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

**Identificação de proteínas expressas na região cambial de
Eucalyptus grandis, por espectrometria de massa**

Karem Guimarães Xavier Meireles

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2006**

Karem Guimarães Xavier Meireles
Engenheiro Florestal

Identificação de proteínas expressas na região cambial de
***Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa**

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)
DI VI SÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/ USP

Meireles, Karem Guimarães Xavier

Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa / Karem Guimarães Xavier Meireles. - - Piracicaba, 2006.
117 p. : il.

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

1. Eletroforese em gel 2. Espectrometria de massas 3. Eucalipto 4. Madeira
5. Proteínas de plantas I. Título

CDD 634.9734

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

DEDICATÓRIA

Eduardo,

Empresto os versos sempre deliciosos do Vinícius e Tom, pra te dizer:

“... Chega de saudade, a realidade é que sem ele não há paz, não há beleza
É só tristeza e a melancolia, que não sai de mim, não sai
Mas, quando ele voltar, ele voltar
Que coisa linda, que coisa louca
Pois há menos peixinhos a nadar no mar
Do que os beijinhos que eu darei na tua boca
Dentro dos meus braços, os abraços hão de ser
Milhões de abraços apertado assim, colado assim, calado assim
Abraços e beijinhos e carinhos sem ter fim
Que é pra acabar com esse negócio de você viver sem mim
Não quero mais esse negócio de você longe de mim...”

Picu, tudo foi possível porque você sonhou o meu sonho, e o apoiou incondicionalmente. Sinto-me privilegiada em tê-lo ao meu lado, pro que der e vier. Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Suporte técnico:

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na pessoa do Dr. Isaías Olívio Geraldi, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, agradeço pela oportunidade de fazer parte do quadro discente de um curso conhecido por sua excelência no ensino e pesquisa; e também pelo suporte financeiro concedido em tempo integral, por meio de uma bolsa de estudos do CNPQ - Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento;

Ao Dr. Carlos Alberto Labate, pela orientação e disponibilização de excelente infra-estrutura para a realização do trabalho em seu laboratório;

À Dra Mônica Labate, agradeço pela gentileza em revisar o presente trabalho;

Ao Dr. David Moon, sempre disposto a ajudar e esclarecer dúvidas, cumprimento pela excelente formação profissional e capacidade intelectual;

Ao Dr. Luciano Cônsoli, pela grande contribuição nas discussões sobre a preparação dos géis bidimensionais e acompanhamento dos trabalhos;

Ao Laboratório de Bioquímica de Plantas, Dept^o de Genética - ESALQ, na pessoa da Dra. Salete Gazioli, por disponibilizar o programa para a análise das imagens dos géis bidimensionais;

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo, Depto de Solos – ESALQ, na pessoa do Dr. Márcio Rodrigues Lambais, que nos abriu as portas para a utilização de equipamentos para a realização da eletroforese bidimensional;

À Livia Franceschini, por atender sempre prontamente aos meus pedidos de socorro, resolvendo problemas relacionados à informática;

Suporte espiritual:

À Deus Todo Poderoso e misericordioso, que me mostra a cada dia, alternativas para construir uma vida interessante e rica em valores humanos e cristãos, que me ampara em todos os momentos, nos mais alegres e divertidos, até aos marcados pela medo, mágoa e desafeto. Sinto sua mão protetora em tudo que faço, e tenho motivos de sobra pra confiar na sua luz e no seu poder transformador. Também não posso deixar de prestar minha homenagem aos meus intercessores, especialmente à São Judas Tadeu, São Sebastião, e Nossa Senhora Aparecida, que me auxiliaram espiritualmente em diversas empreitadas ao longo destes anos. Percorri um longo caminho nesta etapa e agora, ao final, renovo meus votos de amor, respeito e fé, para continuar concretizando outras objetivos que considero importantes para minha realização pessoal e profissional;

Suporte familiar:

Aos meus pais, Clarice e Hernandes, que não se cansam de cumprir seus papéis com a dedicação que sempre lhes foi característica. A esta altura do campeonato da vida, em que me vejo adulta e totalmente responsável por tudo que faço, mais encontro neles referências de retidão de caráter, de respeito ao próximo, de consciência exacerbada dos deveres, e também da importância da palavra, da verdade e do nome da família que carregamos. Vocês, meus amores, nos quais identifico com orgulho qualidades e defeitos comuns, expressões e reações semelhantes, fizeram de mim uma pessoa essencialmente feliz, autêntica, e bem resolvida. Agradeço pelo apoio incondicional e imperativo que me dedicaram neste e em todos os momentos da minha vida, pela rigidez na minha educação formal e pela referência de equilíbrio e solidez da família. A vocês, dedico todo meu amor e gratidão. Talvez esta seja a hora de começar a dizer: relaxem e contem sempre comigo, pro que der e vier!;

Aos meus irmãos Wender, Thiago e Diego, com os quais nunca perco os laços da infância, de uma época em que problemas e responsabilidades não eram da nossa alçada! Crescemos, somos pessoas tão diferentes, mas conservamos traços especiais

que nos fazem únicos, porque nascemos no mesmo lar. Acho isso mágico. A vocês, queridos, o meu melhor sentimento, e votos de uma vida feliz e realizada. Amo muito vocês;

Às famílias De Paula e Meireles, que me “adotaram” como um membro legítimo, agradeço pelo apoio e carinho de sempre, especialmente aos meus sogros, Sr. Edmundo e D. Cida, que cuidam de mim como uma filha, e partilham seu amor e consideração em todos os momentos;

À D. Nair Gimenez Lacerda, uma pessoa pra lá de especial, que adotei como minha “mãe piracicabana”, agradeço pelo carinho e zelo recíprocos nestes quase quatro anos em que morei em sua casa. Tornamo-nos confidentes e grandes amigas. Obrigada por tudo. Vou guardá-la pra sempre no meu coração;

Suporte emocional:

Aos amigos de fé e irmãos camaradas: Anna Bonna, Carolina Morgante, Éder Jorge Oliveira, José Francisco Farias, Juliano de Pádua, Sybelle Barreira e Tassiano Camara, pelos momentos explícitos de alegria e amizade que vivenciamos nestes anos. Encontrá-los no meio dessa empreitada foi um verdadeiro presente, pois contar com amigos leais é cada vez mais difícil. Mas sei que nossa irmandade está definitivamente impregnada em nossos corações, e mesmo de longe, continuaremos a ser especiais uns para os outros. Contem sempre comigo, e lembrem-se: nenhum de nós é tão bom, quanto todos nós juntos. Amo vocês!;

Aos amigos Daniela Defávári, Danielle Gomes, Esteban Gonzáles, Felipe Boaretto, Fernanda Salvato, Gisele Lacerda, Guillermo Salvatierro, Inês Faraldo, Juliano Bragatto, Lilia Barbosa, Livia Franceschini, Mayra Gallo, Rafael Carneiro, Raqueline Cordeiro e Simone Bragatto, pela convivência harmoniosa, pelos papos furados e papos cabeça, o meu muito obrigada. Foi um prazer tê-los por perto no dia-a-dia do laboratório,

e também fora dele. A vocês, meus sinceros votos de felicidade e realização pessoal e profissional!;

Ao amigo de todas as horas, Eduardo Leal Camargo, sempre presente e disposto a colaborar. Por você, Z-Zé, tenho um sentimento especial, pois o considero como um irmão. Desejo que conquiste os vãos mais altos que puder alcançar, que o leve para lugares que só as pessoas com um coração como o seu, merecem estar. Obrigada pelo apoio diário. Conte comigo sempre que precisar;

Ao doutorando Simão Lindoso, pela grandiosa colaboração na rotina do laboratório, sempre ajudando e participando ativamente do trabalho. É claro que tudo isso só foi possível, porque nos identificamos e passamos a tratar dos assuntos profissionais pautando-nos na amizade que surgiu entre nós. Eu imagino, Simão, que nem daqui umas três encarnações, consigo retribuir todos os favores e a ajuda que me deu. O meu muito obrigada, e votos de sucesso!;

À Taysa Fonseca, primeira pessoa que conheci ao chegar em Piracicaba, e que se tornou uma amiga muito querida, agradeço por estar sempre presente em minha vida, demonstrando sua atenção e preocupação comigo e com minha família;

À Sybelle Barreira, grande amiga, e certamente a pessoa que mais incentivou minha vinda para a ESALQ. É, querida... cinco anos depois, e continuamos matando um leão por dia! Desejo que nossa amizade esteja sempre acima das vaidades pessoais, dos sentimentos pequenos, da mentira e do mal, porque acho que não tem jeito – nosso “caso de amor” parece mesmo eterno! Conte comigo pro que der e vier.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	16
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Caracterização e disseminação do gênero <i>Eucalyptus</i>	23
2.2 O eucalipto no Brasil	24
2.3 Importância das indústrias de base florestal	27
2.4 Melhoramento genético de espécies florestais	28
2.5 Caracteres da qualidade da madeira	30
2.6 Melhoramento genético para a polpa e papel	32
2.7 Biotecnologia florestal	33
2.8 Genômica	35
2.9 Formação da madeira	36
2.10 Proteômica	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Amostragem do material biológico	43
3.2 Extração de proteínas	44
3.2.1 Extração com ácido tricloroacético	44
3.2.2 Extração com fenol	45
3.3 Quantificação do extrato protéico	45
3.4 Minigéis	46
3.5 Preparação dos géis bidimensionais	46
3.5.1 Focalização isoeletrica (IEF)	46
3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	47
3.6 Coloração dos géis	47
3.7 Digestão das proteínas	48

3.8 Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa – LC/MS/MS	49
3.9 Análise dos espectros de massa	50
3.10 Identificação dos bancos de dados	52
3.11 Análise das imagens dos géis	54
3.12 Abundância de proteína x mRNA	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Amostragem do material biológico	56
4.2 Testes preliminares	57
4.2.1 Métodos de extração de proteína	57
4.2.2 Preparação e coloração dos géis bidimensionais	59
4.3 Resolução das proteínas	62
4.4 Análises das imagens dos géis	63
4.5 Escolha dos <i>spots</i>	66
4.6 Espectrometria de massa	66
4.6.1 Espectros MS e MS/MS	66
4.6.2 Identificação dos <i>spots</i>	67
4.7 Múltiplos <i>spots</i> para a mesma proteína	77
4.8 Distribuição funcional das proteínas	79
4.9 Correlação entre abundância de mRNA e proteínas	80
4.10 Proteínas da região cambial da madeira de eucalipto com 6,3 anos	85
4.10.1 proteínas de respostas ao estresse	85
4.10.2 proteínas relacionadas à biossíntese de lignina	87
4.10.3 Proteínas responsáveis pelo metabolismo	89
4.10.4 Proteínas geradoras de energia	90
4.10.5 Proteínas envolvidas em processos celulares	91
4.10.6 Biossíntese da parede celular	93
4.10.7 Proteínas do citoesqueleto	93
4.10.8 proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas	94
4.11 Discussão geral do experimento	95
5 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100

RESUMO

Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa.

O Brasil é um país de vocação florestal, mantendo atualmente grandes áreas reflorestadas com *Eucalyptus*, cuja madeira é utilizada como matéria-prima em diversas indústrias de base florestal. A projeção é de uma crescente demanda de madeira e, em função disso, é necessário associar novas estratégias aos programas de melhoramento genético, que resultem não somente no aumento da produtividade, como também na adequação de caracteres da qualidade da madeira para um produto final. A qualidade da madeira depende de diversas propriedades do xilema secundário, tecido que constitui a madeira. O desenvolvimento de tecnologias proteômicas, que permitem analisar os genes diretamente ao nível de seus produtos, pode contribuir para o maior entendimento dos processos relacionados à formação da madeira. O objetivo principal deste trabalho foi identificar as proteínas mais abundantemente expressas na região cambial, envolvidas na formação da madeira de *Eucalyptus grandis*, aos 6,3 anos de idade. A região cambial foi caracterizada por células do câmbio e por células diferenciadas em floema e xilema secundários. A amostragem foi realizada por meio da abertura de painéis nas árvores, seguido da raspagem de sua casca interna e da superfície do fuste. Foram testados dois métodos de extração de proteínas, que utilizam ácido tricloroacético e fenol, respectivamente, a fim de avaliar qual deles proporciona a obtenção de extratos protéicos concentrados e livres de contaminantes. Ensaios foram realizados para ajustar o tempo e o tampão de focalização isoeletrica das proteínas. Um extrato contendo cerca de 500 µg de proteínas foi utilizado para a preparação dos géis 2D de pH 4-7. Dois tipos de coloração de géis foram avaliados. Os *spots* foram recortados para proceder a digestão triptica das proteínas. A solução contendo os peptídeos de uma amostra foi analisada por espectrometria de massa. As seqüências experimentais foram contrastadas com uma base de seqüências peptídicas e um banco de ESTs espécie-específico. As imagens dos géis bidimensionais foram analisadas, com a finalidade de fazer inferências sobre o nível de expressão de cada proteína identificada na região cambial, como também correlacioná-la com a expressão de seu transcrito correspondente. O método com fenol mostrou-se o mais eficiente para extrair proteínas da região cambial. Foi observado que as proteínas foram totalmente focalizadas a 74.000 Vh. A coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 permitiu a revelação de um número maior de *spots* e mostrou-se compatível com a espectrometria de massa. A análise LC/MS/MS das amostras permitiu a identificação de 69 *spots*, correspondendo a 41 proteínas distintas da região cambial, sendo 34,15% delas, representadas em múltiplos *spots*. As proteínas identificadas exercem seu papel biológico na produção de energia (22%), em processos celulares (19,5%), como componentes estruturais (17,1%), nos metabolismos de aminoácidos (14,6%) e macromolecular (19,5%), e no transporte de moléculas (2,4%). Oito *spots* mostraram similaridade de seqüências em ambas bases de dados, mas nenhuma função foi atribuída a eles. A análise da correlação revelou uma tendência para um grupo restrito de proteínas, de que os transcritos que se mostraram pouco abundantes corresponderam a proteínas altamente expressas na região cambial. Palavras-chave: espectrometria de massas, eletroforese bidimensional, *Eucalyptus*, proteoma, madeira.

ABSTRACT

Identification of proteins expressed in the cambial region of *Eucalyptus grandis*, by mass spectrometry.

Brasil is a country with forestry inclination, currently keeping large areas planted with *Eucalyptus*, which wood is used as raw material in several forest-based industries. The projection is an increasing demand of wood and, as a function of it, it is necessary to link new strategies to the programs of genetic improvement that result not only in the increase of the productivity, but also in the adequacy of characters of wood quality for a final product. The wood quality depends on several properties of secondary xylem, a tissue that forms the wood. The development of proteomic technologies, which permit to analyze directly the genes at their products' level, can contribute to a better comprehension of the processes related to the wood formation. The main objective of this work was to identify the most abundant proteins expressed in the cambial region that are involved in the *Eucalyptus grandis* wood formation at 6.3 years of age. The cambial region was characterized by cambium cells differentiated into secondary phloem and xylem. The sampling was performed by means of opening panels in the trees, followed by rubbing their internal barks and the stem surface. Two protein extraction methods were tested. These methods use trichloroacetic acid and phenol, respectively, in order to evaluate which one proportionates the acquisition of concentrated proteic extracts and is free from contaminants. Essays were performed to adjust the time and the buffer for isoelectric focus of proteins. Extracts containing around 500 µg of protein were used to prepare 2D gels with pH ranging from 4 to 7. Two types of gel staining were evaluated. The spots were cut out in order to obtain the tripitac digestion of the proteins. The solution containing peptides from each sample was analyzed by mass spectrometry. The experimental sequences were contrasted in a peptidic sequences base and in a specie-specific ESTs. The bidimensional gels images were analyzed in order to make inferences about the level of expression of each protein identified in the cambial region, as well as to correlate them with the expression of its corresponding transcript. The method using phenol showed to be more efficiently to extract proteins from the cambial region. It was observed that the proteins were totally focused at 74,000 Vh. The staining with Coomassie Brilliant Blue G-250 allowed the revealing of a higher number of spots and showed to be compatible with mass spectrometry. The LC/MS/MS sample analyses allowed the identification of 69 spots, corresponding to 41 different proteins from the cambial region, where 34.15% of them were represented in multiple spots. The identified proteins play their biological role in the production of energy (22%), in cellular processes (19.5%), as structural components (17.1%), in metabolism of aminoacids (14.6%) and macromolecular metabolism (19.5%), and in the transportation of molecules (2.4%). Eight spots showed similarity in sequences in both databases, but no function was attributed to them. The correlation analysis revealed a tendency for a restrict group of proteins, whose transcripts showed a little abundant, corresponds to proteins highly expressed in the cambial region.

Keywords: mass spectrometry, bidimensional electrophoresis, *Eucalyptus*, proteome, wood.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Subdivisões do projeto desenvolvido no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, sobre o estudo da expressão gênica e protéica em *Eucalyptus grandis*, em diferentes estádios de desenvolvimento 21
- Figura 2 - Região cambial amostrada na madeira de eucalipto, formada por células do câmbio vascular, do floema (F) e do xilema (X) secundários 43
- Figura 3 - Amostragem do material biológico. (A) abertura do painel no tronco; (B) coleta das camadas superficiais de células no fuste; (C) retirada da amostra e imediata imersão em nitrogênio líquido 44
- Figura 4 - Variação da concentração do tampão B no decorrer da aquisição de uma amostra. De 10-15% em 5 min; 15-30% em 20 min; 35-45% em 5 min; 45-80% em 5 min, 80% por 5 min; e 10% por 5 min 50
- Figura 5 - Parâmetros determinados para a identificação dos *spots* na base de seqüências peptídicas Swiss Prot, pelo programa ProteinLynx 51
- Figura 6 - Parâmetros determinados para a identificação dos *spots* na base de ESTs Genolyptus, pelo programa ProteinLynx 52
- Figura 7 - Operações da bioinformática utilizadas para identificar as proteínas da região cambial da madeira 53
- Figura 8 - Proteínas da região cambial da madeira de eucalipto com 6,3 anos de idade, extraídas com (A) ácido tricloroacético e (B) fenol, e separadas em gel 12,5% acrilamida e coradas com 1% nitrato de prata 58
- Figura 9 - Gel 1,2% agarose carregado com 5 µg de proteínas e corado com brometo de etídio. Proteínas extraídas com (1) ácido tricloroacético e (2) fenol, fracionado nas fases fenólica (2A) e aquosa (2B). O círculo na canaleta 1 mostra os contaminantes retidos 59

Figura 10 - Proteínas da região cambial focalizadas à 60.000 Vh, separadas em géis bidimensionais (A) pH 4-7 e (B) pH 3-10, e coradas com CBB-R250	60
Figura 11 - 2D-géis pH 4-7 carregados com 500 µg de proteínas, previamente focalizadas à 74.000 Vh. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (A) R-250 e (B) G-250	61
Figura 12 - Proteínas da região cambial da madeira com 6,3 anos, resolvidas em gel bidimensional de pH 3-10, não linear. A área delimitada pelo retângulo indica que a faixa de pH que concentra o maior número de <i>spots</i> é a de 4-7	63
Figura 13 - Orientação dos vetores representando o alinhamento dos <i>spots</i> em relação aos marcadores L1 (spot 89) e L2 (spot 43)	64
Figura 14 - Número de <i>spots</i> detectados nos géis <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> e número de pares comuns entre eles, determinado pelo programa Image Master 2D Platinum v 5.0	65
Figura 15 - Espectros MS/MS e MS obtidos para o <i>spot</i> 27, posteriormente identificado pelo programa Protein Lynx, através de 7 sequências peptídicas, como <i>ATP synthase beta chain mithochondrial</i>	67
Figura 16 - 2D-gel pH 4-7 da região cambial da madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> , em sua fase final de desenvolvimento. Os números indicam as proteínas identificadas, e os asteriscos os <i>spots</i> não esclarecidos	76
Figura 17 - Proteínas da região cambial identificadas em múltiplos <i>spots</i> , localizadas na mesma faixa de peso molecular e com variação em seus pIs. (A) <i>Phophoglycerate kinase</i> ; (B) <i>Tubilins</i> ; (C) <i>S-adenosylmethionine synthase</i> ; (D) <i>70 KDa Heat shock</i>	79
Figura 18 - Distribuição das proteínas da região cambial em categorias funcionais	80
Figura 19 - Comparação entre a abundância das proteínas mais expressas na região cambial e seus mRNAs correspondentes	82

Figura 20 - Rota da biossíntese da lignina. As enzimas marcadas em **negrito** foram identificadas na região cambial de eucalipto 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Capacidade produtiva das principais espécies utilizadas em reflorestamentos	26
Tabela 2 - Propriedades importantes da madeira indicadas para as principais classes de produtos	32
Tabela 3 - Tipos de modificações considerados no processamento dos espectros de massas	51
Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> , identificadas por espectrometria de massa	69
Tabela 5. Proteínas mais abundantes da região cambial e seus transcritos correspondentes	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CO₂ – dióxido de carbono

ha – hectare

m³ – metro cúbico

EST – *Expressed Sequence Tag* – uma sequência curta de cDNA

SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression* – análise serial da expressão gênica

mRNA – RNA mensageiro

DNA – ácido desoxiribonucléico

Mpb – mega pares de bases

% - porcentagem

PIB – Produto Interno Bruto

HT – altura total

DAP – diâmetro a altura do peito

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – *open reading frame* ou sequência aberta de leitura

PVDF - poli(fluoreto de vinilideno)

m – metro

°C – grau centígrado

ml – mililitro

p/v – peso por volume

v/v – volume por volume

g – grama

M – molar

DTT – dithiothreitol

mM – milimolar

x g – força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade

KCl – cloreto de potássio

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVPP – polivinilpolipirrolidona

μl – microlitro

HCl – ácido clorídrico

H₂O MilliQ – água destilada deionizada e filtrada a 0,2 µm

nm – nanômetro

BSA – proteína albumina de boi

cm – centímetro

pH – potencial hidrogeniônico

SDS – dodecil sulfato de sódio

min – minuto

V – volt

IEF – Isoelectric focalization - focalização isoeletrica

µg – micrograma

µA – microampere

h – hora

Vh – volt x hora

mA – miliampere

ACN – acetonitrila

ESI – ionização por eletrospray

Q – filtro de massas do tipo quadrupolo

mm – milímetro

psi – libra por polegada quadrada; unidade de pressão no sistema inglês/americano

m/z – massa do íon peptídeo em relação a sua carga

MS/MS – análise por espectrometria de massa que permite conhecer a estrutura primária de peptídeos que constituem uma proteína

GFP – [Glu1]-Fibrinopeptide B

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

PM – peso molecular

pI – ponto isoeletrico

LC/MS/MS – análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

MS – análise por espectrometria de massa que permite conhecer as massas dos peptídeos que constituem uma proteína

TCA – ácido tricloroacético

2D – bidimensional

KDa – quilo Dalton

CBB – corante Coomassie Brilliant Blue

ATP – trifosfato de adenosina

cDNA – DNA complementar ao RNA

NADH – forma reduzida da coenzima NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo)

NADP – coenzima adenina dinucleotídeo fosfato

NAD⁺ - forma oxidada da coenzima NAD

GTP – trifosfato de guanosina

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é privilegiado pelas grandes reservas de florestas naturais que possui, exibindo uma variedade incrível de espécies madeireiras de alto valor econômico, que assumem papel fundamental na remoção do excesso de CO₂ da atmosfera, gerado pela queima de combustíveis fósseis e, em consequência disto, contribuem para a estabilização das mudanças climáticas e minimização do efeito estufa. A madeira é um dos recursos naturais mais importantes, e constitui a principal matéria-prima de diversas indústrias de base florestal, como a de celulose e papel, sólidos de madeira, siderúrgica, moveleira, entre outras. A necessidade de diminuir a pressão sobre as matas nativas, aliada ao esforço de promover o crescimento do setor florestal no país, levaram o governo brasileiro a lançar, em 1965, uma política de incentivos fiscais para promover ampla disseminação de florestas de produção pelo país. Atualmente, o Brasil mantém cerca de 5,4 milhões de ha de reflorestamentos, dos quais 3,4 milhões de ha são ocupados com espécies de *Eucalyptus* sp. (SBS, 2005).

