase* (ZHANG et al., 2006). Os spots 40, 61, 62, 63 e 91 foram identificados como a proteína 14-3-3. A presença de cinco isoformas de proteínas 14-3-3 e sua abundância correspondendo a 12° em volume indicando a importância desta proteína em diferentes eventos envolvendo a formação da madeira. Em *Pinus pinaster* o estudo do proteoma do xilema demonstrou a existência de quatro isoformas da proteína 14-3-3 sendo a décima em abundância (GION et al., 2005).

4.5.3.2 Divisão celular

O *spot* 2 foi identificado como a proteína *cell division cycle protein 48 homolog*. A proteína foi uma das mais abundantes com um volume de 0,5174%.

4.5.3.3 Estresse

As chaperonas são divididas em famílias de acordo com seu peso molecular, devido à característica de respostas a condições de estresses, algumas chaperonas foram classificadas como *heat shock proteins* (HSP). A principal característica de cada família está relacionada com o estado de oligomerização, presença de atividade ATPase e interação com outras chaperonas. As mudanças de conformação realizadas pelas chaperonas regulam certas vias de tradução muitas das quais ligadas à resposta a estresses (HARTI, 1996; BORGES; RAMOS, 2005).

Neste grupo funcional foram identificados 14 *spots* correspondendo às proteínas: *CPN60* mitocondrial, *chaperone dnaK*, *CPN 60* subunidade beta-RuBisCO, *CPN 60* subunidade alfa-RuBisCO, *heat shock protein 70 kDa*, *heat shock protein 80 kDa*, *heat shock protein 90 kDa* e *Luminal binding protein precursor* (BiP). O *spot* (30) foi identificado como *chaperonin CPN60* mitocondrial sendo um precursor da *HSP60* e o (54) como *chaperone protein dnaK*. As chaperonas são moléculas responsáveis pelo dobramento de proteínas recém sintetizadas, muitas das quais tornam-se funcionais após este evento. O *spot* 32 foi identificado como subunidade beta da *CPN 60* e o *spot* 55 como subunidade alfa, as quais pertencem à família das chaperonas (HSP60). As proteínas *CPN 60* ligam-se às subunidades da RuBisCO promovendo a sua reunião e formação. Foram identificadas no caule de *Eucalyptus grandis* diferentes *heat shock protein* (HSP) entre elas a HSP 70 kDa *spots* (48, 49, 50, 56, 77, 118 e 119) sendo uma das proteínas mais abundantes, correspondendo à quarta em volume (3,629%), HSP 80 kDa (*spot* 109) e HSP 90 kDa (*spot* 71). A conservação evolutiva das HSPs sugere que estas proteínas estão envolvidas em processos celulares fundamentais como: modificações pós-tradução, dobramento de proteínas, translocação de proteínas através da membrana, reunião de proteínas oligoméricas, modulação da atividade de

receptores, proteção de mRNA e mecanismos relacionados à proteção ao estresse (LEONE et al., 2000). As HSP são conhecidas por serem altamente expressas em condições de diferentes estresses (COSTA et al., 1998; SÚLE et al., 2004). Canton et al. (2004) demonstrou que as proteínas HSP são muito mais expressas na diferenciação do xilema de pinus do que outros tecidos (raiz, pólen, floema, cambio, brotos e folhas). A síntese também é observada durante o desenvolvimento de plantas jovens. Segundo Le Provost et al. (2003) algumas HSP possivelmente desempenham um papel regulatório durante a formação da madeira, demonstrando a importância destas proteínas no desenvolvimento da madeira secundária (GION et al., 2005). O *spot* 105 foi identificado como sendo a proteína BiP, ela é homologa ao HSP 70, sendo responsável pela translocação de proteínas no retículo endoplasmático.

4.5.3.4 Redox

Foram identificados três *spots* neste grupo funcional correspondendo as proteínas *formate dehydrogenase mitochondrial*, *pyridine nucleotide-disulphide oxidoreduction* e *superoxide dismutase* (SodA). O *spot* 121 foi identificado como *formate dehydrogenase mitochondrial precursor*, a enzima é encontrada na matriz da mitocôndria catalisando a oxidação do *formate* em CO₂ (CABASSA et al., 1998). O *spot* 111 foi identificado como *pyridine nucleotide-disulphide oxido-reduction* é uma coenzima que atua no transporte de átomos de hidrogênio e elétrons em reações de oxidação e redução (KURIYAN, et al., 1991). O *spot* 128 foi identificado como a proteína *superoxide dismutase*, ela está relacionada a processos como transporte de íons inorgânicos e proteção celular através da sua capacidade de catalisar a conversão de O₂⁻ para H₂O₂. A enzima é encontrada em todos os organismos que consomem oxigênio, em plantas pode ser encontrada na mitocôndria, citosol e cloroplasto (SCANDALIOS, 1997). Em *Eucalyptus grandis* ocorre à presença de diferentes isoformas desta enzima (TEIXEIRA et al., 2005). Porém neste estudo foi identificado apenas um *spot* para *superoxide dismutase* apresentando um dos menores volumes correspondendo a 0,0623%.

4.5.4 Transporte

4.5.4.1 Pequenas moléculas de transporte

O *spot* 89 foi identificado como *porina*, são proteínas encontradas na membrana externa das mitocôndrias formando um canal por onde passa pequenas moléculas hidrofóbicas. O canal adota uma conformação aberta quando o potencial da membrana está baixo ou próximo de zero e altera sua conformação para fechado quando atinge 30-40 mV (BENZ, 1994).

4.5.5 Componentes estruturais

4.5.5.1 Metabolismo da lignina

O rota metabólica da lignina é uma das mais estudadas pois envolve a formação do segundo composto mais abundante da madeira, a lignina. Os estudos envolvendo a lignina procuram isolar genes e conhecer a sua regulação e expressão durante a formação da madeira. Plantas transgênicas têm demonstrado o potencial em isolar genes e alterar a sua expressão melhorando a qualidade da madeira e reduzindo custos na produção de papel e celulose (LI et al., 2003). Foram identificados seis *spots* para este grupo funcional, correspondendo às proteínas: *caffeic acid 3-O-methyltransferase*, *phenylalanine ammonia lyase*, *caffeic acid 3-CoA-O-methyltransferase* e *cinnamyl alcohol dehydrogenase*. Os *spots* 19, 20 e 116 foram identificados como sendo *caffeic acid 3 O methyltransferase* (COMT). O COMT catalisa a conversão do *caffeic acid* para *ferulic acid* e a conversão de *5-hydroxyferulic acid* para *sinapic acid* usando *S-adenosyl methionine* (SAM) como doador do grupo metil (PARVATHI et al., 2001). Entre as proteínas do gel ela foi uma das mais abundantes, correspondendo a quinta em volume (2,546%), indicando a sua importância na formação e síntese da lignina. Resultados semelhantes foram encontrados por Mijnsbrugge et al., (2000) ao realizarem a identificação de proteínas de *Populus trichocarpa* constataram que o COMT corresponde a uma das mais abundantes

proteínas do xilema, relacionada diretamente com a formação da madeira. O *spot* 104 foi identificado como *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) é uma enzima chave no metabolismo das plantas catalisando a primeira reação da biossíntese de fenilalanina relacionada a uma ampla variedade de produtos naturais baseados na cadeia dos fenilpropanoides (BATE et al., 1994). O *spot* 64 corresponde ao *caffeic acid 3 CoA O methyltransferase*, responsável por catalisar a metilação do *caffeoyl-CoA* gerando *feruloyl-CoA*, um dos principais precursores da lignina. O *spot* 38 foi identificado como *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD), a qual é a última enzima da via metabólica dos monolignols, responsável pela redução da *hydroxycinnamaldehydes* para *hydroxycinnamyl alcohols*. As plantas demonstram uma grande variedade de enzimas CAD as quais reduzem diferentes aldeídos, muitos dos quais expressos em respostas a infecção de patógenos (WALTER et al., 1988).