Nas últimas quatro décadas, o setor florestal cresceu extraordinariamente. A indústria brasileira de base florestal é a mais expressiva da América do Sul, consumindo cerca de 145 milhões de metros cúbicos de madeira proveniente de florestas de produção (SBS, 2005), plantadas com clones e híbridos interespecíficos superiores, advindos de programas de melhoramento. O melhoramento genético contínuo, associado às práticas silviculturais intensivas, permitiram que os plantios comerciais de eucalipto no Brasil passassem de 12 m³/ha.ano na década de 60, para uma produtividade média atual de 40 m³/ha.ano, alcançando incrementos de até 60 m³/ha.ano em sítios superiores (LEITE, 2005). Os ganhos em produtividade volumétrica foram muito significativos, haja visto o reflexo no setor de celulose e papel, que saiu de aproximadamente 700 mil toneladas anuais de celulose produzidas em 1970, para uma produção superior a 9 milhões de toneladas em 2004 (FOELKEL, 2005), situando o país como o primeiro produtor mundial de celulose de fibra de eucalipto.

Paralelo a esse cenário, mudanças significativas vêm ocorrendo no Brasil e no exterior, levando à expansão de mercados existentes e ao surgimento de novos nichos e produtos que utilizam, basicamente, a madeira de reflorestamento. No entanto, o

aumento da produção industrial não vem sendo acompanhado, no mesmo ritmo, pelo incremento da área reflorestada do país, resultando na falta de madeira proveniente de plantios comerciais no mercado, fenômeno conhecido como ‘apagão florestal’, observado desde 2004. A projeção é de uma crescente demanda de madeira pelas indústrias nacionais de base florestal, que pode chegar a 220 milhões de metros cúbicos em 2020 (TOMASELLI; SIQUEIRA, 2005). Assim, é cada vez mais iminente a necessidade de associar aos programas de melhoramento, novas estratégias que resultem, não somente no aumento da produtividade, mas principalmente, na adequação de caracteres relacionados a qualidade da madeira, específica ao produto final. O objetivo é construir uma árvore totalmente direcionada para cada uso da madeira, mas para tanto, é preciso identificar quais são as características realmente desejáveis que a madeira deve apresentar para um determinado produto, e identificar genes importantes que atuam na regulação destes caracteres.

A qualidade da madeira depende significativamente das propriedades físicas, químicas e mecânicas das células do xilema secundário, tecido que constitui a madeira. Para obter um produto de alta qualidade, a indústria de celulose e papel exige madeira de eucalipto com densidade baixa à moderada, e fibras com elevado conteúdo de celulose e menor teor de lignina. Um grande número de genes que participam das rotas de biossíntese de lignina e celulose já foi observado através da indução da xilogênese e uso de mutantes em plantas modelo, e também, por meio da caracterização de padrões de expressão em etapas específicas do processo de diferenciação das células xilemáticas. Com o advento de novas tecnologias que permitem analisar os genes diretamente ao nível de seus transcritos (transcrissômica) e produtos gênicos (proteômica), pode-se conseguir um entendimento muito mais abrangente sobre a expressão gênica e protéica em vários processos celulares relacionados à formação da madeira.

Em *Eucalyptus*, estudos sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da madeira são raros e têm utilizado apenas a abordagem transcrissômica, como a análise de microarranjos associados ao sequenciamento de ESTs (PAUX et al., 2004; 2005). A proteômica despontou como uma das vertentes da era pós-genômica, viabilizada pelo desenvolvimento da espectrometria de massa em larga-escala e separação de proteínas

em eletroforese bidimensional. É uma ferramenta de grande potencial de predição, uma vez que as proteínas são os agentes definitivamente responsáveis pelos fenótipos das células (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

O presente trabalho compreende parte dos primeiros resultados de uma das linhas de pesquisa do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, cujo objetivo é identificar e monitorar a expressão de genes e proteínas envolvidos no processo de formação da madeira, em *Eucalyptus grandis*, ao longo do ciclo de rotação utilizado pela indústria de celulose e papel, que é de 7 anos. Para cada estadio de desenvolvimento da planta, considerando-se como: 6 meses (fase juvenil); 3 anos (fase intermediária); 6 anos (fase avançada ou final do desenvolvimento), seis teses de doutorado estão sendo desenvolvidas sobre o conjunto de transcritos e de proteínas expressos na região cambial da madeira (Figura 1), através do uso da tecnologia SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) e da espectrometria de massa, respectivamente. Dessa maneira, poderão ser estabelecidas comparações entre o perfil de expressão de proteínas e seus respectivos mRNAs em cada fase, como também o acompanhamento da expressão dos genes identificados em todos os estadios de desenvolvimento.

Figura 1 - Subdivisões do projeto desenvolvido no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, sobre o estudo da expressão gênica e protéica em *Eucalyptus grandis*, em diferentes estadios de desenvolvimento

Os objetivos específicos deste trabalho foram (i) identificar as proteínas expressas na região cambial, envolvidas na formação da madeira de *Eucalyptus grandis*, aos 6,3 anos de idade, caracterizando o estágio avançado do desenvolvimento da árvore; (ii) comparar a expressão das proteínas identificadas com os níveis dos transcritos correspondentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização e disseminação do gênero *Eucalyptus*

No final do século XVIII, o botânico francês Charles Louis L'Heritier De Brutelle realizou a primeira descrição botânica do gênero, valendo-se do material coletado em expedições no território australiano (TURNBULL, 1999). O nome *Eucalyptus* deriva do grego, e significa *eu* (= bem) e *kalipto* (= cobrir), referindo-se à estrutura globular de seu fruto, caracterizando o opérculo que protege bem as suas sementes (O EUCALIPTO, 2003).

As espécies de eucalipto são monóicas, protândricas, e preferencialmente alógamas, embora outros padrões de cruzamento podem ser observados, como autofecundação causada por cleistogamia, fecundação cruzada obrigatória devido à autoincompatibilidade (PRYOR, 1957), macho esterilidade (DAVIS, 1969), e esterilidade feminina (CARR et al., 1971). A análise do cariótipo revelou que a maioria das espécies do gênero tem 22 cromossomos, caracterizados por seu tamanho extremamente pequeno (RUGGERI, 1961). Estimativas do conteúdo de DNA nuclear (2C) para espécies examinadas por Grattapaglia e Bradshaw (1994), mostraram que o genoma do eucalipto possui entre 500 e 650 Mpb.

De ocorrência natural na Austrália, o *Eucalyptus* engloba mais de 600 espécies, com genótipos adaptados a diversas condições de clima e solo, sendo algumas poucas nativas das ilhas de Java, Filipinas, Timor, Papua Nova Guiné e outras (PRYOR, 1976). O gênero, que pertence à família *Myrtaceae*, também mostra um grande número de variedades e de híbridos naturais, sendo a maioria destes descrita no trabalho de S.T. Blake, em 1934 (LIMA, 1993; BOLAND et al., 1994). Em 1995, foi publicado um amplo estudo sobre aspectos morfológicos e moleculares do gênero *Eucalyptus* (HILL; JOHNSON, 1995), que resultou em modificações na classificação botânica. Os autores sugeriram a redução do gênero em várias espécies, formando um novo gênero denominado *Corymbia*. Em função disso, espécies conhecidas como *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus maculata*, entre outras, passaram a ser apresentadas como *Corymbia citriodora* e *Corymbia maculata*.

As primeiras sementes e mudas foram levadas para a Europa por Antônio Guichenot, por volta de 1774 (ANDRADE, 1961). Naquela época, o eucalipto foi considerado apenas uma curiosidade botânica, figurando em coleções de alguns jardins botânicos europeus. Na América do Sul, o primeiro país a introduzir o eucalipto foi, provavelmente, o Chile, em 1823, recebendo as sementes de um navio inglês, e posteriormente a Argentina e o Uruguai. Pouco depois, Portugal, Espanha e Índia começaram a testar diversas espécies do gênero, por volta de 1850 (O EUCALIPTO, 2003). Depois que passou a ser cultivado, seu potencial de utilização foi reconhecido em diversas partes do mundo. Atualmente, as espécies mais utilizadas são o *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. saligna*, *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. viminalis* e *E. tereticornis*, direcionadas para fins bastante diversificados (MORA; GARCIA, 2000).

Estimativas da área global reflorestada com eucalipto apontam para 18 milhões de ha (FAO, 2000), sendo que mais de 90% destas florestas foram estabelecidas após 1955, e cerca de 50% nas últimas duas décadas (TURNBULL, 1991). Há grandes áreas de plantio na Ásia tropical, concentradas principalmente na Índia, com cerca de 8 milhões de ha, como também na América do Sul, com aproximadamente 10 milhões de ha. A estatística é dominada pelo Brasil, onde há aproximadamente 3,4 milhões de ha reflorestados com eucalipto (SBS, 2005). Além disso, plantios expressivos são encontrados em países de clima temperado, incluindo China, Chile, África do Sul, Portugal e Espanha.

2.2 O eucalipto no Brasil

É questionável a data de introdução do eucalipto no Brasil. Acredita-se que os exemplares mais antigos encontrados no país são de *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus tereticornis*, plantados pelo Imperador D. Pedro I no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em 1825. No Rio Grande do Sul, as primeiras mudas foram plantadas em 1868, por Frederico de Albuquerque (FERREIRA; SANTOS, 1997) e, no mesmo ano, também foram plantados alguns exemplares na Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. Até o princípio do século XX, o eucalipto foi plantado para fins ornamentais, e também para uso como quebra-vento. Com o objetivo de realizar pesquisas, o eucalipto foi introduzido

sistematicamente no Brasil em 1903 por Edmundo Navarro de Andrade, que trabalhava na Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Ele iniciou o cultivo e o estudo de espécies de eucalipto visando utilizar a madeira para alimentar as caldeiras das locomotivas, produzir moirões para ferrovias e postes para eletrificação. Navarro de Andrade introduziu um número extraordinário de espécies no Horto Florestal de Rio Claro, constituindo um dos mais completos bancos de germoplasma do país (ANDRADE, 1961; LIMA, 1993).

No Brasil, o *Eucalyptus* tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais, por diversas razões: (i) grande plasticidade do gênero, devido à diversidade de espécies adaptadas a diferentes condições de clima e solo; (ii) elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa; (iii) características silviculturais desejáveis, como rápido crescimento, produtividade e boa forma do fuste; (iv) responsivo a tratamentos culturais, ao melhoramento genético e ao manejo; (v) adequação aos mais diferentes usos industriais, com ampla aceitação no mercado (MORA; GARCIA, 2000; SILVA, 2005). O sucesso do eucalipto no país foi catalisado por programas de incentivos fiscais estabelecidos pelo governo federal durante as décadas de sessenta e setenta. Estima-se que dos 2,9 milhões de ha de reflorestamentos com eucalipto implementados pelos programas de incentivos, 2,3 milhões de ha transformaram-se em florestas de produção para o abastecimento de importantes segmentos consumidores (IUSEUM et al., 1988; BRAZETT, 1993).

A Tabela 1 apresenta as principais espécies utilizadas em reflorestamentos por países que assumem posição de destaque na indústria de base florestal. A produtividade média do eucalipto no Brasil é de 30 m³/ha.ano, podendo atingir 60 m³/ha.ano em plantios clonais estabelecidos em sítios superiores. O ciclo de rotação é de sete anos, quase três vezes menor que o de *Pinus* e mais de oito vezes inferior ao de outras coníferas típicas de países de clima frio. Estes dados reafirmam a competitividade dos setores que utilizam o eucalipto como principal matéria-prima de seus produtos.

Tabela 1 - Capacidade produtiva das principais espécies utilizadas em reflorestamentos

País	Espécie	Produtividade (m ³ /ha.ano)	Rotação (anos)
Brasil	<i>Pinus taeda</i>	25	20
Brasil	<i>Eucalyptus sp.</i>	30	7/14/21
Brasil	<i>Eucalyptus</i> (clones)	60	7/14/21
Chile	<i>Pinus radiata</i>	25	20
Estados Unidos	<i>Pinus taeda</i>	12	20
África do Sul	<i>Pinus patula</i>	19	30
Escandinávia	<i>Picea abies</i>	5	60
Suécia	<i>Coníferas</i>	3	60

Fonte: SBS, ABRACAVE

Com efeito, consolidaram-se segmentos industriais com características bem definidas e com amplas possibilidades de se aproveitar as condições vocacionais brasileiras, atendendo às demandas internas e sendo altamente competitivos no mercado internacional.

Em função disso, o eucalipto é cultivado em escala comercial, praticamente em todo o país. Os Estados com maior área plantada são Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Espírito Santo. Minas Gerais mantém cerca de 1,5 milhão de ha reflorestados com eucalipto, direcionados para atender a indústria siderúrgica e de carvão vegetal. Os demais estados somam 1.200.000 ha de plantios utilizados principalmente no abastecimento dos pátios das indústrias de celulose e papel, dos quais metade está localizada no Estado de São Paulo, que abriga quatro grandes companhias do setor. A madeira do eucalipto também é utilizada como matéria-prima por outros segmentos da indústria florestal, para uma grande variedade de produtos, incluindo móveis, madeira serrada, madeira laminada, madeira processada para a produção de aglomerados e chapas de fibra, entre outros. Além disso, das folhas do eucalipto extraem-se óleos essenciais, utilizados em produtos de limpeza e alimentícios, medicamentos e perfumes, ao passo que a casca oferece o tanino, empregado no curtume do couro.

2.3 Importância das indústrias de base florestal

O setor brasileiro de base florestal oferece cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos. Contribuiu, em 2004, com US\$ 5,5 bilhões em impostos e participou com 4% do PIB nacional, um patamar extraordinário pelo pouco tempo da atividade no país. Em 2004, seu faturamento foi 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 país (SBS, 2005).

Tecnologia e inovação são os fatores chaves do sucesso da competitividade do setor florestal. O desenvolvimento de florestas produtivas e de rápido crescimento, associado a tecnologia industrial, viabilizaram a produção de papéis e de celulose de qualidade internacional, em fábricas de última geração. Também é notável a vantagem competitiva que o país mostra na área de biomassa energética. Desde o início dos anos 90, as empresas vêm firmando parcerias com universidades, no intuito de desenvolver a madeira de eucalipto para produtos sólidos, conseguindo produtos de alta qualidade. De acordo com a Sociedade Brasileira de Silvicultura (2005), o faturamento setorial em 2003 foi distribuído entre os segmentos de celulose e papel, com US\$ 9,5 bilhões; madeira sólida, com US\$ 9,1 bilhões; siderurgia e carvão vegetal, com US\$ 5,2 bilhões; móveis de madeira, com US\$ 4,4 bilhões.

Deve-se destacar também a contribuição dos reflorestamentos do país para a minimização do efeito estufa. Na tentativa de reverter as terríveis previsões de superaquecimento do planeta, causado pelo acúmulo de dióxido de carbono e metano na atmosfera, o Protocolo de Kyoto acordou que países intensamente industrializados diminuam seus níveis de poluição. Para não comprometer a economia desses países, o Protocolo estabeleceu que, caso as metas não sejam atingidas através da redução da emissão dos gases poluentes, estes poderão conseguí-la por meio da compra de créditos de carbono de países que não têm a mesma obrigatoriedade, como é o caso do Brasil. Assim, o país deve se colocar como um grande vendedor de créditos de carbono e como alvo de investimentos em projetos engajados com a redução da emissão de poluentes. Em 2004, foram negociados US\$ 670 milhões no mercado mundial de carbono. No entanto, com a entrada em vigor do Protocolo de Kyoto no ano passado,

espera-se um grande incremento nas negociações, que devem chegar a US\$ 13 bilhões em 2007 (BRASIL, 2005).

Além do desafio de manter a qualidade conquistada, o setor florestal oferece novos caminhos tecnológicos que precisam ser desbravados, como por exemplo, a produção de alcatrão ou de bioóleo, a produção de papel para imprensa contendo mais eucalipto, e o alcance da sustentabilidade (FOELKEL, 2005). O prognóstico do setor florestal brasileiro feito por Rodrigues (2005), aponta para um futuro promissor. Segundo o autor, os diversos segmentos continuarão a crescer e ser competitivos no mercado internacional, como também o mercado interno, considerado grande o suficiente para manter a indústria de base florestal sem sobressaltos.

2.4 Melhoramento genético de espécies florestais

O melhoramento florestal é uma ciência relativamente nova, iniciada no Brasil no final da década de 60 com a implantação da lei dos incentivos fiscais ao reflorestamento. Ele incorpora conceitos aplicados ao melhoramento animal e ao de culturas agrícolas anuais, como também aspectos particulares desenvolvidos ao longo dos anos, em decorrência do caráter perene e da diversidade de sistemas reprodutivos associados às espécies florestais (RESENDE, 1999).

Os programas de melhoramento genético do eucalipto tiveram como objetivo inicial, determinar a adaptabilidade de espécies e procedências em ambientes específicos, por meio de ensaios de progênies em diferentes sítios florestais e estudos sobre a variação da resposta de um genótipo a diferentes condições ambientais, definida como interação genótipo x ambiente (KAGEYAMA, 1980). Em seguida, o melhoramento florestal passou a perseguir o aumento da produtividade volumétrica da madeira a cada ciclo de seleção, sem com isso comprometer a base genética da população (MENK, 1989). Com efeito, os plantios comerciais de eucalipto no Brasil passaram de 12 m³/ha.ano para uma produtividade média de 30 m³/ha.ano (LEITE, 2005). Para tanto, as estratégias tradicionalmente adotadas pelos programas de melhoramento das empresas nacionais foram a seleção massal, seguida da obtenção de clones das árvores superiores, e da seleção com famílias de meios-irmãos visando a

obtenção de populações melhoradas (PEREIRA et al., 2002). Outros métodos de melhoramento de eucalipto são utilizados em diferentes países, como a seleção recorrente em população única, preservando estrutura de família (FRANKLIN, 1986); seleção massal com progênies de polinização aberta, sem manter estrutura de família (SHELBOURNE, 1992); populações múltiplas associadas a núcleos de cruzamento (HIGA; RESENDE, 1993); núcleos de cruzamento para propagação vegetativa em massa de famílias superiores (COTTERILL et al., 1989).

Uma ferramenta importante que contribui para a obtenção de ganhos genéticos é a hibridação, que pode ocorrer entre indivíduos de uma mesma população, entre populações distintas dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes (ASSIS et al., 1996), visando obter vigor híbrido e reunir em um único indivíduo características encontradas em espécies distintas. No Brasil, o exemplo mais bem sucedido é a hibridação entre *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, resultando em um híbrido interespecífico resistente ao cancro e com elevada produção volumétrica (FERREIRA, 1983).

Com o advento da clonagem na década de 80, grande ênfase foi dada à seleção e propagação de árvores superiores resultantes do programa de melhoramento, e também dos plantios comerciais já estabelecidos (REZENDE, 2006). As florestas clonais obtidas a partir de então, apresentaram ganhos genéticos significativos em produtividade e uniformidade da madeira.

Os primeiros estudos sobre genética do eucalipto concentraram-se em caracteres de crescimento da árvore, retidão do fuste e qualidade da ramificação (RAYMOND, 2002). A seleção era praticada com base na altura total (HT) e no diâmetro à altura do peito (DAP), que refletem a capacidade de conversão de produtos fotossintetizados em produtos úteis, em menor espaço de tempo. Também eram preferidas as árvores sem tortuosidade, com copa densa e estreita, que permitem maior estoque de madeira por área, e com ramos finos e curtos, inseridos ao fuste em um ângulo o mais aberto possível (ASSIS, 1996). Outros caracteres foram sendo incorporados pelos programas de melhoramento, como tolerância a ventos, resistência à deficiência hídrica, tolerância ao fogo rasteiro e baixa susceptibilidade à geada, porém, sempre de forma independente do uso final da madeira. Os progressos alcançados no setor florestal

brasileiro foram expressivos, entretanto, com o decorrer do tempo, os estudos demonstraram a elevada heterogeneidade da madeira de eucalipto quanto à sua composição química, anatômica e física, sendo observada grande variação entre espécies, dentro de uma espécie, e dentro de uma única árvore (THOMAZ, 1995), indicando uma preocupação crescente em desenvolver materiais genéticos específicos para diferentes produtos e de incorporar caracteres relacionados à qualidade da madeira.

2.5 Caracteres da qualidade da madeira

O melhoramento de *Eucalyptus* para caracteres de importância comercial é recente e está diretamente relacionado ao estabelecimento de grandes áreas de plantios comerciais e às necessidades do mercado mundial. Até os anos 90, poucos trabalhos sobre avaliação de caracteres da qualidade da madeira foram realizados, por diversas razões. Dentro dos programas de melhoramento, existe a necessidade de se acessar um grande número de indivíduos e famílias para caracteres de interesse econômico. Entretanto, métodos tradicionais utilizados com esse objetivo, são caros e restringem o número de amostras que podem ser processadas. Além disso, os métodos convencionais envolvem a destruição das árvores amostradas, o que representa uma limitação significativa para espécies que não se propagam vegetativamente. Para algumas espécies de *Eucalyptus*, como *E. nitens* e *E. globulus*, a amostragem destrutiva implica na perda de genótipos importantes para o melhoramento genético (RAYMOND, 2002).

Os diversos setores florestais passaram a questionar as características desejáveis que a madeira deveria apresentar para resultar em um produto final de alta qualidade, como também a melhor forma para seu processamento, para finalmente, definir as propriedades da madeira que deveriam ser avaliadas nos programas de melhoramento. Conhecendo-se a qualidade da matéria-prima e o processo a ser utilizado, é possível obter a otimização entre ambos e o produto final (CARRILHO, 1995). Assim, na indústria siderúrgica, os fatores mais importantes ligados às propriedades da madeira e que afetam a qualidade do carvão são a densidade da

madeira e o teor de lignina. O maior teor de lignina confere maior poder calorífico ao carvão vegetal, tornando-o mais eficiente no processo de fusão do minério de ferro. Da mesma forma, a alta densidade confere maior poder calorífico a um mesmo volume de madeira (BRITO; BARRICHELO, 1977; TRUGILHO et al., 2001). Para produtos de sólidos de madeira, exige-se propriedades físicas e mecânicas satisfatórias e uniformidade da madeira no sentido medula-casca, a fim de reduzir-se as rachaduras, fendas, empenamento, nós e colapsos. De acordo com Rocha e Tomaselli (2001), a taxa de conversão do volume total da tora em madeira serrada varia entre 45 e 55%, sendo que grande parte da perda durante o processamento é decorrente dos defeitos da madeira. Dessa forma, a seleção de clones menos sujeitos às tensões de crescimento, aliada à seleção de outras características importantes como baixa retratibilidade, desrama natural e boa usinabilidade, representam o caminho mais adequado para a obtenção de madeira de eucalipto para uso nas indústrias madeireira e moveleira (FERREIRA, 2003). A madeira que abastece a indústria de celulose e papel deve apresentar, basicamente, alto conteúdo de celulose, elevada proporção de fibras em relação aos demais elementos anatômicos, e baixos teores de extrativos e de umidade, visando a redução do custo da polpa através do maior rendimento (ASSIS, 1996).

Assim, os critérios de seleção para qualidade da madeira foram introduzidos e considerados um importante objetivo dos programas de melhoramento (POT et al., 2002). Qualidade da madeira somente pode ser definida em termos de uso final e particular, e pode envolver diversos caracteres. Para muitos caracteres da qualidade da madeira, há pouca informação disponível sobre o grau de variação genética e a herdabilidade. A densidade básica é a característica mais investigada, por ser facilmente mensurada e apresentar alta herdabilidade. Considerada isoladamente, constitui o melhor preditor de propriedades mecânicas da madeira (AMSTRONG et al., 1984; PANSIN; DE ZEEUW, 1980; ZOBEL; JETT, 1995), entretanto, por não ser a única característica envolvida, um dos objetivos do melhoramento florestal é acessar outros caracteres igualmente importantes. A Tabela 2 mostra as propriedades da madeira que vêm sendo consideradas pelos principais setores que utilizam matéria-prima de reflorestamento (RAYMOND, 2002).

Tabela 2 - Propriedades importantes da madeira indicadas para as principais classes de produtos

Papel e celulose	Madeira serrada	Madeira composta
Densidade básica	Densidade básica	Densidade básica
Rendimento da polpa	Ângulo microfibrilar	Conteúdo de lignina
Conteúdo de celulose	Estabilidade dimensional	Conteúdo de extrativos
Dimensões da fibra	Rachadura e colapso	Conteúdo de celulose
	Madeira de tensão	
	Incidência de trinca e grã espiral	

2.6 Melhoramento genético para polpa e papel

O maior mercado para a madeira de eucalipto é a indústria de celulose e papel. Os manufaturados de papel e polpa são focados no controle da qualidade da polpa e madeira através da seleção e melhoramento de árvores. A predição da qualidade da polpa e papel a partir das propriedades da madeira era limitada pela dificuldade em medir eficientemente características das fibras, como por exemplo, comprimento, largura e aspereza. O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu a caracterização rápida e eficiente de amostras da madeira (EVANS, 1994; EVANS et al., 1995; DOWNES et al., 1997; MUNERI; BALODIS, 1997), especialmente a mensuração de grandes variações nas propriedades da madeira que existem entre e dentro de clones, famílias, procedências e espécies, como também dentro de uma única árvore.

Diversos estudos demonstraram que algumas propriedades da fibra da madeira podem ter um efeito pronunciado no rendimento e na qualidade da polpa (EVANS et al., 1998; IVKOVICH; KOSHY, 2002; WIMMER et al., 2002). A composição química da fibra (lignina, extrativos e polissacarídeos) também deve ser considerada, uma vez que a proporção de seus componentes impõe conseqüências diretas nos custos de produção e na qualidade do produto final (POT et al., 2002). Modificações na composição química da madeira, particularmente a redução no conteúdo de lignina associada ao aumento no conteúdo de celulose, poderiam trazer diversas vantagens, como a diminuição do consumo de energia e químicos por unidade de madeira seca e o aumento no rendimento da polpa (ZICHUN et al., 2000). O entendimento da correlação entre

propriedades da fibra e composição química da madeira é de interesse primário para programas de melhoramento que objetivam aumentar a qualidade da polpa e papel.

Outro ponto importante nos programas de melhoramento é estimar a resposta correlacionada sobre propriedades-chaves da madeira a partir da seleção de outras características, como o crescimento. Para a maioria das propriedades da madeira, existe pouca informação sobre sua correlação com o crescimento da árvore, sendo estas mais relacionadas com diâmetro e densidade básica (WIMMER et al., 2002; TOLFO et al., 2005). Pot et al. (2002) observaram uma correlação genética negativa entre altura e densidade média em *Pinus pinaster*, e advertiram que a seleção realizada com base apenas na densidade da madeira poderia trazer consequências desastrosas, pois a cada 1% de ganho em altura, a densidade diminuiria em 0,24%. Além disso, este tipo de seleção também afetaria a composição química da madeira e as propriedades da fibra, levando a um aumento na razão lignina/celulose e diminuição na resistência das fibras.

Considerando o fato de que o eucalipto foi muito pouco trabalhado em relação às plantas cultivadas, pode-se inferir que novos ganhos poderão ser obtidos através do melhoramento genético tradicional, associado ao uso da bioengenharia florestal, contribuindo, assim, para a manutenção da competitividade do segmento de celulose e papel.

2.7 Biotecnologia florestal

É indiscutível a contribuição do melhoramento genético e da silvicultura para a formação de florestas altamente produtivas e com caracteres específicos ao uso final. Entretanto, os métodos tradicionais do melhoramento florestal enfrentam algumas limitações, como os longos ciclos reprodutivos das árvores, e a dificuldade em adquirir ganhos significativos para caracteres complexos, tais como propriedades da madeira, controle de pragas e doenças e tolerância a estresses abióticos. Neste contexto, a biotecnologia surgiu como uma alternativa potencial para alcançar progressos de forma mais rápida e para manipular e estudar caracteres até então desconhecidos. A biotecnologia de árvores tem recebido menos atenção quando comparada àquela

observada nas culturas agrícolas, mesmo sabendo-se que o impacto de sua utilização seria potencialmente maior na área florestal (MERKLE; NAIRN, 2005). Da mesma forma, por algumas décadas, a aplicação da biotecnologia em espécies florestais ficou limitada a um grupo restrito de coníferas, especialmente *Pinus* e *Picea*, devido a sua importância comercial em países do primeiro mundo. Entretanto, em diversas partes do planeta, florestas plantadas com angiospermas constituem a principal fonte de produtos florestais, e o uso de técnicas biotecnológicas nestas espécies revelou-se essencial para conseguir-se progressos em várias áreas de interesse. Para tanto, as angiospermas mostram algumas vantagens em relação às coníferas, como o grande potencial para reprodução vegetativa e o tamanho do genoma significativamente menor (os genomas de *Eucalyptus* e *Populus* possuem cerca de 550 Mpb, ao passo que o de *Pinus taeda* tem 15.480 Mpb), que lhes conferem ampla aplicabilidade na cultura de tecidos, transferência de genes, biologia molecular e genômica.

A maioria absoluta dos trabalhos sobre a aplicação de técnicas de biotecnologia nas angiospermas arbóreas está concentrada no gênero *Populus*, que de maneira equivalente ao *Eucalyptus* no Brasil, assume importância econômica fundamental na indústria de base florestal de diversos países europeus (França, Alemanha, Bélgica, Itália), caracterizados por serem altamente desenvolvidos e possuírem sólida estrutura de pesquisa. Dessa forma, *Populus* foi a primeira essência florestal a ser regenerada *in vitro* já no final dos anos 60, a primeira a ser geneticamente transformada (FILLATTI et al., 1987) e a primeira a ter o genoma totalmente sequenciado (BRUNNER et al., 2004).

As contribuições da biotecnologia ao gênero *Eucalyptus* são igualmente importantes, e trouxeram grande auxílio ao melhoramento convencional. As técnicas mais utilizadas no gênero são a propagação *in vitro* via organogênese, transformação genética, e uso de marcadores moleculares dominantes e codominantes para estudos de divergência genética e de seleção assistida. Nesta revisão, serão abordadas as tecnologias genômicas e pós-genômicas que têm sido aplicadas em espécies florestais para o estudo da formação da madeira.

2.8 Genômica

A aplicação da genômica vem proporcionando valiosa contribuição ao entendimento de diversos processos biológicos em espécies florestais, disponibilizando tecnologias sofisticadas para o sequenciamento genômico, sequenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags), e determinação do padrão de transcritos sob diferentes condições. A grande quantidade de dados gerados por estes métodos, juntamente com a necessidade de analisá-los, implicam na exigência de integrar a bioinformática em todos os aspectos da pesquisa genômica.

A construção de bancos de dados de ESTs espécie-específicos facilita a análise das proteínas codificadas por diversas partes do genoma, e permite a análise da expressão entre diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições ambientais (MERKLE; NAIRN, 2005). Como já comentado anteriormente, o desenvolvimento de fontes de seqüências de *Populus* é o mais avançado. Nerha et al. (2005) contabilizou o número de ESTs e de seqüências de DNA de comprimento total de *Populus tremula* e seus híbridos, gerados por grupos de pesquisa do mundo todo, assegurando que ultrapassa 270.000 seqüências, disponibilizadas no NCBI.

Para o *Eucalyptus*, existe uma proposta, ainda informal, de uma associação internacional de pesquisadores de universidades e indústrias, interessados no sequenciamento do seu genoma, o *Eucalyptus* Genome Initiative (www.ieugc.up.ac.za). No Brasil, há dois projetos de sequenciamento de ESTs de eucalipto, sendo que ambos não disponibilizaram os dados publicamente. O Genolyptus é uma iniciativa de diversas empresas do setor florestal, juntamente com universidades e órgãos nacionais de fomento à pesquisa, que resultou no sequenciamento de cerca de 150.000 ESTs (GRATTAPAGLIA, 2004; COMEÇA, 2006), provenientes de bibliotecas preparadas a partir de diversos tecidos e partes da planta, em diferentes estádios de desenvolvimento e sob tratamentos distintos, além de algumas bibliotecas de DNA genômico. Há também um registro de sequenciamento de 2500 ESTs expressos no xilema de *Eucalyptus globulus* (PAUX et al., 2004). O NCBI lista aproximadamente 2600 seqüências para *E. grandis* e 1800 para outras espécies do gênero (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006).

Passada a fase inicial dos projetos de sequenciamento, foi reconhecido que a descoberta de genes a partir da análise de ESTs não permitiria acessar todo o potencial que a abordagem genômica pode oferecer à pesquisa com gêneros florestais. Ficou evidente a necessidade de entender melhor os padrões de expressão de diferentes genes, uma vez que a frequência dos ESTs fornece uma interpretação incompleta sobre expressão gênica. Além disso, é mais interessante obter descrições temporal e espacial de padrões de expressão, e este tipo de informação é especialmente importante para pretensões biotecnológicas (BHALERAO et al., 2003). Dessa maneira, foram desenvolvidas diversas tecnologias para a análise da expressão gênica, que vêm sendo amplamente utilizadas em espécies florestais de interesse econômico, especialmente no estudo da formação da madeira, acessando genes expressos em cada fase do processo de diferenciação celular, que resulta no xilema secundário (BHALERAO et al., 2003).

2.9 Formação da madeira

A formação da madeira constitui um processo determinante para as espécies terrestres que produzem madeira, garantindo suporte mecânico e transporte de água e minerais da raiz para a parte aérea da planta, através das células do xilema. O sistema vascular origina-se do câmbio vascular, um meristema secundário que produz xilema e floema secundários, e é responsável pelo crescimento em diâmetro da planta. Em espécies arbóreas, o câmbio vascular apresenta uma característica singular, uma vez que é composto de dois tipos de células, as iniciais fusiformes e as iniciais radiais, que diferenciam-se em tipos distintos de células, estreitamente interconectadas para constituir o xilema secundário, ou madeira (CHAFFEY, 2002).

O desenvolvimento do xilema secundário, conhecido também como xilogênese, procede através de cinco eventos seqüenciais: divisão celular, alongação, biossíntese da parede celular, lignificação, e morte celular programada (CHAFFEY et al., 1999). Em cada fase, a expressão ordenada de famílias de genes é regulada por uma rede sofisticada de sinais ambientais e do desenvolvimento, influenciando a composição e a morfologia da parede celular do xilema, revelando-se o fator mais importante na determinação das propriedades da madeira (MEGRAW, 1985). Embora a madeira assuma fundamental importância econômica e ambiental, nosso entendimento sobre a

formação da madeira ao nível molecular é ainda restrito. A madeira é um modelo especializado para estudar a biossíntese da parede celular nas plantas (SEDEROFF et al., 1994), e o xilema em diferenciação é uma fonte rica de DNA, RNA e proteínas envolvidas na síntese de diversos compostos da parede. O objetivo atual é entender como os genes envolvidos na formação do xilema secundário influenciam o fenótipo final da madeira (YANG et al., 2004) e, para tanto, é importante compreender como eles são regulados durante a xilogênese.

Muitos desses genes têm sido identificados através de abordagens genômicas, aplicadas em sistemas modelo, como em *Zinnia elegans* (DEMURA et al., 2002), e *Arabidopsis thaliana* (OH et al., 2003), como também no tecido xilemático em desenvolvimento em *Pinus* (ALLONA et al., 1998; WHETTEN et al., 2001; LORENZ; DEAN, 2002), *Populus* (STERKY et al., 1998; HETZBERG et al., 2001; DEJARDIN et al., 2004; ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006) e *Eucalyptus* (PAUX et al., 2004; 2005). Avanços expressivos têm sido alcançados, utilizando-se o perfil dos transcritos para examinar padrões de expressão dos genes durante a xilogênese. Hetzberg et al. (2001), foram os pioneiros em estabelecer um padrão hierárquico da expressão gênica ao longo das diferentes zonas de desenvolvimento da madeira em uma angiosperma, através do isolamento de células em diferentes estádios de diferenciação. Um total de 2995 ESTs foram utilizados na análise de microarranjos de DNA. Os resultados mostraram que os genes que codificam para enzimas envolvidas na biossíntese de lignina e celulose, bem como um grande número de fatores de transcrição e reguladores potenciais da xilogênese, estão sob regulação transcricional restrita a estádios específicos do desenvolvimento. Paux et al (2004) avaliaram o padrão de transcritos de genes preferencialmente expressos no xilema de *Eucalyptus*, usando arranjos de cDNA a partir de uma biblioteca subtrativa, seguido da análise de RT-PCR em tempo real para confirmar a expressão. Os autores observaram que, dos 224 ESTs sequenciados, 81% foram preferencialmente expressos no tecido xilemático, e 33% mostrou homologia com proteínas de funções conhecidas, especialmente enzimas envolvidas na biossíntese e remodelagem da parede celular.

Em recente revisão sobre o assunto, Pilate et al. (2004) afirmaram que a madeira de tensão constitui um modelo para a aplicação da genômica funcional no estudo da

xilogênese. A madeira de reação é formada no tecido xilemático, em resposta à não orientação vertical do fuste causado por ventos dominantes, neve, terrenos inclinados e forma da copa assimétrica. Isso permite aos fustes serem reorientados, de modo a garantir a árvore uma posição favorável (Plomion et al., 2000). Uma biblioteca de ESTs preparada a partir de tecidos desenvolvendo madeira de reação em *Populus tremula* x *Populus tremuloides*, juntamente com dados do perfil de transcritos obtidos através da análise de microarranjos e de metabólitos, foram analisados por Andersson-Gunnerås et al. (2006), com o objetivo de identificar genes envolvidos na biossíntese de componentes da parede celular. As análises do transcrissoma e metaboloma sugeriram alterações nas atividades de diversas rotas metabólicas importantes, incluindo as modificações que ocorrem na biossíntese da parede secundária durante a formação de uma camada gelatinosa e rica em celulose (camada-G), característica do xilema expressando madeira de reação. Utilizando a tecnologia de macroarranjos de cDNA, Paux et al. (2005) identificaram em *Eucalyptus* 196 genes diferencialmente regulados entre árvores com fustes retilíneos (controle), e troncos submetidos à inclinação para induzir a formação da madeira de reação. Alguns desses genes exibiram padrões de expressão distintos durante a formação da madeira de reação, e podem estar relacionados com alterações na composição e estrutura da parede secundária, sendo indicados como genes candidatos para o controle da variação de caracteres relacionados a qualidade da madeira.

2.10 Proteômica

O termo “proteoma” surgiu em 1994, para designar o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de uma célula, em um determinado ambiente (ANDERSON; ANDERSON, 1996; WILKINS et al., 1995). A proteômica despontou como uma das vertentes da era pós-genômica, como resultado direto dos avanços conseguidos pelo sequenciamento em larga escala de DNA (PANDEY; MANN, 2000). Percebeu-se que o acúmulo de grande quantidade de seqüências nos bancos de dados não é suficiente para elucidar a função biológica. A existência de uma ORF (open reading frame) nos dados genômicos não implica, necessariamente, na existência de um gene funcional,

revelando a dificuldade de prever genes a partir de dados genômicos (DUNHAM et al., 1999; EISENBERG et al., 2000). A confiabilidade das ORFs preditas é considerada baixa, especialmente para genes pequenos ou genes com pouca ou nenhuma homologia com genes conhecidos (CASH, 2002), sendo importante a confirmação de um produto gênico através da análise proteômica.

O objetivo maior das abordagens proteômicas é contribuir para o entendimento global e integrado da biologia da célula, uma vez que muitas informações não podem ser obtidas apenas a partir do estudo dos genes. As proteínas são os agentes definitivamente responsáveis pelos fenótipos das células, e em função disso, torna-se impossível elucidar processos como, por exemplo, mecanismos de doença, envelhecimento e os efeitos do ambiente, somente pelo estudo dos genes (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Com efeito, a proteômica dedica-se ao estudo das propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). A descrição do proteoma de uma célula ou tecido fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições específicas e a localização dessas moléculas na célula (CASH, 1998).