4.5.5.2 Citoesqueleto

4.5.5.2.1 Actina

A actina é uma proteína envolvida com a formação dos filamentos que compõem o citoesqueleto. Em plantas existem várias isoformas de actina que estão envolvidas em diferentes funções como o fluxo citoplasmático, divisão celular, determinação da forma celular, gravitropismo e deposição de parede celular (KABSCH; VANDEKERCKHOVE, 1992; HERMAN, 1993). Neste grupo foram identificados seis *spots* correspondendo a actina, profilina e fator despolimerizador da actina (ADF). Os *spots* 44, 45, 83 e 117 foram identificados como actina. Entre as proteínas identificadas no caule de *Eucalyptus grandis* a actina foi a terceira mais abundante, com um volume de 3,6742%, entretanto apenas uma pequena quantidade de tags (15) foi encontrado.

A análise do proteoma de *Pinus pinaster* por Gion et al. (2005), demonstrou que a actina foi a proteína mais expressa, porém, também foi encontrada um número reduzido de ESTs. As proteínas *profilin* (*spot* 1) e a *ADF* (*spot* 46) estão envolvidas com a formação do citoesqueleto de eucariontes incluindo plantas superiores, são responsáveis pela regulação da actina, ao ligar-se a ela inibem a sua

polimerização. Em *Arabidopsis* foi observado que a *profilin* desempenha um importante papel na elongação e forma celular (RAMACHANDRAN et al., 2000).

4.5.5.2.2 Tubulinas

As tubulinas são proteínas, heterodímeras formadas por dois polipeptídeos lobulares fortemente ligados. São os principais componentes dos microtúbulos relacionados com a mitose e a formação do citoesqueleto. Durante a diferenciação dos elementos traqueais os microtúbulos determinam a orientação e posição das microfibrilas de celulose, provavelmente por guiar o movimento da síntese da celulose na membrana plasmática (CHAFFEY, 2000). Foram identificados dois *spots* (79 e 125) neste grupo correspondendo às proteínas alfa e beta tubulina. Os *spots* identificados com estas proteínas apresentaram uma alta intensidade com volume de massa correspondendo a 1,403% para a alfa e 1,134% para a beta. A análise dos transcritos demonstrou que os genes relacionados as tubulinas estão entre os mais expressos, com 35 tags para alfa e 85 tags para beta tubulina.

Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação do proteoma de *Pinus pinaster*, onde as tubulinas corresponderam ao segundo (beta) e ao quarto (alfa) maior volume de proteínas encontradas no xilema, com a presença de múltiplos *spots* (GION et al., 2005). A avaliação do transcriptoma de tecidos que formam a madeira em pinus (WHETTEN et al., 2001) e álamo (PILATE et al., 2004) indicam que estas proteínas são altamente expressas. Os resultados indicam a importância das tubulinas nos processos envolvidos com a formação da madeira.

4.5.6 Metabolismo macromolecular

4.5.6.1 Histona

O *spot* 3 foi identificado como histona H4, elas fazem parte de um pequeno grupo formado por quatro proteínas presentes em grandes quantidades, ricas

em arginina e lisina, estão associadas ao DNA de células eucarióticas formando o nucleossomo que é a unidade da cromatina (THATCHER; GOROVSKY, 1994).

4.5.6.2 Biossíntese de proteína

Os *spots* 53, 51 e 52 foram identificados como *elongation factor 2* (EF 2), fazem parte de um grupo de proteínas específicas requeridas durante a elongação de uma cadeia de polipeptídios durante a tradução. A EF 2 facilita a ligação de um Met-tRNA^{met} inicial com a subunidade 40S do ribossomo (WINTERMEYER; RODNINA, 2000). O *spot* 57 foi identificado como *eukaryotic initiation factor 4A*, a proteína liga-se a estrutura cap dos mRNAs das células eucariontes facilitando a ligação dos ribossomos durante a tradução (THACH, 1992).

4.5.6.3 Ribossomo

Foram identificadas duas proteínas relacionadas ao ribossomo, a proteína *30S ribosomal S5P* (*spot* 36) e a *60S acidic ribosomal P0* (*spot* 129). Os ribossomos são partículas compostas de RNA e proteínas, que se associam com o RNA mensageiro e catalisam a síntese de proteínas em todos os organismos. Aproximadamente 2/3 da massa de um ribossomo consiste de RNA e 1/3 de proteína. As proteínas ribossomais são nomeadas de acordo com a subunidade do ribossomo à que pertencem. As proteínas *S5P* estão associadas à subunidade 30S (*small*) do ribossomo. Na subunidade 60S em eucariotos ocorre a presença de uma família de proteínas conhecidas como P0, P1 e P2 as quais desempenham um importante papel no passo de elongação da síntese de proteínas (REMACHA et al., 1995).

4.5.6.4 Degradação de proteínas

Foram identificadas duas proteínas relacionadas à degradação de proteínas, a subunidade *6B* e a *alpha* do proteassomo. O *spot* 58 foi identificado como

a subunidade 6B e o *spot* 72 subunidade alfa do proteassomo. O proteassomo é um complexo multicatalítico com atividade proteinase envolvido na degradação de proteínas intracelulares. Em eucariontes os proteassomos são compostos por 28 distintas subunidades as quais formam uma estrutura ordenada com a forma de um anel de aproximadamente 700 kDa. Pode ser encontrado no citoplasma ou no núcleo da célula (RIVETT, 1993).

4.5.7 Função não definida

4.5.7.1 Proteínas prováveis

Neste grupo foram identificadas 7 proteínas classificadas como proteínas prováveis: *spot* 34 *Hypothetical protein in nit 5 region orf2*, *spot* 78 *Putative 60S ribosomal protein*, *spot* 92 *Hypothetical GST like protein yfcF*, *spot* 98 *Probable protein disulfide isomerase A6 precursor*, *spot* 108 *Probable tartrate utilization transcriptional regu*, *spot* 21 *Hypothetical UPF0229 protein bll6755* e *spot* 114 *Hypothetical 15 7 kDa protein*.

4.5.7.2 Proteínas que não apresentaram homologia

Os *spots* (90, 123, 172, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 158, 159, 160 e 161) não foram identificados por não apresentarem homologia com nenhuma base de dados. A falta de homologia possivelmente está relacionada ao pequeno número de seqüências de *Eucalyptus* depositadas em bancos de dados internacionais. Em *Pinus pinaster* 16,7% dos *spots* analisados por Gion et al. (2005), também não apresentaram homologia com nenhuma base de dados.

4.6 Correlação entre proteínas e nível de transcritos

A comparação entre mRNA e a abundância de proteínas é necessária para conhecer e elucidar os processos envolvidos na regulação da transcrição e da tradução (GION et al., 2005). A combinação de técnicas de análise da transcrição como a do SAGE e a 2D-PAGE e MS da proteômica, no estudo de uma mesma amostra pode ajudar na compreensão dos mecanismos de regulação e controle envolvidos entre o gene e uma proteína.

A comparação realizada entre o volume das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* com cinco meses e o número total de tags, demonstrados na Figura 19, indicam que não existe uma correlação entre mRNA e proteínas. Não foi encontrada uma linha de tendência entre o volume das proteínas e seus respectivos transcritos. Em algumas proteínas abundantes representadas por mais de um *spot* como a *ATP synthase beta chain*, *fructokinase* entre outras não foi encontrado nenhum tag correspondente. Entretanto proteínas como a *adenosylhomocysteinase* que apresentaram um pequeno volume e um único *spot*, várias tags foram encontradas. A célula possui mecanismos que regulam e equilibram as taxas de síntese e degradação tanto de mRNA como de proteínas conforme as suas necessidades. A falta de correlação entre as proteínas e as tags indica que estas taxas são diferentes para ambas. Baseado nestas observações, a simples quantificação de um determinado transcrito de mRNA não é um bom indicador para estimar a abundância de uma determinada proteína presente no caule de plantas de *Eucalyptus grandis*.

Processos como o controle e regulação da tradução, controle da estabilidade e degradação dos mRNA e modificação pós-tradução não podem ser estimados através da mensuração da abundância de mRNA. Um outro aspecto é que a regulação do nível de transcritos em plantas é um processo altamente dinâmico sofrendo variações durante o desenvolvimento, em respostas a fatores ambientais e ao longo do dia através de mecanismos de regulação gênica como o ciclo circadiano (MILLAR; KAY, 1991). Desta forma as concentrações de mRNA de genes que são regulados por este mecanismo podem sofrer uma grande variação conforme o período do dia. Dependendo

do período do dia que a coleta é realizada diferentes correlações entre proteínas e mRNA podem ser observadas.

Um outro aspecto é que a construção de bibliotecas de mRNA apresenta limitações para algumas seqüências específicas de mRNA devido à características como ausência de cauda poly(A⁺). Entre elas seqüências de mRNA mitocondrial e mRNA cloroplastidial como a subunidade maior da Rubisco (SUGIURA; TAKEDA, 2000). A cauda poly(A⁺) é necessária em estágios iniciais de purificação do mRNA usado na construção de bibliotecas de cDNA/EST (SAMBROOK et al., 1989). Portanto devido a limitação das técnicas usadas na construção de bibliotecas de EST algumas proteínas em particular não apresentam um número de tag correspondente a sua presença na célula, não sendo possível estabelecer uma correlação entre mRNA e proteínas. Diferentes trabalhos têm procurado a existência ou não de uma correlação entre mRNA e proteínas. Dependendo do tecido e a espécie esta correlação de ser alta para alguns genes específicos, porém, baixa quando todos os genes são considerados (ANDERSON; SEILHAMER, 1997; GYGY et al., 1999; CHEN et al., 2002).

Gygy et al. (1999) relataram que a correlação entre mRNA e o nível de proteína em *Saccharomyces cerevisiae* são baixos, insuficientes para determinar o nível de expressão de proteínas a partir da quantificação de transcritos de mRNA. A correlação entre mRNA e proteína é apenas encontrada para alguns genes específicos. Resultados semelhantes foram relatados por Chen et al. (2002) os quais estudaram células de pulmão com tumor por técnicas como *microarray* e 2D-PAGE.

Watson et al. (2003) estimaram que cerca de 50% das proteínas identificadas em diferentes tecidos de *Medicago truncatula* apresentam correlação com seu correspondente nível de mRNA. Em folhas foi observado um predomínio de poucas proteínas no gel, não sendo possível estabelecer uma correlação entre mRNA e proteínas. Os dados demonstram que a correlação é dependente da espécie e tecido.

Gion et al. (2005) encontraram uma correlação positiva, porém, fraca entre mRNA e as proteínas do xilema de *Pinus pinaster*. A comparação foi realizada entre o volume dos spots das proteínas mais abundantes, separadas por 2D-PAGE e seqüenciadas por MS, com uma biblioteca formada por 8429 ESTs de xilema. Os

resultados demonstraram que no xilema de *Pinus pinaster* existe uma tendência entre o aumento na abundância das proteínas e o aumento no nível de mRNA.

Figura 19 – Correlação entre proteínas (volume em porcentagem) e mRNA (quantidade total de tags) para 59 proteínas identificadas por MS

Tabela 5 - Correspondência entre proteínas (volume em porcentagem da proteína) e mRNA (quantidade total de tags)

(continua)

Proteínas identificadas	Nº de spots	Vol.(%) da proteína	Nº de tags	Q. de tags
<i>S adenosylmethionine synthetase</i>	4	7,077	3	31
<i>Isoflavone reductase</i>	7	3,9981	3	135
<i>Actin</i>	4	3,6742	3	15
<i>HSP 70</i>	7	3,629	2	12
<i>Caffeic acid 3 O methyltransferase</i>	3	2,5460	1	6
<i>Enolase</i>	3	2,4278	1	4
<i>Phosphoglycerate kinase cytosolic</i>	3	2,3904	1	1
<i>ATP synthase beta chain mitochondrial</i>	4	1,9679	0	0
<i>Tubulin alpha-2/alpha-4 chain</i>	1	1,4032	3	35
<i>Fructokinase</i>	4	1,3982	0	0
<i>Tubulin beta-2/beta-3 chain</i>	1	1,1346	7	85

Tabela 5 - Correspondência entre proteínas (volume em porcentagem da proteína) e mRNA
(quantidade total de tags)

(conclusão)