No passado, a proteômica estava normalmente associada à exposição de um grande número de proteínas de uma célula ou organismo em géis bidimensionais. Neste sentido, os primeiros estudos que podem ser incluídos em proteômica datam dos anos 70, quando pesquisadores iniciaram o mapeamento de proteínas de alguns organismos e construíram os primeiros bancos de dados de proteínas (O'FARREL, 1975; KLOSE, 1975; SCHEELE, 1975). Embora muitas proteínas pudessem ser isoladas e visualizadas em géis, elas não podiam ser identificadas, pois não havia uma tecnologia de sequenciamento suficientemente sensível. Neste sentido, o primeiro método desenvolvido foi o sequenciamento de Edman, que consiste na leitura dos aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína (EDMAN, 1949). Este método foi e ainda é amplamente utilizado para identificar proteínas, após a transferência destas para membranas de PVDF (AEBERSOLD et al., 1986). Entretanto, existe uma grande limitação no emprego da química de Edman para o sequenciamento de proteínas – a

leitura dos aminoácidos só pode ser efetuada se a extremidade N-terminal da proteína estiver livre. No entanto, estima-se que 50 a 70% das proteínas apresentam sua extremidade bloqueada, como resultado de modificações sofridas durante sua purificação (HENZEL et al., 1993).

Atualmente, a proteômica envolve a análise funcional dos produtos gênicos ou “genômica funcional”, incluindo a identificação em larga escala, localização e compartimentalização das proteínas, e estudos de redes de interação de proteínas (AEBERSOLD; MANN, 2003). A abertura à estas linhas de pesquisa só foi possível a partir do final dos anos 80, com o desenvolvimento da espectrometria de massa de biomoléculas. Esta tecnologia substituiu o método de degradação de Edman porque é muito mais sensível e é capaz de fragmentar peptídeos em segundos, ao invés de horas ou dias (WILM; MANN, 1996). Além disso, a espectrometria de massa não exige a purificação prévia de proteínas ou peptídeos por cromatografia líquida, e não apresenta problemas na identificação de proteínas com extremidades bloqueadas ou modificadas (STEEN; MANN, 2004). Nos últimos anos, os grandes avanços trazidos pelo desenvolvimento dos métodos de ionização branda, como a ionização por eletrospray (FENN et al., 1989) e a ionização MALDI (KARAS; HILLENKAMP, 1988) foram determinantes no estabelecimento da espectrometria de massa, não somente como a ferramenta definitiva para determinar a estrutura primária das proteínas, mas também como a tecnologia central no campo da proteômica.

Os espectrômetros de massa são constituídos, basicamente, de três elementos: (i) uma fonte de ionização, que promove a ionização dos peptídeos e transfere estes íons da solução, onde se encontram, para a fase gasosa; (ii) um ou mais analisadores de massa, os quais separam os íons de acordo com suas massas e cargas; (iii) um detector, cuja função é contabilizar e registrar todos os íons que chegam até ele (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Os espectrômetros disponíveis no mercado são combinações das diversas estratégias de fontes de ionização e analisadores de massa. Normalmente, estes equipamentos oferecem dois tipos de análise de proteínas - *mass fingerprinting* e *tandem mass spectrometry*. Na análise *mass fingerprinting*, os valores de massa/carga dos peptídeos individuais de uma mistura são mensurados e convertidos em valores de massa, que dispostas em uma determinada ordem, que é

única, correspondem aos peptídeos que compõem a proteína (BURLINGAME et al., 1998). A “impressão digital” das massas determinadas pelo espectrômetro é então comparada às massas dos peptídeos geradas pela digestão hipotética de cada proteína do banco de dados, levando à identificação da proteína (BALDWIN, 2004). Esta abordagem permite identificar e caracterizar proteínas em larga escala, tendo sido desenvolvida por Henzel et al. (1993) e imediatamente difundida e utilizada em laboratórios do mundo todo (PORUBLEVA et al., 1996; KERIM et al., 2003; RENAUT et al., 2004). A análise *tandem mass spectrometry* permite obter a seqüência dos aminoácidos que constituem uma proteína, em dois passos: no primeiro, todos os peptídeos da amostra são separados pelos analisadores de massa, gerando um espectro relacionando os valores de massa/carga x intensidade dos íons. Na segunda etapa, apenas o íon de interesse é selecionado e fragmentado por colisão com um gás inerte, resultando em um novo espectro, onde a diferença de dois íons adjacentes corresponde, em massa, a um aminoácido (AEBERSOLD; MANN, 2003). Esta abordagem foi primeiramente utilizada por Shevchenko e colaboradores (1996), para identificar proteínas em *E. coli*, e desde então, tem sido amplamente empregada em estudos proteômicos de diferentes organismos.

Os estudos proteômicos estão muito avançados em determinadas áreas de pesquisa, como na medicina, para o estudo do câncer humano (WULFKUHLE et al., 2004) e para a identificação de biomarcadores visando o diagnóstico precoce de doenças (CHIGNARD; BERETTA, 2004). Na indústria farmacêutica, os objetivos são o desenvolvimento de novas drogas e a caracterização de novos alvos farmacológicos. A proteômica de plantas está ainda em sua fase inicial, e as pesquisas estão focadas na identificação de proteínas diferencialmente expressas em resposta a diversos tipos de estresse (BEYER et al., 2002; BAE et al., 2003; CAMPO et al., 2004; YAN et al., 2006), sendo também observados estudos envolvendo outros temas. Mathesius et al. (2001), tiveram como objetivo, identificar proteínas envolvidas no estabelecimento e na manutenção da interação simbiótica entre a leguminosa *Medicago truncatula* e *Sinorhizobium meliloti*, uma bactéria fixadora de nitrogênio. Utilizando a análise do *mass fingerprinting*, foram identificadas 179 proteínas expressas na raiz inoculada, sendo as mais abundantes relacionadas ao metabolismo da planta, defesa e resposta ao estresse

e processamento de outras proteínas. Utilizando várias técnicas de extração de proteínas, seguida da separação por eletroforese bidimensional e análise por espectrometria de massa. Davis et al. (2005) geraram um mapa de proteínas do pólen maduro de *Arabidopsis thaliana*. Os autores identificaram 135 proteínas, a maioria necessária para a estrutura da célula. Deste total, apenas três proteínas foram específicas do grão-de-pólen, sendo que uma delas apresentou múltiplos sítios de fosforilação, sugerindo que sofreu uma modificação pós-traducional.

O estudo da xilogênese ficou limitado, no início, ao isolamento de proteínas por eletroforese bidimensional (MIJNSBRUGGE et al., 2000; PLOMION et al., 2000), seguido da identificação por análise de microsequência. Recentemente, a espectrometria de massa moderna passou a ser utilizada na identificação em larga-escala de proteínas envolvidas na formação da madeira, sendo ainda raros os trabalhos na área (GION et al., 2005; ANDRADE, 2006; CELEDON, 2006). Gion et al. (2005) utilizaram dois modelos de espectrômetro de massa, que diferenciam-se na forma de ionização dos peptídeos (eletrospray e Maldi), para identificar proteínas expressas no xilema secundário em *Pinus*. Os autores verificaram que 67,9% dos *spots* analisados foram identificados, o que pode ser considerada uma taxa elevada de aproveitamento. Andrade (2006) e Celedon (2006) utilizaram um espectrômetro do tipo Q-TOF (*Quadrupole/Time-of-Flight*), para sequenciar proteínas do xilema de *Eucalyptus*, previamente separadas em géis 2D, e conseguiram taxas de identificação semelhantes a do trabalho anterior. Os resultados destes estudos serão apresentados no item 4 do presente trabalho, onde servirão de base para a discussão de alguns resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem do material biológico

A coleta das amostras foi realizada em uma área de plantio comercial da Suzano Papel e Celulose, localizada no município de São Miguel Arcanjo, Estado de São Paulo. O material vegetal consistiu de uma progênie de meios-irmãos de *Eucalyptus grandis* da matriz M33, aos 6,3 anos de idade. A região cambial, objeto de estudo do presente trabalho, foi caracterizada por células do câmbio vascular, e pelas primeiras camadas de células diferenciadas em floema e xilema secundários (Figura 2).

Figura 2 - Região cambial amostrada na madeira de eucalipto, formada por células do câmbio vascular, do floema (F) e do xilema (X) secundários

Para proceder a amostragem baseada em Goffner et al. (1992), 50 árvores foram escolhidas ao acaso, nas quais foram abertos painéis à 1,60 m de altura do solo, seguido da raspagem da casca interna e da superfície do fuste com o auxílio de uma lâmina de aço. À medida que o material foi retirado, este foi mantido em nitrogênio líquido (-196°C), para evitar a degradação das proteínas (Figura 3). O material coletado de todos os indivíduos foi homogeneizado, constituindo uma amostra representativa da região cambial no estágio avançado de desenvolvimento. Ainda no campo, o material foi grosseiramente macerado, com a finalidade de ser quebrado em cavacos menores para

facilitar sua maceração definitiva, e mantido em gelo seco. De volta ao laboratório, as amostras foram devidamente acondicionadas a -80°C .

Figura 3 - Amostragem do material biológico. (A) abertura do painel no tronco; (B) coleta das camadas superficiais de células no fuste; (C) retirada da amostra e imediata imersão em nitrogênio líquido

3.2 Extração de proteínas

Foram avaliadas duas metodologias distintas para extrair as proteínas da região cambial do eucalipto, a fim de verificar aquela que proporcionasse a obtenção de extratos protéicos mais concentrados e livres de contaminantes. Dessa maneira, foram testados os métodos de extração com ácido tricloroacético e com fenol, descritos abaixo.

3.2.1 Extração com ácido tricloroacético

As proteínas da região cambial foram extraídas de acordo com o procedimento descrito por Damerval et al. (1986). O material vegetal foi macerado com pistilo em um almofariz contendo nitrogênio líquido, até se desfazer completamente e se transformar em um pó fino. Este foi transferido imediatamente para tubos contendo 10 ml da solução de precipitação, preparada com 10% (p/v) de ácido tricloroacético e 0,07% (v/v) de β -mercaptoetanol em acetona, e acondicionada a -20°C . Após homogeneização do macerado, os tubos foram mantidos por 1 hora, a -20°C , seguidos de centrifugação por 15 min, $16000 \times g$, -20°C . O *pellet* resultante foi lavado em 10 ml da solução 0,07% (v/v)

de β -mercaptoetanol em acetona, também resfriada a -20°C . Novamente, os tubos foram acondicionados a -20°C por 1 hora, e centrifugados nas mesmas condições anteriores. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi seco em um dissecador ligado a uma bomba de vácuo, até a eliminação completa da acetona, e solubilizado em tampão preparado com 7 M uréia, 2 M tiuréia, 0,4% (v/v) Triton X-100, 10 mM DTT e 4% (p/v) CHAPS, seguindo a proporção de 10 μl de tampão para cada miligrama de amostra.

3.2.2 Extração com fenol

Foi utilizada a metodologia desenvolvida por Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações propostas por Saravanan e Rose (2004). Cerca de 2,0 g de amostra foram macerados em nitrogênio líquido até a formação de uma pasta bem fina. Adicionou-se 10 ml do tampão de extração, preparado com 0,7 M sacarose, 0,1 M KCl, 0,5 M Tris-HCl pH=7,5, 2% (v/v) β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), 50 mM EDTA, e 1% (p/v) PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) e a mistura foi homogeneizada a 4°C , por 30 minutos. Em seguida, o mesmo volume de fenol saturado em Tris-HCl pH=7,5 foi acrescentado. A mistura foi novamente agitada por 30 minutos, e finalmente centrifugada a 4°C , 10.000 x g, por 30 minutos. A fase superior foi recuperada e extraída três vezes com o mesmo tampão de extração. Em seguida, as proteínas foram precipitadas em cinco volumes de 0,1 M acetato de amônio em metanol, por 12 horas, a -20°C . Após esse período, o precipitado foi lavado três vezes com 20 ml de uma solução de acetato de amônio (0,1 M) em metanol, e uma vez em 20 ml de acetona (80% v/v). Em cada uma das etapas, as proteínas foram lavadas e precipitadas por 1 hora a -20°C , e centrifugadas nas mesmas condições. O *pellet* de proteínas, resultante da extração de 2 g de amostra, foi seco a 4°C , em um dissecador ligado a uma bomba de vácuo, e ressuspensionado em 250 μl de tampão de solubilização, composto de 7 M uréia, 2 M tiuréia, 10 mM DTT e 0,4% (v/v) Triton X-100.

3.3 Quantificação do extrato protéico

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o Kit Biorad Protein Assay

(BioRad), baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma mistura preparada com 10 µl do extrato protéico, 10 µl de HCl (0,1 N), 80 µl de H₂O Milli-Q e 3,5 ml do corante foi homogeneizada em um tubo de vidro. Após 5 minutos de reação, esta foi transferida para uma cubeta de vidro e colocada no espectrofotômetro para efetuar a leitura da absorbância no comprimento de 595 nm. O valor acusado foi interpolado em uma curva de calibração, construída com a mesma metodologia, utilizando-se a proteína BSA (albumina de boi) como padrão.

3.4 Minigéis

Após a realização de cada série de extração, seguida da ressuspensão e quantificação das proteínas, foi preparado um gel de 10 cm x 8,5 cm (Mini-PROTEAN II Cell, Bio Rad), com o objetivo de confirmar o perfil de expressão característico das proteínas da região cambial, visto como um recurso para verificar se a extração foi bem sucedida. As proteínas foram desnaturadas em tampão de 0,5 M Tris-HCl pH=6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1% (p/v) Bromofenol blue, por 1 min a 95°C. Em seguida, foram submetidas à eletroforese. As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida (4% p/v), e submetidas a uma corrente inicial de 50 V, por 15 minutos, antes de migrarem no gel de corrida, preparado com 12,5% (p/v) de acrilamida, a 70 V por 2 horas, em tampão Laemmli inferior (25 mM Tris, 192 mM glicina) e superior (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS).

3.5 Preparação dos géis bidimensionais

3.5.1 Focalização isoelétrica (IEF)

Para a aplicação das amostras nos géis de IEF, 100 µl de extrato protéico, contendo cerca de 500 µg de proteínas, foram diluídos em 400 µl de tampão de focalização, cuja formulação variou de acordo com a faixa de pH utilizada para separar as proteínas. As proteínas resolvidas em fitas de acrilamida (IPG strips, Amersham Biosciences) 17 cm, pH 3-10, foram solubilizadas em tampão composto de 7 M uréia, 2

M tiuréia, 20 mM DTT, 0,4% (v/v) Triton X-100, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v) anfólitos pH 3-10 e 0,25% (v/v) anfólitos pH 4-7 (IPG buffer, Amersham Biosciences), ao passo que aquelas focalizadas em fitas de pH 4-7 foram diluídas em 7 M uréia, 2 M tiuréia, 20 mM DTT, 0,4% (v/v) Triton X-100, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v) anfólitos pH 4-7 e 0,25% (v/v) anfólitos pH 3-10. A focalização foi conduzida no IPGphor (Amersham Biosciences) à corrente constante de 50 μ A por fita. O programa de focalização incluiu os seguintes passos: 12 h de reidratação a 50V, 100 V por 1 h, 200V por 1 h, 400 V por 1 h, 700 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 5000 V por 16h e 8000 V até atingir 72.000 Vh. Após a focalização, as fitas foram estocadas a -80°C.

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a focalização isoeletrica, as fitas foram equilibradas por 15 min em 3 ml da solução 1 (50 mM Tris-HCl pH=8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 2% DTT) e por mais 15 minutos em 3 ml da solução 2 (50 mM Tris-HCl pH=8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 2% iodoacetamida), a fim de promover a redução e a alquilação das proteínas, respectivamente. Para proceder a eletroforese da segunda dimensão, as fitas foram transferidas para géis de acrilamida (12,5% p/v), colocados em cubas SE-630 (Amersham Biosciences) contendo tampão de corrida pH=8,3 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicine, 0,1% (p/v) SDS). As proteínas migraram sob campo eletroforético de 30 mA por gel, a 4°C, por aproximadamente 4 horas.

3.6 Coloração dos géis

Os géis foram corados de acordo com o protocolo descrito por Consoli et al. (2001). A etapa de fixação consistiu na imersão dos géis em solução de 3% (v/v) de ácido fosfórico em 50% (v/v) etanol, cumprida em dois passos de 1 hora cada. Em seguida, os géis foram lavados em 2% (v/v) de ácido fosfórico por 1 hora. Após o descarte do líquido, acrescentou-se a solução de coloração, preparada com 2% (v/v) ácido fosfórico, 15% (p/v) sulfato de amônio, 17% (v/v) etanol e 0,1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue G-250), durante 12 horas. Finalmente, os géis foram lavados em H₂O Milli-

Q e estocados em 15% (p/v) de sulfato de amônio. A concentração do ácido fosfórico utilizado neste procedimento foi de 85%.

3.7 Digestão das proteínas

As proteínas resolvidas por eletroforese bidimensional foram digeridas com base no procedimento descrito no kit Montage In-Gel Digest (Millipore), incluindo diversas modificações. Os *spots* de proteínas foram recortados do gel, picados em pedaços menores e transferidos para tubos plásticos. A descoloração foi realizada em três etapas – a primeira, em 5% (v/v) de acetonitrila (ACN) em 25 mM bicarbonato de amônio por 30 minutos, seguido de duas lavagens com 50% (v/v) de ACN em 25 mM de bicarbonato de amônio, por tempo suficiente para que o gel ficasse totalmente transparente. A solução foi descartada e os géis foram desidratados com 20 µl de 100% (v/v) de ACN, durante 10 minutos. O excesso do solvente foi descartado dos tubos e estes permaneceram abertos para a secagem dos fragmentos de gel. Em seguida, estes foram reidratados com 80 µl de uma solução de 20 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio, em banho a 60°C por 45 minutos. O excedente de DTT foi removido e 50 µl de solução de 55 mM iodoacetamida em 50 mM bicarbonato de amônio foi adicionado aos tubos, que foram deixados no escuro por 40 minutos, a fim de promover a alquilação das proteínas. Após este período, a solução foi descartada, e os fragmentos de acrilamida foram lavados duas vezes em 300 µl de 50 mM bicarbonato de amônio, por pelo menos 1 hora cada vez. Os fragmentos de gel foram novamente desidratados em 100% (v/v) de ACN, e receberam, após sua secagem, uma solução de 15 ng/µl de tripsina em bicarbonato de amônio (25 mM). Após 15 minutos de reidratação, o excesso de tripsina foi removido, e um volume suficiente para cobrir os fragmentos de acrilamida, de 25 mM bicarbonato de amônio, foi adicionado. Os tubos foram acondicionados a 37°C pelo período de 12 a 14 horas, a fim de ocorrer a digestão *in-gel* das proteínas.

Após a digestão, o que restou da solução foi transferido para um novo tubo. Os géis passaram por uma série de lavagens para promover a eluição dos peptídeos: 60% (v/v) de ACN em 1% (v/v) de ácido fórmico (duas vezes), 100% (v/v) de ACN, 60% (v/v) de metanol em 0,1% (v/v) de ácido fórmico (duas vezes), 100% (v/v) de ACN, 1% (v/v)

de ácido trifluoroacético e 100% (v/v) de ACN. O volume das soluções foi colocado em quantidade suficiente para cobrir os géis (cerca de 15 a 20 μ l) e, após a adição de cada uma delas, os tubos foram sonicados em banho-maria a 45°C, por 30 minutos. O volume recuperado em cada etapa foi transferido para o mesmo tubo no qual estava o excedente da solução de tripsina. Ao final do processo, o volume total foi reduzido por vácuo no concentrador (Eppendorf, modelo 5301), a fim de agrupar os peptídeos recuperados. O volume final foi ajustado para 30 μ l com 1% (v/v) de ácido fórmico, e transferido para um tubo apropriado para a análise por espectrometria de massa.

3.8 Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa – LC/MS/MS

A solução contendo os peptídeos foi analisada em um espectrômetro de massa caracterizado por uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), dois analisadores de massas - um quadrupolo (Q), associado a um tubo no qual se mede o tempo de voo dos íons (TOF) e um detector de íons. Acoplado *on-line* ao Q-TOF (Ultima API, Micromass), um sistema de cromatografia capilar (CapLc XE Pump, Waters) foi primeiramente utilizado, a fim de promover a desanilização da amostra em uma pré-coluna C18 (Sentry Guard, Waters), seguida da retenção dos peptídeos em uma coluna de fase reversa C18 0,32 x 150 mm I.D. (Symmetry, Waters). Em seguida, os peptídeos foram eluídos a 5 μ l/min nos quinze minutos iniciais, passando a 2 μ l/min de 15 a 40 minutos, e novamente a 5 μ l/min entre 40 e 45 minutos de corrida, através da variação nos gradientes do tampão A (95% (v/v) de H₂O, 5% (v/v) de acetonitrila e 0,1% (v/v) de ácido fórmico) e do tampão B (95% (v/v) de acetonitrila, 5% (v/v) de H₂O e 0,1% (v/v) de ácido fórmico), ao longo de 45 minutos de corrida. O gradiente do tampão B adotado para a eluição dos peptídeos da coluna é apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Variação da concentração do tampão B no decorrer da aquisição de uma amostra. De 10-15% em 5 min; 15-30% em 20 min; 35-45% em 5 min; 45-80% em 5 min, 80% por 5 min; e 10% por 5 min

Para proceder a análise MS, os peptídeos recuperados da coluna foram ionizados por eletrospray a uma voltagem fixa de 3000 volts, temperatura de 90°C e 5 psi de gás nitrogênio, e em seguida, foi determinada a razão massa sobre carga (m/z) de cada um deles. O primeiro filtro de massas quadrupolo selecionou os íons dupla e triplamente carregados que apresentaram alta contagem, os quais foram direcionados para a análise MS/MS. Estes foram fragmentados com 15 psi de gás argônio na célula de colisão, resultando no sequenciamento ordenado dos aminoácidos para cada fragmento peptídico isolado.

O Q-TOF modelo Ultima API, utilizado nas análises, conta com o sistema Nanolock Spray (Micromass), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição de uma amostra. Durante o trabalho, todas as aquisições foram calibradas com o peptídeo padrão GFP (GLU¹-fibrinopeptide B), injetado automaticamente com fluxo de 0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ e concentração de 100 fmol/ μl .

3.9 Análise dos espectros de massas

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento das amostras foram processados pelo programa ProteinLynx v 2.1 (Micromass), de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 5 e 6.

Tabela 3 - Tipos de modificações considerados no processamento dos espectros de massas

Modificações	Modificações	Modificações
Acetyl K	Flavin-adenine dinucleotide CH	O-GlcNac ST
Acetyl N-TERM	Formyl N-TERM	Oxidation M
Amidation C-TERM	Gamma-carboxyglutamic acid E	Palmitoyl CST
Biotin K	Geranyl-geranyl C	Phosphopantetheine S
Carbamidomethyl C	Glycation N-TERM	Phosphoryl STY
Carbamyl K	Hydroxyl DKNP	Propionamide C
Carbamyl N-TERM	Lipoyl K	Pyridoxal phosphate K
Carboxymethyl C	Methyl CDEHKNRQ	Pyrrolidone carboxylic acid
C-Mannoyl W	Methyl N-TERM	S-pyridylethyl C
Deamidation N	Methyl C-TERM	SMA K
Deamidation Q	Myristoyl K	SMA N-TERM
Dehydratation ST	Myristoyl N-TERM	d0 C
Farnesyl C	NIPCAM C	d8 C

Figura 5 - Parâmetros determinados para a identificação dos spots na base de seqüências peptídicas Swiss Prot, pelo programa ProteinLynx

Figura 6 - Parâmetros determinados para a identificação dos *spots* na base de ESTs Genolyptus, pelo programa ProteinLynx

3.10 Identificação nos bancos de dados

As microseqüências determinadas experimentalmente foram contrastadas com dois bancos de dados: (i) O SWISS PROT é uma base pública formada por seqüências peptídicas de centenas de espécies de plantas, animais, bactérias e fungos. Para cada proteína depositada, o banco disponibiliza uma série de informações, como a anotação funcional, a descrição da estrutura, domínio conservado e modificações pós-traducionais; (ii) O GENOLYPTUS é uma base de ESTs específicos de *Eucalyptus* spp., construído em parceria por empresas do setor florestal e instituições de pesquisa. O banco mantém cerca de 150.000 seqüências nucleotídicas provenientes de bibliotecas de diversos tecidos e espécies do gênero, em diferentes estádios de desenvolvimento: folhas jovens de *E. grandis*, folhas maduras de *E. grandis*, plântulas de *E. grandis* saudáveis e submetidas ao estresse, tecidos de *E. grandis* em condições normais e infectados por *Puccinia*, xilema de *E. globulus*, *E. grandis*, *E. pellita* e *E. urophylla*,

mistura de várias espécies; além disso, complementam o banco duas bibliotecas de DNA genômico (fragmentos longos e curtos) de *E. grandis*.

A partir do GENOLYPTUS, foi construído um banco de dados de *tags* (sequências de 10 pares de bases correspondentes aos mRNAs expressos), de uso restrito do Laboratório Max Feffer (Esalq/USP). Utilizando a tecnologia SAGE (análise serial de expressão gênica), foram construídas bibliotecas da região cambial da madeira de eucalipto em três fases de desenvolvimento: 6 meses, 3 anos, 6 anos. O banco, denominado *Eucalyptus* DATABASE, reúne 44.678 *tags* de mRNAs, presentes em duas ou mais cópias, e 1.561 genes anotados.

As seqüências peptídicas foram comparadas com o banco de dados GENOLYPTUS, traduzido pelo algoritmo tBlastn (NCBI), resultando no fornecimento de um *contig* correspondente. A seqüência deste *contig* foi buscada no *Eucalyptus* DATABASE, e submetida à análise de Blastx (NCBI), cujo resultado listou a anotação funcional e as espécies com maior homologia. A busca de peptídeos no SWISS PROT (2005, 2006) foi simples e direta, uma vez que as seqüências foram automaticamente contrastadas com o banco e identificadas através do Blastp (NCBI). A seqüência de operações que levaram à identificação das proteínas pode ser melhor entendida com o auxílio da Figura 7.

Figura 7 - Operações da bioinformática utilizadas para identificar as proteínas da região cambial da madeira

3.11 Análise das imagens dos géis

Três géis bidimensionais pH 4-7 foram preparados conjuntamente, desde a extração das proteínas da região cambial, seguida pela focalização isoeletrica e separação das moléculas em corrida eletroforética, a fim de se eliminar qualquer tipo de variação no perfil de expressão dos *spots* que fosse proveniente destas fontes. Os géis foram digitalizados no “Image scanner” UTA-1100 (Amersham Biosciences) e suas imagens foram analisadas pelo programa Image Master™ 2D Platinum versão 5.0 (Amersham Biosciences). Os géis foram submetidos aos mesmos parâmetros de detecção, realizada automaticamente pelo programa, seguida da edição manual, através de deleções e adições de *spots*. Os géis foram alinhados a partir de dois *spots* que mostraram boa reprodutibilidade, revelando os *spots* comuns a cada par deles. Para cada *spot* foi determinado o volume relativo médio, ou seja, a média do volume do *spot* nos géis *a*, *b*, e *c* foi dividida pelo somatório do volume de todos os *spots* do gel, com a finalidade de fazer inferências sobre o nível de expressão de cada proteína identificada na região cambial. Por fim, foram adicionados valores de peso molecular (PM) e ponto isoeletrico (pI) a cinco *spots* com boa reprodutibilidade nos géis, a fim de servirem como referência ao programa para a determinação automática dos p/s e PMs de todos os *spots*. Os PMs e p/s experimentais, referentes aos *spots* identificados por LC/MS/MS, foram comparados aqueles teóricos, disponibilizados no SWISS PROT.

3.12 Abundância de proteína x mRNA

Com o propósito de correlacionar níveis de mRNA aos de proteína, considerou-se nesta análise, o volume relativo dos *spots* correspondentes às 23 proteínas mais abundantes, determinado pela média do volume de um mesmo *spot* em três géis bidimensionais. Os *spots* correspondentes à mesma anotação funcional tiveram seus volumes somados, a fim de se obter o volume total de proteínas que desempenham a mesma função, exceto para aquelas caracterizadas por subunidades distintas, que foram consideradas separadamente. A abundância de mRNA foi estimada para as anotações funcionais baseada no trabalho de Davis et al. (2005), através da contagem

do número de tags correspondentes, seguida da transformação destes dados em valores relativos ao total de transcritos da biblioteca SAGE, construída a partir do mesmo material biológico, na mesma fase do desenvolvimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostragem do material biológico

O procedimento utilizado para amostrar o material no campo foi avaliado em relação à sua eficiência e outros aspectos. Em uma experiência anterior, cujo objetivo foi amostrar a madeira de eucalipto para a construção de uma biblioteca de ESTs, a metodologia utilizada consistiu no abate das árvores, seguido da retirada de discos de madeira ao longo do fuste e imediato congelamento destes em nitrogênio líquido. As dificuldades revelaram-se durante a maceração do material, que se apresentou em pedaços grandes e muito endurecidos pelo congelamento, fazendo-se necessário realizar primeiramente a raspagem da madeira com o auxílio de uma grosa. O método mostrou-se eficiente, porém, extremamente laborioso e demorado.

Para representar a região cambial seria necessário retirar a casca e coletar o tecido de sua parte interna (floema), como também das primeiras camadas de células do fuste (câmbio vascular e xilema em desenvolvimento). Neste caso, foi ponderado que a utilização do método destrutivo acarretaria em grande desperdício de árvores abatidas e inutilizadas, uma vez que a maior parte da madeira (xilema) não seria amostrada. O procedimento descrito por Goffner et al. (1992) para amostrar o xilema em *Eucalyptus gunnii*, foi adaptado para que a região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis* fosse devidamente caracterizada. Esta metodologia foi empregada em diversos estudos relacionados aos mesmos tecidos em espécies florestais (COSTA et al., 1999; GRIMA-PETTENATI et al., 1993; PAUX et al., 2004, 2005; PLOMION et al., 2000, 2003; GION et al., 2005).

O método revelou-se simples e prático, proporcionando a coleta de grande quantidade de amostra em curto período de tempo. Em função disso, um número significativo de árvores foi considerado no tamanho amostral, garantindo representatividade suficiente dos tecidos da região cambial em uma população de meios-irmãos. Por ser um método não-destrutivo, oferece ao pesquisador a possibilidade de planejar experimentos no tempo, como por exemplo, realizar coletas em diferentes estações do ano ou em uma mesma estação em anos alternados, a fim

de acompanhar a expressão gênica e protéica da planta durante o seu ciclo de desenvolvimento. Do ponto de vista econômico, o uso deste procedimento também é interessante, pois, ao final dos experimentos, as árvores podem ser novamente direcionadas ao seu aproveitamento na indústria, pois reconstituem os tecidos amostrados e formam nova casca.

4.2 Testes preliminares

4.2.1 Métodos de extração de proteínas

As etapas mais críticas em estudos proteômicos de plantas concentram-se na extração e preparação da amostra, pois de maneira geral, os tecidos vegetais são ricos em proteases e materiais que interferem na separação e análise das proteínas, incluindo polissacarídeos, lipídios, compostos fenólicos e produtos secundários (GRANIER, 1988). Estes contaminantes representam um grande inconveniente para a eletroforese bidimensional, pois são revelados em géis caracterizados por listras verticais e horizontais e elevado resíduo do corante, resultando na redução do número de proteínas resolvidas.

No início do trabalho, as proteínas foram extraídas de acordo com Damerval et al. (1986). O protocolo, que utiliza ácido tricloroacético (TCA) para solubilizar proteínas, já havia sido ajustado para os tecidos da região cambial nos estádios juvenil e intermediário. De maneira semelhante, embora simples e factível, o método revelou-se pouco eficiente para o mesmo material na fase avançada do desenvolvimento (6 anos), apresentando rendimento muito inferior ao ideal. A partir de 2,0 g de tecido foi possível obter-se extratos protéicos em concentrações entre 0,5 e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, muito aquém da necessidade do experimento. Imaginando dispor de cerca de 500 μg de proteína para o carregamento de cada gel bidimensional, seriam necessárias quantidades inviáveis de material biológico e sucessivas baterias de extração para alcançar o total requerido de proteínas.

A solução mais coerente foi buscar outra metodologia de extração, a fim de equacionar o rendimento da mistura protéica e viabilizar sua separação em eletroforese

bidimensional. Foi testado o protocolo desenvolvido por Hurkman e Tanaka (1986), com adaptações de Saravanan e Rose (2004), no qual as proteínas são solubilizadas em fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol. Os resultados foram muito positivos – a partir da mesma quantidade de material obteve-se, em média, extratos com 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, aumentando a eficiência da extração em quase 3 vezes. Diante da dúvida de que o elevado rendimento proporcionado pela extração com fenol pudesse ser justificado pela solubilização de outros tipos de proteínas e não das mesmas extraídas com TCA, procedeu-se a comparação do perfil das proteínas resolvidas pelos dois métodos em um minigel de acrilamida (Figura 8). Foi verificado que os padrões de expressão foram muito semelhantes, sendo visualizadas basicamente as mesmas proteínas, comprovando a maior eficiência do método de extração fenólica.

Figura 8 - Proteínas da região cambial da madeira de eucalipto com 6,3 anos de idade, extraídas com (A) ácido tricloroacético e (B) fenol, separadas em gel 12,5% acrilamida e coradas com 1% nitrato de prata

Com a finalidade de verificar a presença de resíduos de ácidos nucleicos nos extratos protéicos resultantes dos dois métodos de extração, um gel de agarose foi carregado com proteínas e corado com brometo de etídio (Figura 9). A fotografia do gel mostra claramente que a extração com TCA não proporciona a limpeza completa da amostra, permanecendo contaminantes e DNA preso à canaleta. Ao contrário, a fase superior da amostra extraída com fenol não apresentou contaminantes. As proteínas são solubilizadas na fase superior (fenólica) enquanto os ácidos nucleicos permanecem na fase inferior (aquosa), a qual é descartada (HURKMAN; TANAKA, 1986). Assim, o método de extração com fenol passou a ser utilizado com sucesso para a obtenção de

extratos protéicos da região cambial em outras fases do desenvolvimento (ANDRADE, 2006; CELEDON, 2006). A extração fenólica de proteínas também foi usada no xilema de *Populus* (MIJNSBRUGGE et al., 2000) e em diversos tecidos de tomateiro, polpa de banana e casca de laranja (SARAVANAN; ROSE, 2004).

Figura 9 - Gel 1,2% agarose carregado com 5 μ g de proteínas e corado com brometo de etídio. Proteínas extraídas com (1) ácido tricloroacético e (2) fenol, fracionado nas fases fenólica (2A) e aquosa (2B). O círculo na canaleta 1 mostra os contaminantes retidos.

4.2.2 Preparação e coloração dos géis bidimensionais

Os primeiros géis bidimensionais produzidos neste trabalho foram corados com nitrato de prata de acordo com Blum et al. (1987), devido à sua elevada sensibilidade de detectar proteínas. No entanto, os *spots* revelados com prata mostraram baixa recuperação de peptídeos na análise do sequenciamento, constatando a incompatibilidade do uso deste corante com a espectrometria de massas MS/MS, conforme já demonstrado em literatura. Os protocolos de coloração com prata incluem etapas de fixação com glutaraldeído, o qual pode se ligar a proteínas e impedir uma digestão eficiente por tripsina ou outras proteases (SHEVCHENKO et al, 1996). Embora tal reagente possa ser omitido da formulação com prata para aumentar a compatibilidade com espectrometria de massa, a sensibilidade de detecção fica bastante comprometida (LOPEZ et al., 2000).

Dessa maneira, embora a sensibilidade de detecção da prata seja de até cinquenta vezes superior à do corante Coomassie Brilliant Blue R-250, este último tem sido preferido em análises proteômicas, uma vez que não sofre interferência de

determinados parâmetros como a qualidade do solvente e a temperatura, resultando em géis com boa reprodutibilidade de *spots* corados (CANDIANO et al., 2004). Os primeiros géis 2D corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB-R250) foram carregados com a mesma quantidade de proteínas utilizadas nos géis revelados com prata, cerca de 150 μg , resultando em um número muito inferior de *spots* visualizados. Foi necessário utilizar uma quantidade bem maior de proteínas, aproximadamente 500 μg , para preparar géis mais saturados, acarretando em problemas de solubilização e focalização de tamanha quantidade de moléculas em um mesmo volume de tampão. Nas Figuras 10A e 10B, pode-se visualizar proteínas separadas em eletroforese bidimensional e reveladas com CBB-R250. Na primeira dimensão, as fitas foram carregadas com 500 μg de proteína total, procedendo-se a focalização isoeétrica sob condições já testadas e ajustadas para quantidades inferiores de proteínas.

Figura 10 - Proteínas da região cambial focalizadas à 60.000 Vh, separadas em géis bidimensionais (A) pH 4-7 e (B) pH 3-10, e coradas com CBB-R250

Percebe-se claramente nos géis que os *spots* não estão bem definidos (perfeitamente redondos), além da presença de listras horizontais, caracterizando problemas decorrentes da baixa solubilização das proteínas e da focalização inadequada das mesmas. Em função disso, foram testadas diferentes concentrações de componentes dos tampões de solubilização e de focalização, como Chaps, DTT, IPG buffer e Triton X-100, a fim de aumentar a solubilização de grande quantidade de

proteínas, assim como foram revistos os passos do programa de focalização e o tempo suficiente para que as proteínas fossem perfeitamente focalizadas. Os resultados revelaram que os melhores géis foram produzidos com proteínas solubilizadas em tampão composto por 8 M Uréia, 2 M Thiuréia, 2% (p/v) de Chaps, 20 mM DTT, 0,5% (v/v) de anfólitos pH 4-7 e 0,25% (v/v) de anfólitos pH 3-10, e focalizadas a 72.000 Vh (Figura 11A). Vale ressaltar que todos estes parâmetros, especialmente o tempo de focalização, são muito particulares à espécie e ao tipo de tecido que se pretende analisar, e por isso precisam ser avaliados e ajustados de acordo com cada trabalho. Para *Zea mays*, proteínas extraídas das folhas necessitam de 90.000 Vh para serem focalizadas (PORUBLEVA et al., 2001), enquanto que proteínas do endosperma têm sua focalização completada a 96.000 Vh (MÉCHIN et al, 2003). Gion et al. (2005) solubilizaram proteínas do xilema de *Pinus* em tampão composto pelos mesmos reagentes em concentrações diferenciadas e aplicaram um programa de focalização semelhante, totalizando 74.000 Vh.

Figura 11 - 2D-géis pH 4-7 carregados com 500 µg de proteínas, previamente focalizadas a 74.000 Vh. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (A) R-250 e (B) G-250

O último ajuste realizado foi em relação ao tipo de Coomassie Blue que deveria ser utilizado na coloração dos géis. Testes em amostras idênticas submetidas simultaneamente à focalização isoeétrica e à eletroforese bidimensional foram coradas com o Coomassie Blue R-250 e Coomassie G-250, respectivamente (Figuras 11A e 11B). O corante CBB-G250 permitiu a visualização de um número significativo de

proteínas que o CBB-R250 não foi capaz de revelar, devido à sua maior sensibilidade. Este resultado é especialmente importante para proteínas presentes em baixa abundância, que são moléculas que desempenham, via de regra, funções importantes em diferentes processos celulares e são pouco estudadas devido à dificuldade em isolá-las. Do ponto de vista técnico, a característica coloidal do CBB-G250 permite que suas partículas se liguem diretamente às proteínas, dispensando a necessidade de realizar as etapas de descoloração dos géis.

4.3 Resolução das proteínas

O perfil de proteínas da região cambial foi primeiramente analisado em géis bidimensionais preparados a partir de fitas imobilizadas com amplo gradiente de pH, a fim de avaliar-se as regiões com predomínio de proteínas. Em géis 2D de pH 3-10 não linear (Figura 12), verificou-se a presença de proteínas em todas as faixas de pH, distribuídas em um amplo espectro de massas moleculares, entre 6 e 120 KDa. Entretanto, observou-se uma concentração mais significativa de *spots* no intervalo de pH 3-7. Em função disso, foram realizados diversos experimentos com géis bidimensionais pH 4-7, cada um deles composto por três repetições, a fim de se obter *spots* para proceder a digestão *in-gel* e o sequenciamento dos peptídeos.

Figura 12 - Proteínas da região cambial da madeira com 6,3 anos, resolvidas em gel bidimensional de pH 3-10, não linear. A área delimitada pelo retângulo indica que a faixa de pH que concentra o maior número de *spots* é a de 4-7

4.4 Análise das imagens dos géis

O alinhamento dos géis foi realizado automaticamente a partir dos *spots* 43 e 89, escolhidos por estarem bem caracterizados em todos os géis, podendo ser utilizados como marcadores. A Figura 13 mostra a orientação dos vetores de todos os *spots* em relação aos marcadores, que é um recurso oferecido pelo programa para verificar se o alinhamento funcionou bem.

Figura 13 - Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação aos marcadores L1 (spot 89) e L2 (spot 43)

Na primeira metade do gel, onde estão as proteínas de maior peso molecular, observou-se grande semelhança no padrão de orientação dos vetores, ou seja, a variação no deslocamento das proteínas ocorreu para todos os *spots* e na mesma direção (lado direito dos géis). Na metade inferior do gel, os vetores mostraram pequenas distorções em sua orientação, revelando diferenças sutis na migração das proteínas de baixo peso molecular. Conforme mencionado anteriormente, todos os géis utilizados nesta análise foram preparados juntamente, a fim de se eliminar variações decorrentes da focalização isoeétrica, da migração na segunda dimensão e também da coloração com CBB-G250. Dessa maneira, as pequenas diferenças de migração notadas entre os géis, refletidas em variações discretas nas massas moleculares e p/s das proteínas, foram aceitas como normais e inerentes da técnica 2D, uma vez que não têm como ser evitadas.