Proteínas identificadas	Nº de spots	Vol.(%) da proteína	Nº de tags	Q. de tags
<i>Proteína 14-3-3</i>	5	1,0774	4	12
<i>Triosephosphate isomerase</i>	4	0,8633	1	2
<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>	5	0,6885	5	79
<i>ATP synthase alpha chain mitochondrial</i>	3	0,6868	0	0
<i>UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase</i>	3	0,6461	2	18
<i>2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase</i>	1	0.6180	1	2
<i>Malate dehydrogenase</i>	3	0,360	1	3
<i>Chaperonin CPN60 mitochondrial precursor HSP60</i>	1	0,2485	0	0
<i>Oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplast pr</i>	2	0,2777	0	0
<i>26S protease regulatory subunit 6B homolog</i>	1	0.2031	0	0
<i>Succinate dehydrogenase ubiquinone flavoprotein</i>	1	0.1896	0	0
<i>Chaperone protein dnaK Heat shock protein 70</i>	1	0.1826	3	30
<i>D 3 phosphoglycerate dehydrogenase chloroplast</i>	1	0.1824	0	0
<i>NADP dependent malic enzyme</i>	1	0.1703	1	4
<i>Histone H4</i>	1	0.1661	1	4
<i>Heat shock cognate protein 80</i>	1	0.1613	1	5
<i>RuBisCO subunit binding protein alpha subunit 60 kDa chaperonin</i>	1	0.1543	0	0
<i>Sucrose synthase</i>	2	0,1540	1	20
<i>30S ribosomal protein S5P</i>	1	0.1493	1	5
<i>Transketolase</i>	1	0.1451	0	0
<i>Quinone oxidoreductase</i>	1	0.1256	1	2
<i>Glutamate ammonia ligase adenylyltransferase</i>	1	0.1255	1	22
<i>Proteasome subunit alpha</i>	1	0.1096	0	0
<i>Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1</i>	1	0.1080	1	19
<i>Outer mitochondrial membrane protein porin</i>	1	0.1063	0	0
<i>Luminal binding protein precursor BiP 78 kDa</i>	1	0.1048	0	0
<i>Heat shock protein 90</i>	1	0.1007	0	0
<i>Phenylalanine ammonia lyase</i>	1	0.0908	3	13
<i>60S acidic ribosomal protein P0 Light induced 34</i>	1	0.0865	0	0
<i>Alcohol dehydrogenase</i>	1	0.0775	3	13
<i>Formate dehydrogenase mitochondrial precursor</i>	1	0.0711	0	0
<i>Adenosylhomocysteinase</i>	1	0.0710	3	57
<i>SodA, Superoxide dismutase</i>	1	0.0623	4	17
<i>Pyridine nucleotide-disulphide oxidoredu</i>	1	0.0618	0	0
<i>Peroxisome biosynthesis protein PAS5 Peroxin 6</i>	1	0.0297	0	0

5 CONCLUSÕES

- Entre os métodos de extração de proteínas a fenólica apresentou os melhores resultados, com uma melhor resolução e repetibilidade, removendo os componentes não protéicos que interferem na focalização isoeletrica.
- A separação das proteínas do caule por eletroforese bidimensional demonstrou que ocorre um predomínio de proteínas com pI entre 4-7 e massa molecular entre 14,4 – 97,4 kDa.
- A separação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* usando fitas IPG com gradiente de 4-7 e coloração com coomassie brilhante blue G250 permitiu detectar 438 spots. Entre os diferentes spots foi encontrada uma grande variação de volume.
- As 10 proteínas mais abundantes do caule foram: *S adenosylmethionine synthetase*, *isoflavone reductase*, *actin*, *HSP 70*, *caffeic acid 3 O methyltransferase*, *enolase*, *phosphoglycerate kinase cytosolic*, *ATP synthase beta chain mitochondrial*, *tubulin alpha-2/alpha-4 chain* e *fructokinase*.
- A comparação realizada entre o volume de 59 proteínas e os seus respectivos transcritos demonstrou que não existe correlação entre mRNA e as proteínas do caule.
- A combinação da 2D-PAGE e MS possibilitaram uma rápida e precisa separação e identificação das proteínas do caule de *Eucalyptus grandis* que são diferencialmente expressas durante a fase de crescimento de cinco meses.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins** : fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos, Viçosa : UFV, 1998. 574p.
- ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual review of plant physiology**, Palo Alto, v.38, p. 179-204, 1987.
- ALLONA, I.; QUINN, M.; SHOOP, E.; SWOPE, K.; CYR, S. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 9693-98, 1998.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, London, v. 25, p.3389-3402, 1997.
- ANDERSON, L; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundance in human liver. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 533-537, 1997.
- Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796–815, 2000.
- ASHCROFT, A. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural product reports**, London, v. 20, p. 202-215, 2003.
- BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE', D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamine. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 26224–26231, 1995.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. S. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic acids research**, London, v. 1, 33, p.154-9, 2005.
- BATE, N. J.; ORR, J.; NI, W.; MEROMI, A.; NADLER-HASSAR, T.; DOERNER, P. W.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J.; ELKIND, Y. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 7608-7612, 1994.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engeneering and impact on pulping. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, Philadelphia, v. 38, p. 305-350, 2003.

BENZ, R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1197, p. 167-196, 1994.

BÉRIAULT, R.; CHÉNIER, D.; SINGH, R.; MIDDGAUGH, J.; MAILLOUX, R.; APPANNA, V. Detection and purification of glucose 6-phosphatedehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 26, p. 2892–2897, 2005.

BERRY, M. D.; BOULTON, A. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, New York, v. 60, p.150-154, 2000.

BICHET, A.; DESNOS, T.; TUNER, S.; GRANDJEAN, O.; HÖFTE, H. Botero1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 25, p. 137-148, 2001.

BOERJAN, W. Biotechnology and the domestication of forest trees. **Current opinion in biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p.159-166, 2005.

BOLWELL, G. P. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **International Review of Cytology**, New York, v. 146, p. 261-323, 1993.

BONNIE S. W.; VICTOR, S. A.; LIANGJIANG, W.; LLOYD, W. S. Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p.1104–1123, 2003.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, Hilversum, v. 12, p. 257-261, 2005.

BRACELPA. **Avaliação do Setor de Celulose e papel**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDT, J.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; VAD, K.; GREGERSEN, P. L.; COLLINGE, D. B. A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 2, p. 815-820, 1992.

BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. M. The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assessment. **Photosynthesis research**, Boston, v.56, p.157-173, 1998.

BROOKER, M. I. H. A new classification of genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian System Botany**, Sidney, v.13, p.79-148, 2000.

BRUNNER, A. M.; BUSOV, V. B.; STRAUSS, S. H. Poplar genome sequence functional genomics in an ecologically dominant plant species. **Trends in plant science**, Oxford, v. 9, p.49-56, 2004.

CABASSA, C. H.; BRETTEVILLE, F. A.; MOREAU, F.; VIRVILLE, J. D.; RÉMY, R.; FRANCS, C. C. Small Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves. **Plant Physiol**, Lancaster v. 116, p. 627-635, 1998.

CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, SANTUCCI L, GHIGGERI GM, CARNEMOLLA B, ORECCHIA P, ZARDI L, RIGHETTI PG. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25. p.1327-1333, 2004.

CANTON, F.; LE PROST, G.; GARCIA, V.; BARRE, A.; FRIGERIO, J. M. Sustainable Forestry, Wood Products and Biotechnology. **BIOFOR Proceedings**, p.333-347, 2004.

CARPITA, N. C.; DEFERNEZ, M.; FINDLAY, K.; WELLS, B.; SHOUE, D.A.; CATCHPOLE, G.; WILSON, R. H.; MCCANN, M. C. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. **Plant physiology**, Lancaster, v.127, n.2, p.551-65, oct. 2001.

CARPITA, N.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 1–5, 2001.

CASSAB, G. I. Plant cell wall proteins. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p.281-309, 1998.

CHAFFEY, N.; CHOLEWA, E.; REGAN, S.; SUNDBERG, B. Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. **Physiologia plantarum**, Lund, v.114, n.4, p.594-600, apr, 2002.