Outra ferramenta disponível pelo “Image Master” v. 5.0 utilizada nesta análise foi a detecção automática de *spots* em cada gel. Como o programa entende como *spot* quaisquer manchas, bolhas de água, e rastros de proteínas que não foram bem focalizadas, foi necessário realizar uma edição manual, que consiste em adicionar e apagar *spots* tendo como base a imagem impressa dos géis. Assim, a análise tornou-se bastante subjetiva e os resultados passíveis de modificação, caso não se estabeleçam critérios de avaliação dos *spots* durante toda a análise.

Considerando-se os géis *a*, *b*, e *c*, os pares de *spots* foram determinados a partir do gel mais saturado (gel apresentado na Figura 13). Nos géis *a* e *c* foram detectados 836 e 546 *spots*, respectivamente, e 312 pares comuns entre eles. O gel *b* revelou 418 *spots*, sendo apenas 197 comuns ao gel de referência (Figura 14).

Figura 14 - Número de *spots* detectados nos géis *a*, *b* e *c* e número de pares comuns entre eles, determinado pelo programa Image Master 2D Platinum v 5.0

A imagem do gel *b* foi analisada e, de fato, ele não apresenta listras características de focalização incompleta e presença de sais, com *spots* muito bem definidos, porém em menor número. Além disso, o gel *c* foi carregado com a mesma quantidade de proteínas, proveniente do mesmo extrato protéico que abasteceu os géis *a* e *c*, por isso é improvável que a baixa reprodutibilidade dos *spots* no gel *b* esteja relacionada a problemas na extração e focalização das proteínas. No entanto, é muito difícil estabelecer um limiar mínimo que possa indicar que existe reprodutibilidade satisfatória entre dois géis, uma vez que a maioria dos trabalhos que empregam esta análise não aborda esta questão. Em função disso, o gel *b* foi mantido na análise de

detecção dos pares de *spots* e no cálculo do volume relativo, juntamente com os géis a e c.

4.5 Escolha dos *spots*

A excisão dos *spots* dos géis foi realizada com base na observação visual. *Spots* muito intensos e grandes foram retirados dos três géis separadamente, constituindo três repetições de uma amostra. Aqueles menos intensos e menores foram retirados e somados em um único tubo, a fim de aumentar a quantidade da proteína e dos produtos da digestão, e conseqüentemente, as possibilidades de identificação por espectrometria de massas. No decorrer do trabalho, foi observada alta variação na identificação de *spots* em cada lote preparado, o que poderia ser resultado de problemas relacionados à digestão, manipulação da amostra ou pequenas variações na precisão do espectrômetro de massa. Dessa maneira, a cada bateria de amostras a ser preparada, foi acrescentado um *spot* intenso já identificado por espectrometria, caracterizando uma amostra controle.

4.6 Espectrometria de massa

4.6.1 Espectros MS e MS/MS

A análise de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa foi utilizada para a identificação de *spots* em bancos de dados de proteínas (SWISS-PROT) e de nucleotídeos (GENOLYPTUS). Dois critérios foram considerados na análise dos resultados: (a) a detecção de apenas um peptídeo foi considerada suficiente para identificar uma proteína, desde que este acompanhado de uma probabilidade superior a 70%; (b) a validação de uma proteína foi confirmada ao constatar, com probabilidade superior a 70%, que a sequência experimental (aquela determinada pelo sequenciamento) correspondeu a uma sequência conhecida em pelo menos uma das bases de dados. A análise LC/MS/MS dos *spots*, seguida de sua identificação pelo programa Protein Lynx são exemplificados na Figura 15.

Figura 15 - Espectros MS/MS e MS obtidos para o *spot* 27, posteriormente identificado pelo programa Protein Lynx, através de 7 sequências peptídicas, como *ATP synthase beta chain mitochondrial*

4.6.2 Identificação dos *spots*

Um conjunto de 183 seqüências de aminoácidos, compreendendo entre 5 e 30 aminoácidos, foi obtido para 77 *spots* de proteínas da região cambial da madeira de eucalipto (Tabela 4; Figura 16). Deste total, 69 *spots* foram identificados com uma função conhecida. Entre eles, 52 *spots* mostraram similaridade com proteínas seqüenciadas em plantas, especialmente *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*,

Triticum aestivum e *Zea mays*, o que pode ser atribuído ao sequenciamento expressivo de cDNAs destas espécies associado à disponibilização das sequências em bancos de dados públicos. De forma inversa, apenas 5 *spots* correspondentes a duas proteínas distintas, mostraram homologia com proteínas de *Eucalyptus gunnii*. Os demais *spots* foram relacionados a seqüências de diferentes espécies, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Drosophilla melanogaster* e *Homo sapiens*, salientando que seqüências similares entre proteínas são comuns entre organismos distantemente relacionados na escala de evolução dos seres vivos. Costa et al (1999), afirmaram que, embora pequenos trechos de determinados aminoácidos possam revelar elevada conservação, o resultado pode ser bem diferente quando se trata da seqüência completa da proteína. No presente trabalho, entretanto, a maioria das proteínas foi identificada com pelo menos duas seqüências peptídicas, proporcionando maior cobertura da seqüência completa, o que resultou em maior confiabilidade da identificação.

Oito *spots* apresentaram similaridade com seqüências depositadas em ambas bases de dados, entretanto, nenhuma função pôde ser atribuída a eles. Isto sugere que as seqüências de aminoácidos obtidas para estas proteínas podem representar regiões não-conservadas de proteínas previamente caracterizadas (COSTA et al., 1999), como podem corresponder a transcritos muito raros que não foram seqüenciados até o momento, ou ainda podem ser caracterizadas como novos produtos gênicos, indicando funções específicas dessas proteínas no processo de formação da madeira (GION et al., 2005).

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continua)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
23		P23343	<i>Daucus carota</i>	99,99	Expect = 0,0	(R)TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALP HAILR(L) (K)NYELPDGQVITIGAER(F) (K)EITALAPSSMK(I) (K)GEYDESGPSIVHR(K)		41988 5.64	41632 5.65
74	<i>Actin</i>	P46258	<i>Pisum sativum</i>	---	Expect = 1e-108	(R)AVFPSIVGR(S) (R)VAPEEHPVLLTEAPINPK(S)		41635 5.31	41827 5.33
35	<i>Actin</i>	Q39596	<i>Chenopodium rubrum</i>	---	Expect = 1e-82	(R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A)		9513 5.71	17596 5.54
33	<i>Actin like-protein</i>	P38673	<i>Neurospora crassa</i>	99,99	Expect = 1e-163	(R)AGFAGDDVPK(C) (R)LDLAGR(D)		42382 6.03	41728 5.55
104	<i>Actin depolymerizing factor</i>	Q4JHK7	<i>Gossypium hirsutum</i>	---	Expect = 2e-66	(K)FLELK(K) (R)FIVYK(I) (R)YAVYDFDFVTKEKCQK(S)		16009 6.60	16993 5.73
80	<i>Adenosine kinase</i> EC 2.7.1.20	Q9SF85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	90,29	Expect = 9e-166	(K)LNNAILAEDK(H) (K)KPENWALVEK(A) (K)NYSVDYIAGGATQNSIR(V) (K)QPENWALVEK(A) (K)VLPYMDIVFGNETEAR(T) (R)ITVITQGPDPVVVAEDGK(V) (K)FPVILLPK(E)		37836 5.29	37476 5.18
84	<i>Adenosine kinase</i> EC 2.7.1.20	Q9SF85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99,99	Expect = 5e-93	(K)LNNAILAEDK(H) (K)KPENWALVEK(A) (R)VHGWETDDVEQIAIK(M) (K)NYSVDYIAGGATQNSIR(V) (K)QPENWALVEK(A) (K)VLPYMDIVFGNETEAR(T)	Deamidation Q (11)	37836 5.29	37565 5.48
133	<i>Adenosylhomocysteinase</i> EC 3.3.1.1	P32112	<i>Triticum aestivum</i>	100	---	(R)TSAAVFAWK(G) (R)LVGVSEITTTGVK(R) (R)HSLPDGLMR(A)	Methyl N-TERM Hydroxyl DKNP (13) I for E (7) Oxidation M (8)	53437 5.65	58805 6.40
101	<i>Asparaginyl- tRNA synthetase</i> EC 6.1.1.22	Q9CEK9	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	79,75	---	(K)VYVLPK(H) (R)VFDGFPVFR(A)		50840 4.87	24246 6.2

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continuação)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
134	ATP synthase alpha chain mitochondrial EC 3.6.3.14	P92549	<i>Arabidopsis thaliana</i>	78,97	---	(K)AVDSLVPVIGR(G) (K)VVSSLVPVIGR(G)	V for A (1) S for D (3)	55045 6.23	55580 6.35
27	ATP synthase beta chain mitochondrial EC 3.6.3.14	Q9ZR78	<i>Nicotiana sylvestris</i>	100	---	(R)VLNTGSPITVPVGR(A) (K)TSHFLPIHR(E) (K)VVDLLAPYQR(G) (K)IGLFGGAGVGK(T) (R)VGLTGLTVAEHFR(D) (R)FTQANSEVSALLGR(I)	Formyl N-TERM	59512 6.13	52875 5.37
6	Caffeic acid 3-O-methyltransferase EC 2.1.1. 68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	100	Expect = 1e-51	(K)ILMESWYYLK(D) (K)DAVLEGGIPFNK(A) (K)GINFDLPHVIEDAPPLPGVK(H) (K)NVIHIDCIMLAHNPGGK(E)		39914 5.52	37300 5.57
15	Caffeic acid 3-O-methyltransferase EC 2.1.1. 68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	100	---	(K)AAIELDLLEIMAK(A) (R)LYGLKPVCK(F) (R)LYGLAPVCK(F) (K)NEDGVSI AALNLMNQDK(I) (K)ILMESWYYLK(D) (K)GINFDLPHVIEDAPPLPGVK(H)	K for A (5) Propionamide C (8)	39914 5.52	37344 5.66
162	Caffeic acid 3 O-methyltransferase EC 2.1.1.68	P46484	<i>Eucalyptus gunnii</i>	100	---	(K)AAIELDLLEIMAK(A) (R)LLASYSVLTCTLR(N) (R)LYGLKPVCK(F) (K)ILMESWYYLK(D) (K)GDAIFMK(W)	Carbamidomethyl C (10) Propionamide C (10) K for A (5)	39914 5.52	36429 5.51
69	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase EC 2.1.1.104	O04854	<i>Eucalyptus gunnii</i>	---	Expect = 4e-123	(R)LIDLVK(V)		27914 5.02	27844 5.48
91	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase EC 2.1.1.104	O04854	<i>Eucalyptus gunnii</i>	---	Expect = 4e-138	(R)DFVLELNK(A)		27914 5.02	26679 4.92
83	Cell division cycle protein 48 homolog	P54609	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	Expect = 7e-162	(K)DFSTAILER(K) (R)ELVELPLR(H) (K)GILLFGPPGSGK(T) (K)NAPSIIFIDEIDSIAPK(R) (K)LAEDVDLER(I) (K)AIANECQANFISVK(G) (R)LDQLIYIPLDEDSR(L)	Carbamidomethyl C (6)	89393 5.13	91738 6.17

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continuação)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
144	<i>Elongation factor 2</i>	P15112	<i>Dictyostelium discoideum</i>	75,82	---	(K)FSVSPVVR(V)		91701 6.22	92537 6.33
32	<i>Enolase</i> EC 4.2.1.11	P06733	<i>Homo sapiens</i>	99,99	Expect = 1e-143	(R)IGAENVYHNLK(N) (K)IPLYK(H) (K)EGLELLNTAIK(A) (K)YNQLLR(I)		47038 6.99	54742 5.62
59	<i>Enolase</i> EC 4.2.1. 11	P06733	<i>Homo sapiens</i>	99,99	Expect = 6e-93	(K)EGLELLKTAVGK(A) (K)SVLELLKTAIGK(A) (K)YNQLLR(I)	Methyl C-TERM V for I (10) S for E (1), V for G (2)	47038 6.99	55701 5.50
168	<i>Enolase</i> EC 4.2.1.11	P06733	<i>Homo sapiens</i>	100	---	(K)EGLELLKTAIGK(A)		47038 6.99	54742 5.55
113	<i>Eukaryotic initiation factor 4 A</i> EC 3.6.1.-	Q02748	<i>Drosophila melanogaster</i>	99,99	Expect = 2e-95	(K)LFVLDEADEMLSR(G) (R)VLITDILLAR(G)		45879 5.43	45033 5.55
5	<i>Glutamine synthetase</i> EC 6.3.1.2	O22331	<i>Hevea brasiliensis</i>	---	Expect = 0,0	(R)TLNGPVSDPAK(L) (R)DIVDSHYK(A) (R)YILER(I)		39358 5.81	38508 5.51
126	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosoli</i> EC 1.2.1.12	Q43247	<i>Zea mays</i>	99,99	---	(K)TLLFGIK(E) (K)SVPMFVVGVNEK(E) (K)DAPFFVVGVNEK(E) (K)VLPVLTGK(L)	Hydroxyl DKNP (7) I for E (6) S for D (1), V for A (2) F for M (4)	36449 7.02	38645 6.75
68	Glyoxalase I homolog	O65398	<i>Arabidopsis thaliana</i>	---	Expect = 3e-60	(K)LVIEELGGK(I)		31929 5.19	34666 5.32
29	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	P11143	<i>Zea mays</i>	100	Expect = 0,0	(K)NAVVTVPAYFNDSQR(Q) (R)IINEPTAAAIAYGLDK(K) (R)MVNHFVQEFK(R) (K)NALENYAYNMR(N)		70603 5.22	74491 5.29
31	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q16956	<i>Aplysia californica</i>	100	ok	(R)VDIIANDQGNR(I) (K)FEELNMDLFR(S)		71118 4.78	73368 5.61
37	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>	Q93601	<i>Caenorhabditis elegans</i>	100	Expect = 0,0	(R)TTPSYVAFTDTER(L) (K)SQVHDDVVLGGSTR(I)	V for I (6)	69723 5.44	76788 5.54

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continuação)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
81	Heat shock cognate 70 kDa protein	P09189	<i>Petúnia hybrida</i>	99,99	Expect = 8e-53	(R)VEIANDQGNR(T) (K)NQVAMNPINTVFDK(R) (R)IINEPTAAAIAYGLDKK(A) (K)ATAGDTHLGGEDFDNR(M) (R)MVNHFVQEFK(R) (R)FEELNMDLFR(K) (K)VQQLQDFFNGK(E) (K)SINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEK(V)	Oxidation M (1)	71227 5.11	75303 5.23
112	HSP70	Q9SAU8	<i>Triticum aestivum</i>	---	Expect = 0,0	(R)TPSYVAFTDTER(L)		71031 5.14	71224 5.5
20	17 kDa class II heat shock protein	Q08275	<i>Zea mays</i>	89,29	---	(R)AMAATPADVK(E) (R)DGVLTVTVEK(L)		17047 7.84	15884 5.70
21	18,1 kDa class I heat shock protein	P27879	<i>Medicago sativa</i>	99,99	Expect = 1e-22	(K)ADLPGLK(K) (R)VLQISGER(N)		16468 5.20	17556 5.71
41	Putative 19 kDa heat shock protein	Q9ZDQ3	<i>Rickettsia prowazekii</i>	100	4e-18	(K)NGILTILPR(I) (K)DGVLNIIIPR(T)		18720 8.94	22638 5.63
19	Cytosolic class II low molecular weight heat shock protein	Q9XGS6	<i>Prunus dulcis</i>	---	Expect = 3e-28	(R)ISLVNSVHIPIT(I)		17504 5.58	18952 6.87
51	Chloroplast-localized small heat shock protein 22	Q9SE11	<i>Funaria hygrometrica</i>	---	Expect = 2e-25	(K)DGVLNIIIPR(T)		27468 7.87	22998 5.48
151	HisF protein cyclase EC 4.1.3.-	P44436	<i>Haemophilus influenzae</i>	100	---	(K)QIIEIGELK(S)		28626 5.24	28767 6.78
97	Hypothetical protein yahJ	P77554	<i>Escherichia coli</i>	100	---	(K)LIDLLQSKGTTIAR(S)		50549 6.06	17166 6.06
18	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	100	Expect = 1e-117	(K)FIVEASAK(A) (R)FFPSEFGNDVDR(V)		33852 6.16	33342 5.70
34	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	Expect = 1e-76	(K)VLVIGGTGYIGK(F) (K)FLVEASAK(A) (K)AGIVEGFK(S) (R)FLPSEFGNDVDR(V) (K)TAFALK(A) (K)FIVEASAK(S)	L for I (5)	33737 5.66	33342 5.75
95	Isoflavone reductase EC 1.3.1.45	P52575	<i>Medicago sativa</i>	100	Expect = 3e-149	(K)VVILGDGNVK(G)		35455 5.23	34341 6.32
89	Late embryogenesis abundant protein	P46517	<i>Zea mays</i>	---	Expect = 3e-42	(-)LPVVLLYMVLK(-) (-)YVGRLFLAECR(-)		29684 6.61	36515 4.63

148	<i>Methyltetrahydropteroyltriglutamate homocystein</i> EC 2.1.1.14	Q42699	<i>Catharanthus roseus</i>	100	---	(K)GVTGFGFTLIR(G) (K)LLSVFR(E)	T for D (8), I for V (10)	88485 6.10	93953 7.00
-----	---	--------	----------------------------	-----	-----	-----------------------------------	------------------------------	---------------	---------------

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continuação)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
135	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase</i> EC 1.1.1.44	O22111	<i>Glycine max</i>	---	Expect = 0,0	(K)YIEDILVK(V) (R)AIFLDR(I) (R)NADLANLLVDPEFAK(E)		56374 5.55	50961 6.5
24	<i>Phosphoglycerate kinase cytosolic</i> EC 2. 7. 2. 3	P12783	<i>Triticum aestivum</i>	99,99	Expect = 9e-160	(K)ELDYLVGAVANPK(K) (K)TYAEALDTTK(T) (K)FAAGTDAIAK(Q)	Y for F (2)	42122 5.64	40418 6.14
158	<i>Phosphoglycerate kinase cytosolic</i> EC 2.7.2.3	P29409	<i>Spinacea oleracea</i>	100	---	(R)VDLNVPLDDSQRITDDTR(I) (K)LASLADLYVNSVFGTAHR(A)	V for A (1), R for N (12) S for D (11), V for A	45573 5.83	40038 5.85
70	<i>Proteasome subunit alpha type 4</i> EC 3.4.25.1	O82530	<i>Petunia hybrida</i>	---	Expect = 7e-96	(R)TTIFSPGGR(L)		27239 5.60	26174 5.74
77	<i>Proteasome subunit alpha type 6</i> EC 3.4.25.1	O48551	<i>Glycine max</i>	---	Expect = 3e-128	(K)ANEIEVGVR(S)		27392 5.83	26144 6.21
78	<i>Proteasome subunit alpha type 2</i> EC 3.4.25.1	O23708	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	Expect = 1e-76	(R)LYKEPIPTQLVR(E)		25701 5.53	25505 5.63
103	<i>Proteasome subunit beta type 2</i> EC 3.4.25.1	Q7DLS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	---	Expect = 2e-136	(K)FLELK(K) (R)FIVYK(I) (R)YAVYDFDFVTKEKQK(S)		16009 6.60	25678 6.5
111	<i>Putative leucine aminopeptidase</i>	Q56WM8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	---	Expect = 1e-136	(K)GLTFDSGGYNIK(T) (K)FDMGGSAAVLGAAG(A) (K)EVFAASELSGEK(L)		22237 5.14	52418 5.75
124	<i>Putative NADH dehydrogenase</i>	Q5QLT6	<i>Oryza sativa</i>	---	Expect = 8e-35	(K)VKPFFRGPK(I)		49509 8.86	37962 5.52
87	<i>Putative 60S ribosomal protein L35</i>	Q45KX4	<i>Rheum australe</i>	---	Expect = 6e-54	(K)LIELVK(E)		27867 5.30	29093 4.72
75	<i>60S acidic ribosomal protein</i>	O04204	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86,82	---	(K)VGSSEAALLAK(L)		33667 5.19	34872 5.2
2	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P43282	<i>Lycopersicon esculentum</i>	99,99	---	(R)SGAYIVR(Q) (K)SVVASGLAR(R)		42653 5,76	43028 5.73
22	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2. 5. 1. 6	P43282	<i>Lycopersicon esculentum</i>	99,99	Expect = 2e-58	(K)VMVNIEQQSPDIAQGVHGLTK(K) (K)IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK(D) (R)SGAYIVR(Q) (K)SVVASGLAR(R) (K)TAAYGHFGR(D)	Methyl N-TERM	42653 5,76	42656 5.8
46	<i>S adenosylmethionine synthetase</i> EC 2.5.1.6	P49611	<i>Brassica juncea</i>	89,99	---	(R)SGAYIVR(Q)		43226 5.52	44163 6.01

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(continuação)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
110	<i>Tartrate utilization transcriptional regulator</i>	P52669	<i>Agrobacterium vitis</i>	100	---	(R)LLEESLGTR(L)		33855	38236
71	<i>Triosephosphate isomerase chloroplast precursor</i> EC 5.3.1.1	Q9SKP6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	Expect = 5e-56	(K)FFVGGNWK(C) (K)GPEFATIVNSVTSK(K)		9.36 33346 7.67	5.85 26174 5.71
11	<i>Tubulin alpha chain</i>	Q8VXC9	<i>Nicotiana tabacum</i>	---	Expect = 5e-67	(R)AVFVDLEPTVITEIR(N) (K)FDLMYAK(R)	T for D (12)	49753 4.86	49867 5.25
25	<i>Tubulin alpha chain</i>	P33629	<i>Prunus dulcis amendoeira</i>	84,56	---	(K)TVGGGDDAFNTFFSETGAGK(H) (R)QLFHPEQLISGK(E) (R)LSVDYGK(K) (R)SLDIERPTYTNLNR(L) (R)LVSQVISSLTASLR(F) (R)IHFMLSSYAPVISA(EK)(A) (K)DVNAAVATIK(T) (R)AVCMISNSTSVAEVFSR(I) (K)FDLMYAK(R) (R)EDLAALEK(D)	Oxidation M (4) Carbamidomethyl C (3)	49527 4.92	49329 5.14
26	<i>Tubulin alpha chain</i>	Q43473	<i>Hordeum vulgare</i>	---	Expect = 0,0	(R)LSVDYGK(K) (R)LSVDYGK(K) (R)SLDIERPTYTNLNR(L) (R)IHFMLSSYAPVISA(EK)(A) (K)DVNAAVATIK(T) (K)FDLMYAK(R) (K)FDLMYAK(R) (R)EDLAALEK(D) (R)EDLAALEK(D)		49597 4.95	49329 5.2
12	<i>Tubulin beta chain</i>	P29502	<i>Pisum sativum</i>	---	Expect = 3e-66	(K)VALNLLIEVR(N)		49516 4.71	51516 5.08
13	<i>Tubulin beta chain</i>	P32256	<i>Dictyostelium discoideum</i>	99,99	Expect = 0,0	(K)GHYTTGVELVESVLDVVR(R) (K)LAVNLIPFPR(L)	T for E (5)	51280 5.07	52990 5.02
14	<i>Tubulin beta 3 chain</i>	P25862	<i>Avena sativa</i>	72,24	---	(R)FPGQLNSDLR(K)		43354 4.60	52760 4.96
16	<i>Tubulin beta chain</i>	P20802	<i>Achlya klebsiana</i>	100	Expect= 0,0	(R)FPGQLNMVLK(L) (K)LAVNLIPFPR(L)		49854 4.71	54152 4.90
61	<i>UDP-glucose pyrophosphorylase</i> EC 2.7.7.9	P19595	<i>Solanum tuberosum</i>	---	Expect = 2e-20	(K)LDALLSQGK(E) (K)GGTLISYEGK(V)		51743 5.71	54742 6.01
131	<i>UDP-glucose pyrophosphorylase</i> EC 2.7.7.9	P57751	<i>Arabidopsis thaliana</i>	---	Expect = 2e-93	(K)VLQLETAAGAAIK(F)	Methyl C-TERM T for N (6)	51920 5.72	56186 6.52

73	V-type ATP synthase subunit I EC 3.6.3.14	O57721	Pyrococcus horikoshii	99,99	Expect = 2e-64	(K)IVKIEVITLTR(F)	74308 6.09	54742 5.76
----	--	--------	--------------------------	-------	-------------------	-------------------	---------------	---------------

Tabela 4 – Proteínas da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, identificadas por espectrometria de massa

(conclusão)

Spot	Proteína	Nº acesso no SP	Espécie com maior homologia	Score SP	Score GN	Peptides	Modificações e Substituições	PM / p/ teórico	PM / p/ experimental
119	Vacuolar ATP synthase subunit B EC 3.6.3.14	P11574	Arabidopsis thaliana	99,99	Expect = 7e-78	(K)YQEIVNIR(L) (K)AVVQVFEGTSGIDNK(Y)		54108 4.98	56922 5.22
42	Função desconhecida			99,35	99,352	(-)KKKLNLLPR(-)			24486 5.76
43	Função desconhecida			92,94	99,997	(-)LYVSVTVGVKGKR(-)			23415 5.95
49	Função desconhecida			100	78,06	(-)SRRDNEEGPRQAR(-)			24029 5.61
56	Função desconhecida			100	---	(-)ALLPMAEFLR(-)			24383 5.69
64	Função desconhecida			100	---	(-)ETLFNLLTVR(-)			36558 5.82
132	Função desconhecida			100	83,328	(-)LALLGVPPVV(-)			56186 6.52
150	Função desconhecida			100	100	(-)VFKLKRMF(-)			25678 6.49
197	Função desconhecida			100	100	(-)LLDGALYLRK(-)			89769 6.51

Score SP: probabilidade da similaridade entre as sequências peptídicas experimental e a encontrada na base Swiss Prot

Score GN: probabilidade da similaridade entre as sequências peptídicas experimental e a encontrada na base Genolyptus

Figura 16 - 2D-gel pH 4-7 da região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, em sua fase final de desenvolvimento. Os números indicam as proteínas identificadas, e os asteriscos os *spots* não esclarecidos

Para 26 *spots* identificados, a mesma anotação funcional foi obtida nas bases de dados de proteínas e de nucleotídeos, ou seja, a cobertura do número de proteínas identificadas em ambos os bancos foi de 37%. A base de ESTs de eucalipto permitiu a identificação de 23 *spots* (33%). O aumento significativo da taxa de identificação das proteínas aponta claramente a importância e utilidade de bancos de dados específicos à espécie investigada em análises proteômicas. Os projetos de sequenciamento de ESTs tiveram início no final da década de 80, e foram extensivamente praticados nos anos seguintes, disponibilizando em bancos de dados públicos milhares de seqüências de genomas de diversos organismos.

O avanço na identificação de proteínas exclusivas de um tecido em uma determinada espécie depende, em grande parte, da disponibilidade de uma base de dados específica, que pode ser utilizada para revelar proteínas ainda desconhecidas e levar à identificação de novos genes, contribuindo dessa forma para a elucidação de diversos processos celulares. Utilizando um banco de nucleotídeos de *Pinus*, Gion et al. (2005) aumentaram em 53,4 % a identificação de proteínas da madeira desta conífera, quando comparada à busca realizada apenas em uma base de seqüências peptídicas. Lippert et al. (2005) analisaram proteínas diferencialmente expressas em quatro estádios de embriogênese somática em *Picea glauca*, utilizando um banco composto por ESTs de três espécies de *Picea* em associação a seqüências nucleotídicas de *Pinus taeda* e *Populus spp* (Genebank). Dessa maneira, a taxa de identificação de proteínas passou de 38% para 62% quando ambos os bancos foram combinados, levando à descoberta de proteínas envolvidas em diversos processos celulares nunca antes associados à embriogênese.

4.7 Múltiplos *spots* para a mesma proteína

Os 69 *spots* identificados neste estudo corresponderam a 41 proteínas distintas. Desse total, 34,15% foram representadas em múltiplos *spots*, muitos deles mostrando diferenças em seus p/s e massas moleculares. Esta observação pode ser reflexo da ocorrência de alguns eventos na célula. Proteínas citoplasmáticas de resposta a estresse conhecidas como 'heat-shock' somaram 8 *spots* (20, 21, 29, 31, 37, 41, 81 e 112), localizados em diferentes posições do gel, indicando grande variação em seus p/s e massas moleculares (Figura 13). Diferenças significativas no peso molecular podem ser resultado de proteínas traduzidas a partir de mRNAs alternativamente processados, como ocorre, por exemplo, com a enzima *Ascorbato peroxidase* (YOSHIMURA et al., 2002). O *splicing alternativo* é um mecanismo de regulação transcricional, através do qual um mesmo pré-mRNA pode ser seletivamente processado, gerando um grande número de proteínas diferentes estrutural e funcionalmente (MACKNIGHT et al., 2002; KAZAN, 2003).

Modificações pós-traducionais podem dar origem a múltiplos *spots* através da adição de um grupo modificador a um ou mais aminoácidos de uma proteína (MANN; JENSEN, 2003), determinando sua atividade, localização celular e interações com outras proteínas. Metilação parece ser a modificação mais facilmente encontrada na célula (YAN et al., 1999; PORUBLEVA et al., 2001). No presente estudo, algumas modificações pós-traducionais foram detectadas pelo programa ProteinLynx. Aquelas que ocorreram com maior frequência foram metilação (*spots* 22, 59, 131) e oxidação (*spots* 25, 81), sendo também observada a ocorrência de ambas em uma mesma proteína (*spot* 133). Foram registrados ainda outros tipos de modificações pós-traducionais, como deaminação, formilação e hidroxilação. A enzima *S-adenosylmethionine synthase* (SAM-S) foi identificada em três *spots* distintos (2, 22 e 46). Davis et al. (2005) também observaram a migração da SAM-S em três pontos no gel, e sugeriram que este padrão pode ser resultado da fosforilação, outra modificação pós-traducional muito comum em plantas.

Nos *spots* 25 e 162 foi detectada a adição do grupo carbamidomethyl C, caracterizando uma modificação química denominada alquilação, decorrente do uso de um agente alquilante (iodoacetamida) em alguns passos da preparação das amostras. Modificações químicas acarretam danos à proteínas e podem contribuir para gerar múltiplos *spots* (PORUBLEVA et al., 2001). Os *spots* citados correspondem a *Tubulin alpha subunit* e *Caffeic acid 3 O-methyltransferase*, proteínas representadas por 3 *spots* cada uma. Entretanto, é improvável que estes *spots* sejam interpretados como artefatos resultantes de danos à proteína durante a preparação da amostra, uma vez que diversos cuidados foram tomados para evitá-los. Além disso, os referidos *spots* mostraram elevada reprodutibilidade em número e intensidade em todos os géis bidimensionais utilizados neste estudo. Também foi observada a ocorrência de alquilação nas referidas proteínas da região cambial na fase intermediária do desenvolvimento (CELEDON, 2006), reforçando a idéia de que estas não são produtos de degradação.

Deve ser considerada a possibilidade de ocorrer diversas isoformas correspondentes a produtos alélicos do mesmo gene, ou derivadas de genes diferentes. É previsto que o complexo genoma do eucalipto contenha múltiplas cópias de muitos

genes, o que pode explicar, em parte, a multiplicidade de *spots* observada para uma mesma proteína. *Tubulins* (subunidades α e β) foram representadas por 7 *spots* (11, 12, 13, 14, 16, 25 e 26), com massas moleculares e pIs muito semelhantes. Caracterizados por pesos moleculares muito semelhantes e pequena variação em seus pIs, os *spots* 18, 34 e 95 foram identificados como *Isoflavone reductase*. Diversas outras proteínas incluídas em diferentes categorias funcionais foram representadas por dois *spots*, como por exemplo, *Phosphoglycerate kinase* (24 e 158), *UDP-glucose pyrophosphorilase* (61 e 131) e *Caffeoyl-CoA O-methyltransferase* (69 e 91). A multiplicidade de *spots* atribuída a uma proteína foi relatada em diversos trabalhos (MATHESIUS et al., 2001; GION et al., 2005; LIPPERT et al., 2005; SHEORAN et al., 2005; YAN et al., 2005) e é exemplificada na Figura 17.

Figura 17 - Proteínas da região cambial identificadas em múltiplos *spots*, localizadas na mesma faixa de peso molecular e com variação em seus pIs. (A) *Phosphoglycerate kinase*; (B) *Tubulins*; (C) *S-adenosylmethionine synthase*; (D) *70 KDa Heat shock*

4.8 Distribuição funcional das proteínas

Com o propósito de compreender o papel das proteínas identificadas na formação da madeira de eucalipto, estas foram classificadas em sete categorias funcionais (Figura 18), baseado em Rison et al. (2000).

A categoria “Energia” agrupou o maior número de proteínas (22%), as quais estão envolvidas no metabolismo da glicose e na produção de ATP. A categoria “Processos Celulares” reuniu 19,5% das proteínas, cujas funções estão relacionadas à regulação intracelular e defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos. Um número

expressivo de proteínas foi classificado em “Componentes estruturais” (17,1%), que abriga proteínas do citoesqueleto e da parede celular. A categoria “Metabolismo” (14,6%) englobou proteínas que desempenham importante papel no metabolismo dos aminoácidos e do nitrogênio, como também no metabolismo secundário. Proteínas envolvidas nos processos de biossíntese, metabolismo e degradação de outras proteínas foram agrupadas na categoria “Metabolismo Macromolecular” (19,5%), enquanto que as responsáveis pelo transporte de macromoléculas compuseram o grupo com o menor número de representantes (2,4%), classificado na categoria “Transporte”. Finalmente, as proteínas que não foram relacionadas a uma função clara (4,9%), foram incluídas na categoria “Função não definida”.

Figura 18 - Distribuição das proteínas da região cambial em categorias funcionais

4.9 Correlação entre abundância de mRNA e proteínas

O uso de técnicas avançadas de análise de expressão gênica (PAUX et al., 2004; PILATE et al., 2004; ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006) associado a métodos de separação e sequenciamento de proteínas (GION et al., 2005) permitem o monitoramento quantitativo de diversas moléculas em uma célula ou tecido, como também sua variação em diferentes condições biológicas. A iniciativa de correlacionar níveis de mRNA e proteínas pode ajudar a compreender como acontece a regulação de genes importantes em diferentes processos celulares (MEHRA et al., 2003), inclusive na

formação da madeira. A transcrição e a tradução são processos altamente complexos e incluem várias etapas de regulação, o que pode resultar na produção de transcritos e proteínas divergentes em número, e cuja correlação é muito distante daquela primeiramente estabelecida pelo dogma da biologia molecular, onde um gene coordena a síntese de um mRNA, o qual é traduzido em uma única proteína.

O volume relativo das proteínas mais expressas, associado ao número e tipos de mRNAs correspondentes são apresentados na Tabela 5 e Figura 19. Para a maioria das anotações funcionais analisadas, foi observada uma *tendência* de que a correlação mRNA-proteína foi inversamente proporcional, ou seja, mRNAs que se mostraram pouco abundantes corresponderam a proteínas muito abundantes, enquanto que para outras duas proteínas, *Methilterahydropteroyltriglutamate* e *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* os mRNAs foram mais abundantes quando comparados às suas proteínas. Davis et al. (2005) verificaram a mesma tendência para um grupo de proteínas do proteoma do pólen em *Arabidopsis thaliana*. Gion et al. (2005) encontraram uma correlação direta discreta entre a abundância de mRNAs e proteínas do xilema de *Pinus*.

Duas proteínas, *Enolase* e *Triosephosphate isomerase*, foram codificadas por mRNAs não representados no transcritoma da região cambial da madeira com 6,3 anos, mas que estão presentes nas bibliotecas do mesmo tecido nas fases jovem (6 meses) e intermediária (3 anos). A explicação mais provável é que estes transcritos são raros na fase avançada do desenvolvimento da planta, sendo excluídos do banco de dados SAGE por apresentarem uma única cópia. As proteínas correspondentes aos *spots* 73, 83, 97, 101, 110, 135, 144 e 151 não tiveram seus mRNAs correspondentes relacionados em nenhuma das três bibliotecas SAGE. Com exceção da *Asparaginyl-tRNA synthase* (*spot* 101) e da *6-Phosphogluconate dehydrogenase* (*spot* 135), enzimas claramente envolvidas no metabolismo da planta, as demais proteínas foram identificadas através de uma anotação funcional bastante generalizada no banco SWISS PROT, que embora tenha as seqüências de tais proteínas depositadas, fornece poucas informações sobre seu papel biológico. Em função disso, e associado à possibilidade de também serem transcritos raros, estes não foram incluídos no banco construído com

cDNAs de *Eucalyptus*, justificando assim a ausência destes no transcritoma da região cambial da madeira.

Figura 19 - Comparação entre a abundância das proteínas mais expressas na região cambial e seus mRNAs correspondentes

Trabalhos disponibilizados na literatura que abordam a correlação mRNA-proteína em diferentes organismos não apresentam uma tendência coerente entre os níveis de expressão das proteínas e seus transcritos correspondentes. Ideker et al. (2001) não estabeleceram uma relação direta entre a abundância de mRNA e proteínas do trigo em condições de estresse abiótico. Alterações nos níveis de mRNA e de proteínas foram registradas em *E. coli*, quando submetida à perturbações genéticas e ambientais, entretanto, nenhuma correlação coerente foi encontrada entre eles (LEE et al. 2003). Em um recente estudo com a bactéria *Desulfovibrio vulgaris*, Nie et al. (2006) mostraram que a abundância do mRNA, quando considerado isoladamente, pode explicar apenas 20 a 28% da variação total da abundância de proteína. Os resultados sugerem que a abundância de mRNA não é, definitivamente, o único fator que determina a correlação mRNA-proteína, e que outros parâmetros devem ser

considerados, como variações analíticas da abundância de proteína e mRNA e estabilidade da proteína.

Tabela 5. Proteínas mais abundantes da região cambial e seus transcritos correspondentes

Nº no gráfico	PROTEOMA			TRANSCRISOMA	
	Proteína	Número de spots	Volume relativo dos spots (%)	Tipos de mRNAs	No cópias mRNAs
1	<i>Tubulin alpha</i>	3	5,80	4	90
2	<i>S adenosylmethionine synthase</i>	3	5,40	3	34
3	<i>Tubulin beta</i>	4	4,72	8	88
4	<i>Caffeic acid 3-O-methyltransferase</i>	3	3,90	1	5
5	<i>70 KDa Heat shock protein</i>	5	2,85	4	16
6	<i>Isoflavone reductase</i>	3	2,46	4	183
7	<i>Actin</i>	4	2,38	16	78
8	<i>Glutamine synthase</i>	1	1,57	3	19
9	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	2	1,04	1	2
10	<i>UDP-glucose pyrophosphorilase</i>	2	0,76	2	8
11	<i>Adenosine kinase</i>	2	0,75	1	38
12	<i>Actin depolymerizing factor</i>	1	0,46	5	18
13	<i>Proteasome subunit alpha</i>	3	0,43	2	2
	<i>ATP synthase beta chain</i>	1	0,39	1	4
14	<i>mitochondrial</i>				
15	<i>Eucaryotic initiation factor</i>	1	0,39	1	2
16	<i>Putative 60S ribosomal protein</i>	1	0,35	7	22
17	<i>Late embryogenesis abundant protein</i>	1	0,28	1	4
18	<i>Caffeoyl-CoA O-methyltransferase</i>	2	0,29	2	44
19	<i>Vacuolar ATP synthase</i>	1	0,18	1	6
20	<i>Methyltetrahydropteroyltriglutamate</i>	1	0,14	1	28
21	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1	0,14	5	44
22	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	1	0,11	2	9
23	<i>Proteasome subunit beta</i>	1	0,10	2	5

A dificuldade em estabelecer correlações mRNA-proteína também pode ser explicada por diferenças ocorridas nos processos de transcrição e tradução em organismos que apresentam ciclo circadiano, levando à formação de múltiplos proteomas distintos. Em *Arabidopsis thaliana*, os fatores de transcrição *LHY* (Late elongated hypocotyl) e *CCA1* (Circadian clock associated) exibem picos máximos de expressão ao amanhecer, e coincidem com a expressão mínima de *TOC1* (Timing of CAB expression), ao passo que o acúmulo de *TOC1* à noite resulta na transcrição de *LHY* e *CCA1* ao amanhecer (CARRÉ; KIM, 2002). Esta regulação recíproca é

comumente observada em plantas. Modelos têm sido propostos também em *Arabidopsis* para explicar como o ciclo circadiano controla a época do florescimento em função do fotoperíodo. O gene CO (época do florescimento) é regulado tanto ao nível transcrissional, como também pela luz, de maneira pós-transcrissional (HAYAMA; COUPLAND, 2003). Tais exemplos são apresentados para sugerir que, de maneira semelhante, alguns genes envolvidos na formação e diferenciação dos tecidos que constituem a madeira podem sofrer regulação através do relógio circadiano. Em função disso, diferenças significativas nos níveis de expressão dos transcritos e das proteínas correspondentes poderão ser observados de acordo com o período do dia em que a amostragem foi realizada, resultando em correlações proteína-mRNA distintas.

Fatores relacionados à técnica de eletroforese bidimensional contribuem, em parte, para dificultar a determinação de correlações confiáveis entre níveis de mRNA e proteínas (GYGI et al., 1999; NIE et al., 2006). Uma séria limitação desta técnica para estudos de proteômica quantitativa é a identificação preferencial das proteínas mais abundantes. Em função disso, deve ser considerado que a análise realizada neste estudo foi restrita a um pequeno número de proteínas, e que os resultados observados constituem uma *tendência* válida especificamente a este grupo, não podendo, em hipótese alguma, ser generalizada ao nível do proteoma da região cambial da madeira. Não se pode deixar de considerar também alguns aspectos da análise transcrissômica, utilizada para a determinação e quantificação dos mRNAs. A biblioteca SAGE da região cambial na mesma fase do desenvolvimento foi construída a partir do sequenciamento de 700 clones, resultando em aproximadamente 22.000 tags de mRNA. Embora seja uma amostragem expressiva do transcrissoma da madeira, um número ainda maior de transcritos pode ser revelado à medida que aumentar o número de clones seqüenciados. Além disso, do total de tags seqüenciado, apenas aquelas presentes em pelo menos duas cópias foi considerada na análise final, reduzindo o número para pouco mais de 14.000 tags, o que implica na exclusão de diferentes tipos de transcritos da análise da correlação proteína-mRNA.