CHAFFEY, N. Microfibril orientation in wood cells: new angles on na old topic. **Trends in plant science**, Oxford, v. 5, p. 360-362, 2000.

CHAFFEY, N. **Cell and Molecular Biology of Wood Formation**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 384p.

CHEN, G.; TAREK G. GHARIB, T. G.; HUANG, C. C.; TAYLOR, J. M. G.; MISEK, D. E.; KARDIA, S. L. R.; GIORDANO, T. J.; IANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. M.; BEER, D. G. Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, p.304-314, 2002.

CHEN, Z.; FU, H.; LIU, D.; CHANG, P. F.; NARASIMHAN, M.; FERL, R.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homolog that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein kinase C. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 5, p. 729-740, 1994.

CHUNG, H. J.; SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, p. 367-371, 1999.

COSTA, P.; BAHRMAN, N.; FRIGERIO, J. M.; KREMER, A.; PLOMION, C. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 38, p. 587-596, 1998.

COSTA, P.; PIONNEAU, C.; BAUW, G.; DUBOS, C.; BAHRMANN, N.; KREMER, A.; FRIGERIO, J. M.; PLOMION, C. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v.20, p.1098-108, 1999.

CRESSWELL, R. D.; BOURLAY, M.; FLANCLET, A. vegetative propagation of *Eucalyptus*. **Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht: Martinus Nüyhoff, 1985. cap.6, p.45-72.

CRUZ, N. H.; MOREIRA-FILHO, C. A.; SILVA, M. E. Avaliação do impacto econômico das biotecnologias no setor de celulose e papel. **Papel e Celulose**, São Paulo, p. 1-9. 1988.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Tradução de Caruso Catena. São Paulo: Livraria Roca, 1986. 304 p.

DAMERVAL, C.; VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling protein. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 53-54, 1986.

DASS, C. Introduction to mass spectrometry. In: **Principles and practice of biological mass spectrometry**. Amsterdam: Wiley, 2001. Cap. 1, p. 1-9.

DAVID, R. GANG, D. R.; et al. Evolution of plant defense mechanisms relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoreosinollariciresinol and isoflavone reductases. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 7516–7527, 1999.

DELILLE, J. M.; SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant physiology**, Lancaster, v. 126, p. 35-38, 2001.

DEMURA, T.; TASHIRO, G.; HORIGUCHI, G.; KISHIMOTO, N.; KUBO, M.; MATSUOKA, N.; MINAMI, A.; NAGATA-HIWATASHI, M.; NAKAMURA, K.; OKAMURA, Y.; SASSA, N.; SUZUKI, S.; YAZAKI, J.; KIKUCHI, S.; FUKUDA, H. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 15794-15799, 2002.

DIXON, R. A. **Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives**. Amsterdam :Elsevier, 1999, 823p.

DOBLIN, M. S.; KUREK, I.; JACOB-WILK, D.; DELMER, D. P. I. Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. **Plant & cell physiology**, Kyoto, v. 43, p. 1407-1420, 2002.

DROGE-LASER, W.; KAISER, A.; LINDSAY, W. P.; HALKIER, B. A.; LOAKE, G. J.; DOERNER, P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defences. **The European Molecular Biology Organization journal**, Oxford, v. 16, p. 726-738, 1997.

DUDLEY, B. F.; WINSTON, G. W. P-nitrosophenol reduction by liver cytosol from ADH-positive and -negative deermice (*Peromyscus maniculatus*). **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 316, p. 879-85, 1995.

DUNN, M. J., **Proteins**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 407.p.

DWORZANSKI, J. P.; DESHPANDE, S. V.; CHEN, R.; JABBOUR, R. E.; SNYDER, A. P.; WICK, C. H.; LI, L. Mass spectrometry-based proteomics combined with bioinformatic tools for bacterial classification. **Journal of proteome research**, v.5, n., n.1, p.76-87 JAN 2006

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C., VAN WYK, G. **Domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 308p.

ELLIS, C.; KARAFYLLIDIS, I.; WASTERNAK, C.; TURNER, J. G. The *Arabidopsis* mutante *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. **The Plant cell**, Rockville, v. 14, p. 1557-1566, 2002.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**; tradução Bertha Lange de Morretes. 3.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1981, 293p.

EUBEL, H.; HEINEMEYER, J.; SUNDERHAUS, S.; BRAUN, H. P. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 937-942, 2004.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, Washington, v. 246, p. 64-71, 1989.

FERL, R. J. 14-3-3 proteins and signal transduction. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 49-73, 1996.

FERL, R. J.; MANAK, M. S.; REYES, M. F. Protein family review: The 14-3-3s. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2002.

FERRY-DUMAZET, H.; HOUEL, G.; MONTALENT, P.; MOREAU, L.; LANGELLA, O.; NEGRONI, L.; VICENT, D.; LALANNE, C.; DANIVAR, A.; PLOMION, C.; ZIVY, M.; JOETS, J. PROTICdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 2069-2081, 2005.

FINNIE, C; BORCH, J; COLLINGE, D. B. 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 40, p. 545-554, 1999.

FRY, S.C. Cell Wall-Bound Proteins. In: DEY, P.; HARBORNE, J.; ROGERS, L. (Eds.) **Methods in Plant Biochemistry**, Wales: ACADEMIC PRESS, 1991. cap. 11, p. 307-331.

FUKUDA, H. Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 299-325, 1996.

FUKUDA, H. Tracheary element differentiation. **The Plant cell**, Rockville, v. 9, p. 147-156, 1997.

GANG, D. R.; FUJITA, M.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Lignin and Lignan Biosynthesis. In: LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. (Ed). **Symposium Series**, Washington, Am. Chem. Soc, 1998. cap. 1, v. 697, p. 1-27.

GARAVELLI JS, HOU Z, PATTABIRAMAN N, STEPHENS RM. I. The RESID data of protein structure modifications and the NRL-3D sequence-structure database. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 29, p. 199-201, 2001.

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1100, p. 217-234, 1992.

GION, J. M.; LALANNE, C.; LE PROVOST, G.; FERRY-DUMAZET, H.; PAIVA, J.; CHAUMEIL, P.; FRIGERIO, J. M.; BRACH, J.; BARRE, A.; DARUVAR, A.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; SOMMERER, N.; NEGRONI, L.; PLOMION, C. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.3731-3751, 2005.

GIORGIANNI, S. B. Proteoma analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in analytical chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.3665-3685, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H. D. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 24, p. 1074-1078, 1994.

GRIFFIN, T. J. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 1, p. 323-333, 2002.

GRIFFIN, T. J.; AEBERSOLD, R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.49, p.45497-500, 2001.

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

GRUBER, G.; WIECZOREK, H.; HARVEY, W.R.; MULLER, V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. **The Journal of experimental biology**, London, v. 204, p. 2597-2605, 2001.

GRUER, M. J.; ARTYMIUK, P. J.; GUEST, J. R. The aconitase family: three structural variations on a common theme. **Trends in biochemical sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 3-6, 1997.

GUERREIRO, N.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n. 4, p. 506-516, 1997.

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

GYGI, S. P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current opinion in chemical biology**, Amsterdam, v. 4, p. 489-494, 2000.

HARTI, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, London, v. 381, p. 571-580, 1996.

HAWKINS, S.; BOUDET, A.; GRIMA-PETTENATI, J. Characterisation of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene expression patterns by in situ hybridisation in *Eucalyptus gunnii* Hook. plantlets. **Plant science**, Shannon, v. 164, n. 2, p. 165-173, 2003.

HERMAN, I. M. Actin isoforms. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, v. 5, p. 48-55, 1993.

HERTZBERG, M.; ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; ANDERSSON, A.; ERLANDSSON, R.; BLOMQUIST, K.; BHALERAO, R.; UHLEN, M.; TEERI, T. T.; LUNDEBERG, J.; SUNDBERG, B.; NILSSON, P.; SANDBERG, G. A transcriptional roadmap to wood formation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, n.25, p. 14732-7, Dec, 2001.

HIBI, N.; HIGASHIGUCHI, S.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 723-735, 1994.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and Molecular Biology of Wood**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1997. 351p.

HILLENKAMP, F.; KARAS, R. C.; BEAVIS, B. T. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, Washington, v. 63, p. 1193-1203, 1991.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture of growing plants without soil**, California: Berkley, 1950. 347p.

HO, C. L.; NOJI, M.; SAITO, M.; SAITO, K. Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. Crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 1, n. 274, Jan, p. 397-402, 1999.

HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, J. Y.; TSAI, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n. 9, p. 675-680, 1998.

HU, W. J. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 808-812, 1999.

HUANG, Y.; BLAKELEY, S. D.; MCALEESE, S. M.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; DENNIS, D. T. Higher-plant cofactor-independent phosphoglyceromutase: purification, molecular characterization and expression. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 23, p. 1039-1053, 1993.

HUNTLEY, S. K.; ELLIS, D.; GILBERT, M.; CHAPPLE, C.; MANSFIELD, S. D. Significant increases in pulping efficiency in C₄H-F₅H-transformed poplar improved chemical savings and reduced environmental toxins. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 51, p. 6178-6183, 2003.

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

IBARROLA, N.; KALUME, D. E.; GRONBORG, M.; IWAHORI, A.; PANDEY, A.; A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using stable isotope labeling in cell culture. **Analytical chemistry**, Washington, v. 75, p. 6043-6049, 2003.

JARILLO, J. A.; CAPEL, J.; LEYVA, A.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; SALINAS, J. Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 25, p. 693-704, 1994.

JING, Z. P.; GALLARDO, F.; PASCUAL, M. B.; SAMPAIO, R.; ROMERO, J.; TORRES DE NAVARRA, A.; CANOVAS, D. M. Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. **The New phytologist**, London, v. 164, p. 137-145, 2004.

KABSCH, W.; VANDEKERCKHOVE, J. Structure and function of actin. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, California, v. 21, p. 49-76, 1992.

KATAYAMA, T.; DAVIN, L. B.; CHU, A.; LEWIS, N. G. An extraordinary accumulation of (–)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. **Phytochemistry**, New York, v. 31, p. 3875-3881, 1992.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 283-307, 1993.

KEEGSTRA, K.; RAIKHEL, N. Plant glycosyltransferases. **Current opinion in plant biology**, London, v. 4, p. 219-224, 2001.

KIRK, N.; COWAN, D. Optimising the recovery of recombinant thermostable proteins expressed in mesophilic hosts. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 177-84, 1995.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. 2-Dimensional electrophoresis of proteins - an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, n. 16, p. 1034-1059, 1995.

KOLAND, J. G.; GENNIS, R. B. Identification of an active site cysteine residue in *Escherichia coli* pyruvate oxidase. **Biological chemistry**, Berlin, v. 257, n. 11, p. 6023-6027, 1982.

KNOWLES, J. R. Enzyme catalysis: not different, just better. **Nature**, London, v. 350, p. 121-124, 1991.

KRISHNA, R. G.; WOLD, F. Post-translational modification of proteins. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, New York, v. 67, p. 265-98, 1993.

KUMAR, S.; MA, B.; TSAI, C. J.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. **Cell biochemistry and biophysics**, Totowa, v.31, p. 141-164, 1999.

KURIYAN, J.; KRISHNA, T. S.; WONG, L.; GUENTHER, B.; PAHLER, A.; WILLIAMS, J. R. C. H.; MODEL, P. Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. **Nature**, London, v. 352, p. 172-174, 1991.

KUSTER, B.; MANN, M. Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry. **Current opinion in structural biology**, London, v.8, p.393-400, 1998.

LACHAUD, S.; CATESSON, A. M.; BONNEMAIN, J. L. Structure and functions of the vascular cambium. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, Paris, v. 322, p. 633-650, 1999.

LACOMBE, E.; VAN-DOORSSELAERE, J.; PIQUEMAL, J.; GOFFNER, D.; POEYDOMENGE, O.; BOUDET, A. M.; GRIMA-PETTENATI, J. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v.3, n.3, p. 429-41, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAL, S. K.; JOHNSON, S.; CONWAY, T.; KELLEY, P. M. Characterization of a maize cDNA that complements an enolase-deficient mutant of *Escherichia coli*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 16, p. 787-795, 1991.

LAPOINTE, G.; LUCKEVICH, M. D.; CLOUTIER, M.; SEGUIN, A. 14-3-3 gene family in hybrid poplar and its involvement in tree defence against pathogens. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v. 52, p. 1331-1338, 2001.

LEONE, A. et al. Membrane cell wall associated heat shock proteins in two genotypes of barley seedling. **Plant biosystems**, Bologna, v. 134, p. 171-178, 2000.

LE PROVOST, G.; PAIVA, J.; POT, D.; BRACH, J.; PLOMION, C. Seasonal variation in transcript accumulation in wood-forming tissues of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) with emphasis on a cell wall glycine-rich protein. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 820-830, 2003.

LEITE, N. B. Avanços da silvicultura brasileira são significativos. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 5, p.12-18, jul-dez, 2005.

LEERS, A.; BURD, S.; LOMANIEC, E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 36, p. 847–856, 1998.

LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B. Lignans: biosynthesis and function. In: D.H.R. Barton, K. Nakanishi and O. Meth-Cohn (Eds) **Comprehensive Natural Products Chemistry**, Amsterdam: Elsevier, 1999, 850p.

LI, L.; ZHOU, Y.; CHENG, X.; SUN, J.; MARITA, J. M.; RALPH, J.; CHIANG, V. L. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 4939-4944, 2003.

LI, X.; CORDERO, I.; CAPLAN, J.; MOLHOJ, M.; REITER, W. D. Molecular analysis of 10 coding regions from *Arabidopsis* that are homologous to the MUR3 xyloglucan galactosyltransferase. **Plant physiology**, Lancaster, v. 134, p. 940-950, 2004.

LOLIS, E.; ALBER, T.; DAVENPORT, R. C.; ROSE, D.; HARTMAN, F. C.; PETSKO, G. A. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. **Biochemistry**, Washington, v. 29, p. 609-6618, 1990.

LOPEZ, M. F. Proteome Analysis I. Gene Products Are Where the Biological Action Is. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 191-202, 1999.

MAGUIRE, B. A.; ZIMMERMANN, R. A. The ribosome in focus. **Cell**, Cambridge, v. 104, p. 813-816, 2001.

MANN, M.; WILM, M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. **Trends in biochemical sciences**, Amsterdam, v.6, p.219-24, 1995.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C. A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437-473, 2001.

MANN, M.; STEEN, H. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v.5, p.699-711, 2004.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução à engenharia genética em plantas. Tradução de J. L. de AZEVEDO, M. L. R. AGUIAR-PERECIN e N. A. VELLO. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.

MCDUGALL, J.; GORDON, J. A comparison of proteins from the developing xylem of compression and non-compression wood of branches of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) reveals a differentially expressed laccase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.1395-1401, 2000.

MENG, H.; CAMPBELL, W. H. Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid O-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 38, p. 513-520, 1998.

MEYER, G. G.; SCHNARRENBERGER, C.; CERFF, R.; MARTIN, W. Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD(+)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris*. **Plant Molecular Biology**, Boston, n. 26, v. 4, p. 1155-66, 1994.

MEYEROWITZ, E. M. Plants, Animals and the Logic of Development. **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v.15, n.12, p. 65-68, 1999.

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

MILLAR, A. J.; KAY, S. T. Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 541-550, 1991.

MILIONI, D.; SADO, P. E.; STACEY, N. J.; DOMINGO, C.; ROBERTS, K.; MCCANN, M. C. Differential expression of cell wall related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 221-238, 2001.

MUSHEGIAN, A. R.; KOONIN, E. V. A Minimal Gene Set for Cellular Life Derived by Comparison of Complete Bacterial Genomes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, n.19, p.10268-10273, 1996.

NATERA, S. H. A.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 9, p. 995-1009, 2000.

NEUHOFF, V. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, p. 427-448, 1985.

NISHI, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 3, p. 94-103, 2002.

O'FARREL, P. H. High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 325-333, 2000.

OLIVEIRA, P.; LINDBLAD, P. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEMS microbiology letters**, v. 251, n. 1, p.59-66, 2005.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, London, v. 405, p. 837-845, 2000.

PALSSON, B. In silico biology through omics. **Nature biotechnology**, New York v. 20, n. 7, p. 649-650, 2002.

PARKER, K. C.; GARRELS, J. I.; HINES, W.; BUTLER, E. M.; MCKEE, A. H.; PATTERSON, D.; MARTIN, S. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 1920-1932, 1998.

PARVATHI, K.; CHEN, F.; GUO, D.; BLOUNT, J. W.; DIXON, R. A. Substrate preferences of O-methyltransferase in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 25, p. 193-202, 2001.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, New York, v. 33, p. 311- 323, 2003

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

PENG, J.; ELIAS, J. E.; THORREN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S.P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) for large-scale protein analysis the yeast proteome. **Journal of proteome research**, Washington, v. 2, p. 43-50, 2003.

PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **Journal of mass spectrometry**, Chichester, v. 36, p.1083-1091, 2001.

PERSSON, B.; HALLBORN, J.; WALFRIDSSON, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; KERANEN, S.; PENTTILA, M.; JORNVALL, H. Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 324, p. 9-14, 1993.

PETRUCCO, S.; BOLCHI, A.; FORONI, C.; PERCUDANI, R.; ROSSI, G.L.; OTTONELLO, S. A maize gene encoding an NADPH binding enzyme highly homologous to isoflavone reductases is activated in response to sulfur starvation. **The Plant cell**, Rockville, v. 8, p. 69-80, 1996.

PILATE, G.; DEJARDIN, A.; LAURANS, F.; LEPLE, J. C. Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. **The New phytologist**, London, v. 164, p. 63-72, 2004.

PILATE, G.; GUINEY, E.; HOLT, K.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C.; LEPLÉ, J-C.; POLLET, B.; MILA, I.; WEBSTER, E. A.; MARSTORP, H. G.; HOPKINS, D. W.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W.; SCHUCH, W.; CORNU, D.; HALPIN, C. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. **Nature biotechnology**, New York, v.20, p.607-612, 2002.

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p. 16-22, 2003.

PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BRACH, J.; COSTA, P.; BAILLEERES, H. Compression Wood-Responsive Proteins in Developing Xylem of Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, p. 959-969, 2000.

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

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

POTTS, B. M.; WILTSSHIRE, R. J. E. Eucalypt genetics and genecology. In: WILLIAMS, J. E.; WOINARSKI, J. C. Z. (Eds.) **Eucalypt ecology**: individuals to ecosystems, Cambridge : University Press, 1997. cap. 2, p.56-91

QUOIRIN, M.; VIEIRA, R. C. Rhizogenesis and nodule formation from callus of *Eucalyptus grandis* and *E.grandis* X *E.urophylla*. **Arquivos de biologia e tecnologia**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 793-798, 1995.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. **Methods in molecular biology**, Totowa, v. 112, p. 9-19, 1999.

RAMACHANDRAN, S.; CHRISTENSEN, H. E. M.; ISHIMARU, Y.; DONG, C. H.; CHAOMING, W. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, Lancaster, v.124, p. 1637–1647, 2000.

RANIK, M.; CREUX, N.; MYBURG, A. A. Transcriptome analysis of xylogenesis in *Eucalyptus* using Cdna-aflp and Li-Cor automated DNA analysers. In: Plant & Animal Genomes XII Conference, 2004, San Diego. **Abstract**, Conference, Jan. 10-14, San Diego, CA. , 2004. Abstract P610.

READ, S. M.; BASIC, T. Prime time for cellulose. **Science**, Washington, v. 295, p. 59-60, 2002.

ROBERTS, K.; McCANN, M. Xylogenesis: the birth of a corpse. **Current opinion in plant biology**, London, v. 3, p. 517-522, 2000.

ROBERT, S.; BICHET, A.; GRANDJEAN, O.; KIERZKOWSKI, D.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B.; PELLETIER, S.; HAUSER, M. T.; HOFTE, H.; VERNHETTES, S. An *Arabidopsis* endo-1,4- β -D-Glucanase involved in cellulose synthesis undergoes regulated intracellular cycling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3378-3389, 2005.

REMACHA, M.; JIMENEZ-DIAZ, A.; SANTOS, C.; BRIONES, E.; ZAMBRANO, R.; RODRIGUEZ, G. M. A.; GUARINOS, E.; BALLESTA, J. P. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. **Biochemistry and cell biology**, Ottawa v. 73, p. 959-968, 1995.

RESING, K. H.; SAMUELS, A. L.; SAVIDGE, R. A. Ultrastructure of vascular cambial cell cytokinesis in pine seedlings preserved by cryofixation and substitution. **Protoplasma**, Sidney, v. 220, p.39-49, 2002.

RIVETT, A. J. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. **The Biochemical journal**, London, v. 291, p. 1-10, 1993.

ROBERTS, K.; McCANN, M. Xylogenesis: the birth of a corpse. **Current opinion in plant biology**, London, v. 3, p. 517-522, 2000.

SACHS, T. Cell polarity and tissue patterning in plants. **Development**, Cambridge, v. 1, p. 83-93, 1991.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 17, p. 11-17, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS T. Construction and analysis of cDNA libraries. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERUSON, M. (Eds). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. p. 8.1–8.86.

SAMUGA, A; JOSHI, C. P. A new cellulose synthase gene (*PtrCesA2*) from aspen xylem is orthologous to *Arabidopsis AtCesA7* (*irx3*) gene associated with secondary cell wall synthesis. **Gene**, Amsterdam, v. 296, p. 37-44, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in genetics**, San Diego, v. 28, p. 1-41, 1990.

SCANDALIOS, J. G. **Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defense**, Harbor :Cold Spring Laboratory Press, 1997. 890p.

SCHENK, G.; DUGGLEBY, R. G.; NIXON, P. F. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 30, p. 1297- 1318, 1998.

SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. Plant metabolism enzyme regulation by 14-3-3 proteins. **Current Biology**, London, v. 6, p. 1403-1405, 1996.

SEIDLER, A. The extrinsic polypeptides of Photosystem II. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1277, p. 35-60, 1996.

SGANGA, M. W.; AKSAMIT, R. R.; CANTONI, G. L.; BAUER, C. E. Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 6328-6332, 1992.

SHOJI, T.; WINZ, R.; IWASE, T.; NAKAJIMA, K.; YAMADA, Y.; HASHIMOTO, T. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 50, p. 427–440, 2002.

SHOWALTER, A. M. Struture and function of plant cell wall proteins. **The Plant cell**, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.

SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. California: Academic Press, 1995. 161p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Eucalipto no Brasil e no mundo** Disponível em: <<http://www.floresta.ipef.br>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Nature**, London, v. 337, p. 229-234, 2002.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature reviews**, London, v. 5, p. 699-771, 2004.

STERKY, F.; REGAN, S.; KARLSSON, J.; HERTZBERG, M.; ROHDE, A.; HOLMBERG, A.; AMINI, B.; BHALERAO, R.; LARSSON, M.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; SANDBERG, G.; OLSSON, O.; TEERI, T.T.; BOERJAN, W.; GUSTAFSSON, P.; UHLEN, M.; SUNDBERG, B.; LUNDEBERG, J. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5, 692 expressed sequence tags. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 22, p.13330-13335, 1998.

STRASBURGER, E. **Tratado de Botánica**. 8° ed. Barcelona: Española Ediciones Omega, 1994, 1098p.

STREET, H. E. **Fisiologia das angiospermas: crescimento e desenvolvimento**, São Paulo: Polígono da Universidade de São Paulo, 1974. 315p.

STRITTMATTER, E. F.; FERGUSON, P. L.; TANG, K.; SMITH, R. D. Proteome analyses using accurate mass and elution time peptide tags with capillary LC time-of flight mass spectrometry. **American Society for Mass Spectrometry**, Weinheim, v.14, p.980-991, 2003.

SUGIURA, M; TAKEDA, Y. Nucleic acids. In B BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Rockville : American Society for Plant Physiologists, 2000. cap.3, p. 298–300.

SULE, A.; VANROBAEYS, F.; HAJOS, G.; VAN BEEUMEN, J.; DEVREESE, B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 1853-1863, 2004.

TAYLOR, N. G.; HOWELLS, R. M.; HUTTLY, A. K.; VICKERS, K.; TURNER, S. R. Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 1450-1455, 2003.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVETE, L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS-PINHEIRO, M. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 529-538, 2005.

THACH, R. E. Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene expression. **Cell**, Cambridge, v. 68, p.177-180, 1992.

THATCHER, T. H.; GOROVSKY, M. A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 22, p. 174-179, 1994.

TURNBULL, J. W. *Eucalyptus* plantations. **New Forests**, Ugalde, n. 17, v. 1-3, p. 37-52, 1999.

TURNER, S. R.; TAYLOR, N.; JONES, L. Mutations of the secondary cell wall. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 209-219, 2001.

TUSKAN, G. A.; DIFAZIO, S. P.; TEICHMANN, T. Poplar genomics is getting popular the impact of the poplar genome project on tree research. **Plant Biology**, Palo Alto, v. 6, p.2-4, 2004.

VAN WIJK, K.J. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. **Plant Physiology**, Lancaster, v.126, n.2, p.501-508, 2001.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial Analysis of Gene-Expression. **Science**, Washington, v.270, n.5235, p.484-487, 1995.

VELCULESCU, V.E.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Analysing Uncharted Transcriptomes With Sage. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.16, n.10, p.423-425, 2000.

VIZEACOMAR, F. J.; TORRES-GUZMAN, J. C.; TAM, Y. Y.; AITCHISON, J. D.; RACHUBINSKI, R. A. YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Cell Biology Organization**, Stuttgart, v. 161, p. 321-332, 2003.

YE, Z. H.; KNEUSEL, R. E.; MATERN, U.; VARNER, J. E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1427-1439, 1994.

YE, H. Z. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 183-202, 2002.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, Weinheim, n. 5, v. 1, p. 235-44, 2005.

YATES III, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. **Journal of mass spectrometry**, Chichester, v. 33, p.1-19, 1998.

WALTER, M. H.; GRIMA-PETTENATI, J.; GRAND, C.; BOUDET, A. M.; LAMB, C. J. Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 5546-5550, 1988.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WATSON, B. S.; ASIRVATHAM, V. S.; WANG, L.; SUMMER, L. W. Mapping the proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology**, Lancaster, v.131, p. 1104-1123, 2003.

WECKWERTH, W.; LOUREIRO, M. E.; WENZEL, K.; FIEHN, O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n. 20, p. 7809-14, 2004.

WHETTEN, R.; SUN, Y. H.; ZHANG, Y.; SEDEROFF, R. Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 275-291, 2001.

WIJK, K. J. V. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, n. 2, p. 501-508, 2001.

WINTERMEYER, W; RODNINA, M. V. Translational elongation factor G: a GTP-driven motor of the ribosome. **Essays in biochemistry**, London, v. 35, p. 117-129, 2000.

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**, Newcastle, v. 13, p.19-50, 1995.

ZHANG, H.; WANG, J.; GOODMAN, H. M. An *Arabidopsis* gene encoding a putative 14-3-3 interacting protein, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1353, p. 199-202, 1997 (a).

ZHANG, H.; WANG, J.; NICKEL, U.; ALLEN, R. D.; GOODMAN, H. M. Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 34, p. 967-971, 1997 (b).

ZHANG, X.; TAKANO, T.; LIU, S. Identification of mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*RmtATP6*) expressed in response to salts and osmotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 193-200, 2006.

ZHONG, R.; PENA, M. J.; ZHOU, G. K.; NAIRN, C. J.; WOOD-JONES, A.; RICHARDSON, E. A.; MORRISON, W. H.; DARVILL, A. G.; YORK, W. S.; YE, Z. H. *Arabidopsis* fragile fiber8, which encodes a putative glucuronyltransferase, is essential for normal secondary wall synthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3390-3408, 2005.