4.10 Proteínas da região cambial da madeira de eucalipto com 6,3 anos

4.10.1 Proteínas de resposta ao estresse

As proteínas 'heat shock' (*HSPs*) foram descobertas nos anos 70 em glândulas salivares de *Drosophilla melanogaster* submetidas a um estresse por alta temperatura. Hoje, sabe-se que estas proteínas são ativadas em diversos tipos de estresse, e compartilham a resposta ao estresse celular (CSR) com muitas outras proteínas, formando assim, um conjunto básico de proteínas de estresse altamente conservado e presente em todos os organismos (KÜLTZ, 2005). A CRS é uma reação de defesa característica de todas as células procariotas e eucariotas e o seu proteoma mínimo inclui proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, reparo e proteção de proteínas, estabilização e reparo do DNA e cromatina, remoção de proteínas danificadas e em alguns aspectos do metabolismo de energia (KÜLTZ, 2003).

No presente trabalho, foram identificados 5 proteínas pertencentes à classe *Heat shock* 70 KDa, incluindo a *78 KDa glucose-regulated protein*, uma proteína homóloga à HSP70. Os *spots* 29, 31, 37, 81, 112 mostraram pequena variação em seus *pI*s, porém todos apresentaram massa molecular aproximada de 70 KDa. Estas proteínas funcionam como chaperonas moleculares, ligando-se a sítios de reconhecimento de proteínas parcialmente dobradas ou desnaturadas, a fim de prevenir a agregação irreversível e o dobramento correto da proteína (LANDRY; GIERASCH, 1994). Também podem manter a proteína em uma conformação não-dobrada, para facilitar a translocação da molécula por membranas.

As HSP70s ilustram a conservação evolucionária desta função celular e sua importância durante o estresse (WATERS et al., 1996). Estudos pioneiros mostram que durante o estresse por alta temperatura, as *HSPs* previnem o acúmulo de agregados de proteínas desnaturadas e facilita a reativação da proteína após o estresse (LINDQUIST; CRAIG, 1988; VIERLING, 1991; HOWARTH, 1991). Membros da família *HSPs* expressos na ausência de estresse são chamados genes cognados. O *spot* 81 foi identificado como *Heat shock cognate 70 KDa protein*. Acredita-se que as árvores de eucalipto, das quais foram amostrados os tecidos da região cambial, não passavam por

estresse na ocasião da coleta das amostras, uma vez que esta foi realizada em um período de intensas chuvas e de temperaturas amenas. Isto sugere que a expressão das HSPs nas células pode estar relacionada a funções fisiológicas primárias, como por exemplo, a manutenção de níveis mínimos de radicais livres decorrentes da biossíntese de lignina durante a xilogênese. Assim, quando as plantas passarem por uma situação real de estresse, a abundância destas proteínas nas células poderá aumentar, para que ela cumpra sua função na resposta ao estresse. Duck e Folk (1994) comprovaram a presença de *HSP70* em microsporos de tomate em desenvolvimento, como também estocadas em pólen maduro, mesmo na ausência de estresse. Ao submeterem a planta a um estresse por alta temperatura, os autores observaram que não houve produção adicional de *HSP*, sugerindo que a planta conta com uma certa quantidade de proteínas de defesa que podem ser prontamente disponibilizadas em condições adversas.

As sHSPs (*small heat-shock proteins*) constituem outra classe de chaperonas, caracterizadas por serem proteínas de baixo peso molecular, entre 17 e 30 KDa, que compartilham um domínio conservado de cerca de 100 aminoácidos com proteínas *Alpha-cristallin*. Proteínas codificadas por diferentes famílias de genes *sHSP* podem ser endereçadas a diversos compartimentos celulares, incluindo citosol, cloroplasto, mitocôndria e retículo endoplasmático (VIERLING, 1991). Nos géis 2D da região cambial da madeira de eucalipto, foram resolvidos 5 *spots* identificados como proteínas sHSPs, sendo uma localizada no cloroplasto (*spot* 51), uma no citosol (*spot* 19) e as demais no citoplasma das células (*spots* 20, 21, 41). Esta diversificação de *sHSPs* é observada unicamente em plantas (Waters et al., 1996), e reflete a intensa adaptação molecular destas proteínas a condições de estresse.

Outro aspecto da resposta celular ao estresse é a modulação de rotas de metabolismo de energia, que podem estar estreitamente relacionadas ao colapso oxidativo em células expostas a um estresse (KÜLTZ, 2005). Entre as proteínas envolvidas, as enzimas *Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase* (G3PDH), *6-phosphogluconate dehydrogenase* (6PGDH) e *Enolase* foram identificadas na região cambial da madeira de eucalipto. A indução destas enzimas durante o estresse pode ser útil para gerar equivalentes redutores (NADH, NADPH), que são necessários aos sistemas celulares antioxidantes. A *Enolase* é ativada em resposta a diversos tipos de

estresse, como aqueles desencadeados pela seca, frio, sal e anaerobismo, em diferentes espécies de plantas (LAL et al., 1991; UMEDA et al., 1994; FORSTHOEFEL et al., 1995). Em milho, a atividade enzimática e a abundância desta proteína foram aumentadas em resposta ao estresse hídrico (RICCARDI et al., 1998). A expressão desta enzima caiu vertiginosamente em raízes de arroz expostas ao estresse salino, chegando a desaparecer após 72 horas de tratamento (YAN et al., 2005). Estes resultados sugerem que a *Enolase* pode ser regulada nos níveis transcricional, traducional e pós-traducional. Em *Picea glauca*, sua expressão aumentou com o decorrer do processo de embriogênese, tornando-se a segunda proteína mais abundante em embriões maduros (LIPPERT et al., 2005), sendo indicada como um possível marcador para maturidade embriogênica nesta espécie.

O *spot* 126 foi identificado como *Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase*, uma enzima dependente de NAD^+ , que cataliza a reação de oxidação que ocorre durante a glicólise no citosol (HIGUCHI, 1997). Foram encontrados cinco tipos diferentes de mRNA relacionados à G3PDH na biblioteca SAGE. Transcritos que codificam esta proteína foram altamente expressos na madeira de compressão em *Pinus taeda* (WHETTEN et al., 2001) e em *Pinus pinaster* (PROVOST et al., 2003). Estas observações sugerem que a abundância de cópias de mRNAs deve estar relacionada à intensa atividade cambial dos tecidos amostrados, a qual demanda grande quantidade de energia.

4.10.2 Proteínas relacionadas à biossíntese de lignina

Cinco *spots* corresponderam à duas enzimas envolvidas no metabolismo da lignina, um polímero importante da parede celular que ocupa entre 20 e 30% da massa seca da madeira (GOUJON et al., 2003). Os *spots* 69 e 91 foram identificados como *Caffeoyl-CoA O-methyltransferase* (CCoAOMT), que cataliza a metilação do cafeoil CoA em feruoil-CoA, um precursor da lignina (COSTA et al., 1999). A outra proteína, *Caffeic acid 3 O-methyltransferase* (COMT), relacionada aos *spots* 06, 15 e 162, catalisa a conversão do ácido caféico em ácido ferúlico, e também a conversão do ácido 5-hidroxiferúlico em ácido sinápico (WHETTEN et al., 1998). Estudos mais recentes

demonstraram que a COMT é preferencialmente envolvida na formação de unidades de lignina do tipo *syringyl* (DIXON et al., 2001; LI et al., 2001). A Figura 20 sinaliza os pontos de atuação destas enzimas durante a biossíntese de lignina. Tendo em vista a importância da lignina nas plantas superiores, especialmente em culturas florestais de valor econômico, os genes envolvidos em sua síntese já foram amplamente estudados e identificados no transcrito e proteoma de *Eucalyptus* (PAUX et al., 2004, 2005; GION et al., 2005), *Pinus* (COSTA et al., 1999; PLOMION et al., 2000; WHETTEN et al., 2001) e *Populus* (MIJNSBRUGGE et al., 2000; MELLEROWICZ et al., 2001).

A expressão da CCoAOMT foi notadamente discreta na região cambial da madeira de eucalipto, ao passo que os dois tipos de mRNA identificados para esta enzima na biblioteca SAGE foram altamente abundantes. De forma inversa, a proteína COMT revelou-se a quarta mais abundante no mesmo tecido, enquanto a expressão do seu transcrito foi oito vezes menor. Curiosamente, o transcrito que codifica a CCoAOMT foi três vezes mais expresso na biblioteca de xilema quando comparado à de folha em *Eucalyptus* (PAUX et al., 2004), sendo também um dos transcritos mais expressos no xilema de *Populus* (BOERJAN et al., 2003). Em ambos os trabalhos, embora as árvores tenham sido amostradas em idades semelhantes, fatores importantes devem ser considerados, como o tecido amostrado, o qual não foi exatamente o mesmo, e também o ritmo de crescimento do eucalipto no Brasil, que é significativamente mais acelerado que nos países europeus, o que pode determinar a produção diferenciada de componentes da parede secundária.

Figura 20 - Rota da biossíntese da lignina. As enzimas marcadas em negrito foram identificadas na região cambial de eucalipto

4.10.3 Proteínas responsáveis pelo metabolismo

A enzima *S-adenosylmethionine-synthetase* (SAM-S) tem função auxiliar na rota da lignina, uma vez que a conversão do ácido caféico em ácido ferúlico pela COMT consome grandes quantidades de grupos metil, que são doados por proteínas *S-adenosylmethionine* (SAM). Em função disso, a formação da SAM é catalizada pela SAM-S, a partir da metionina e ATP (MIJNSBRUGGE et al., 1996). Na verdade, a função da SAM é mais abrangente, uma vez que age como doadora universal do grupo metil em muitas reações que envolve variados tipos de moléculas aceptoras, como ácidos nucleicos, ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos. Além disso, a proteína pode atuar como substrato para diversas reações envolvidas na biossíntese de vitaminas, poliaminas e nucleotídeos (CANTONI et al. 1977 apud GION et al., 2005) e do hormônio etileno (KENDE, 1993). Três *spots* foram identificados como *S-adenosylmethionine-synthetase* (2, 22, 46), constituindo a segunda proteína mais abundante entre as identificadas na região cambial da madeira de eucalipto. A expressão desta enzima em níveis significativos foi confirmada também nos estádios de

6 meses e de 3 anos do referido tecido. No transcritoma da região cambial, foram identificados 3, 2 e 3 tipos diferentes de mRNA que codificam a SAM-S, nas fases inicial, intermediária e avançada do desenvolvimento, respectivamente. Estas observações podem indicar uma complexa regulação do gene *SAM-S* para a doação do grupo metil durante a xilogênese (MIJNSBRUGGE et al., 2000).

A *Isoflavone reductase* (IFR) é uma enzima que desempenha funções no metabolismo secundário, embora há relatos de seu envolvimento na resposta ao estresse abiótico. A IFR foi moderadamente expressa nos *spots* 18, 34 e 95. Entretanto, foram encontrados 4 tipos de mRNA altamente expressos na biblioteca de cDNAs, totalizando 183 cópias. Dentre os mRNAs correspondentes às proteínas identificadas neste estudo, os transcritos da *Isoflavone reductase* foram os mais abundantes. Uma simples comparação mostra que a SAM-S, que foi a segunda proteína mais abundante, foi 2 vezes mais expressa que a IFR, ao passo que o número de mRNAs correspondente a esta proteína foi quase 6 vezes menor. Isto demonstra a dificuldade em estabelecer padrões de regulação característicos para as proteínas envolvidas na formação da madeira. Um único *spot* foi relacionado à enzima *Glutamine synthase* (GS) e ocupou posição central no gel bidimensional, com *pI* e massa molecular aproximada 5,8 e 40 KDa, respectivamente. Esta enzima (*spot* 05) está envolvida na assimilação do nitrogênio inorgânico em formas orgânicas – ela catalisa a condensação (dependente de ATP) da amônia com glutamato para produzir glutamina, que então fornece grupos nitrogênio para a biossíntese de todos os compostos nitrogenados na planta (YAN et al., 2005).

4.10.4 Proteínas geradoras de energia

O pH de compartimentos intracelulares em células eucarióticas é um parâmetro extremamente controlado, e que afeta muitos processos celulares como o transporte de membranas e a entrada de vírus na célula (NISHI; FORGAC, 2002). A proteína responsável pelo controle do pH intracelular é a *Vacuolar ATP-synthase* (V-ATPase). Esta enzima, identificada no *spot* 119, também está envolvida na sinalização intracelular de enzimas lisossomais, no processamento e degradação de proteínas e no transporte

de membranas (BOWMAN; BOWMAN, 2000). Uma proteína multimérica da mesma família foi identificada em dois *spots* – *ATP synthase mithochondrial*. O spot 27 correspondeu à ATP-synthase subunidade beta, enquanto a subunidade alpha foi identificada no spot 134. A enzima atua na síntese/hidrólise de ATP, processo localizado nas membranas e que resulta no fornecimento de energia para a célula MULLER et al., 1999; GRUBBER et al., 2001).

A *Phosphoglycerate kinase* (PGK) é uma enzima essencial à maioria das células vivas, para a geração de ATP através da rota glicolítica em organismos aeróbios, e para a fermentação em anaeróbios (PARSONS et al., 2001). A PGK já foi isolada de uma grande variedade de espécies, e são caracterizadas por serem monoméricas, com massas moleculares em torno de 45 KDa, mostrando alto grau de conservação estrutural e sequencial (AUERBACH et al., 1997). Os *spots* 24 e 158 corresponderam à PGK, ambas localizadas no citosol, entretanto ela também atua no cloroplasto. A PGK citosólica está envolvida na glicólise, catalisando a transferência de grupos fosforil no sentido da formação de ATP e 3-P-glicerato. Como em outras kinases, a PGK dobra-se em dois domínios globulares distintos, de tamanhos semelhantes, os quais sofrem intensa inclinação durante a catálise (ANDERSON et al., 2004). Na região cambial, a PGK foi observada em níveis significativos, enquanto seus transcritos foram pouco expressos na biblioteca SAGE, sugerindo que a regulação desta enzima pode se dar após a tradução do mRNA, através da substituição de aminoácidos, conforme foi observado em ambos *spots*.

4.10.5 Proteínas envolvidas em processos celulares

Proteínas ‘housekeeping’ realizam funções metabólicas básicas que são requeridas por todas as células. A Adenosine kinase (ADK) é uma típica enzima ‘housekeeping’, constitutivamente expressa, que cataliza a fosforilação da adenosina em monofosfatos de adenosina. Para a catálise, a enzima requer um íon divalente, geralmente Mg^{++} e um doador de fósforo, preferencialmente ATP ou GTP (MOFFAT et al., 1991). O envolvimento da ADK na reciclagem da adenina (Ade) e adenosina (Ado) contribui para a manutenção da carga de energia celular e para a síntese de uma

variedade de biomoléculas, incluindo cofatores e ácidos nucleicos (MOFFAT et al., 2002). Além disso, a enzima participa da conversão de bases e ribosídeos, formas ativas da citocinina, em seus nucleotídeos correspondentes, que são formas inativas, constituindo um importante mecanismo de regulação deste hormônio nas células vegetais (MOK; MARTIN, 1994). A *Adenosine kinase* foi identificada nos *spots* 80 e 84, mostrando-se significativamente expressa na região cambial. Da mesma maneira, a tag correspondente ao mRNA desta enzima foi encontrado em elevado número de cópias. O genoma de *Arabidopsis* codifica duas isoformas de ADK, que compartilham 92% de identidade de seqüências de aminoácidos, enquanto seus transcritos são expressos em diferentes níveis nas flores, raízes, caules e folhas (MOFFATT et al., 2000). Seqüências de ADK também foram isoladas em diversas espécies (SINGH et al., 1996; SPYCHALA et al., 1996; MATHEWS et al., 1998; SINHA et al., 1999), sublinhando a importância funcional desta proteína no metabolismo.

O *spot* 68 foi identificado como *Glyoxalase I*, uma enzima dependente de glutathione envolvida com proliferação celular em plantas, animais e bactérias e na resposta a diversos tipos de estresse. Células com intensa atividade respiratória geram grandes quantidades de aldeídos reativos, como por exemplo, o metilglioxalato, que é altamente tóxico e reage com DNA e outras proteínas (DIXON et al., 1998). Esta molécula pode ser detoxificada através de uma rota de glyoxalase dependente de glutathione, na qual participam a *Glyoxalase I* e *Glyoxalase II*. A *Glyoxalase I* apresenta grande variabilidade estrutural entre animais e plantas (INOUE; KIMURA, 1996; CLUGSTON et al., 1998; SAINT-JEAN et al., 1998), sendo observada como monômeros e dímeros com subunidades de diferentes pesos moleculares. Paulus et al. (1992) mostraram em cultura de células de soja que a atividade da enzima foi modulada durante o crescimento dependente de auxina, podendo ser utilizada como um marcador para proliferação celular. Em plantas de tomate submetidas ao tratamento com cloreto de sódio, manitol e ácido abscísico, foi observado acúmulo de transcritos de *Glyoxalase I* nas células, sugerindo que a enzima é requerida durante o estresse hídrico, tanto quanto na divisão celular (ESPARTERO et al., 1995). O *spot* 83 correspondeu à *Cell division cycle protein 48* homolog, uma proteína pertencente à família AAA ATPase, e que também participa na divisão e no crescimento celular.

Durante a citocinese, ela atua no sítio onde as vesículas de membrana são alvo para a deposição de novos materiais da parede celular (RIENTIES et al., 2005).

4.10.6 Biossíntese da parede celular

A UDP-D-glucose é um precursor de todos os carboidratos que compõem a parede celular, incluindo celulose, substâncias pécticas, hemicelulose, glicolipídios e outras moléculas glicosiladas (GIBEUT, 2000). Este composto pode ser sintetizado por meio de duas reações, sendo uma delas catalisada pela enzima *UDP-glucose pyrophosphorilase* (UGPase). Nas folhas, a UGPase está primariamente envolvida na biossíntese de sacarose, que é a principal forma de transporte de carbono em plantas. Em outros tecidos, como no endosperma da semente, participa da reação inversa, ou seja, utiliza a sacarose para a produção do precursor imediato do amido (WINTER; HUBER, 2000). Entre as proteínas identificadas na região cambial da madeira de eucalipto, a UGPase foi identificada em dois *spots* (61 e 131). Entretanto, foi observado que seu nível de expressão foi discreto, assim como o de seus transcritos. Em *Populus*, o cDNA correspondente a esta enzima também foi encontrado na biblioteca do câmbio vascular (MELLEROWICZ et al., 2001). Também foram encontrados cDNAs de dois genes UGP homólogos em arroz e em *Arabidopsis thaliana*, supostamente envolvidos em outras funções, de acordo com o estadio de desenvolvimento das plantas (BISHOP et al., 2002). Kleczkowski et al. (2004) relataram que as UGPases eucarióticas são significativamente divergentes daquela encontrada originalmente em bactérias, com apenas 8% de identidade de seqüências de aminoácidos, sugerindo uma complexa rota de evolução desta enzima. Em contrapartida, os mesmos autores apontaram entre 59 e 96% de identidade de seqüências entre as UGPases de plantas, demonstrando a importância de sua atividade no metabolismo de carboidratos.

4.10.7 Proteínas do citoesqueleto

Uma rede de compostos poliméricos, o citoesqueleto, fornece uma estrutura dinâmica para diversos processos celulares essenciais. Esta rede é formada por

microtúbulos e filamentos de actinas, geradas a partir de proteínas tubulinas e actinas, respectivamente (DROBAK et al., 2004). Sete *spots* foram identificados como *Tubulina*. Deste total, 3 *spots* (11, 25, 26) corresponderam à subunidade alpha, e os demais (12, 13, 14, 16) se referiram à subunidade beta desta proteína. Verificou-se que a *Tubulin α* foi a proteína mais expressa nos géis-2D preparados com os tecidos da região cambial, seguido da *Tubulin β* , a terceira mais abundante. Acredita-se que os microtúbulos podem determinar o padrão da parede celular através da definição da posição e orientação das microfibrilas de celulose durante a diferenciação dos elementos traqueais, provavelmente guiando o complexo sintetizador de celulose na membrana plasmática (CHAFFEY, 2000).

Os *spots* 23, 33, 35 e 74 corresponderam à proteína *Actina*, cujas ações estão direcionadas na manutenção da polaridade celular, por meio do fornecimento de sinais para o movimento de organelas celulares agrupadas, como também na resposta à estímulos ambiental (STRAIGER, 2000) e gravitacional (YAMANOTO; KISS, 2002), e na transdução de estímulos físicos, como por exemplo, o toque e a exposição à alta temperatura (STRAIGER et al., 2000; SCHMELZER, 2002). As *Actinas* também foram abundantes na região cambial, embora em menor proporção que as *Tubulinas*. Surpreendentemente, treze tipos distintos de mRNA correspondentes à *Actina* e doze tipos referentes à *Tubulina* (subunidades alpha e beta), foram encontrados na biblioteca de cDNAs da região cambial da madeira com 6,3 anos, sugerindo que deve haver forte regulação transcricional destes genes na região cambial, caracterizada por intensa divisão e diferenciação das células cambiais em células do floema e xilema. *Actin depolymerizing factor* (ADF) modula a organização do citoesqueleto actina, promovendo o desarranjo dos filamentos de actina. Esta proteína foi identificada pelo *spot* 104, e possui massa molecular de 16 KDa. Estudos mostram que ADFs podem ser requeridos na regulação osmótica em plantas sob estresse por sal, seca e frio (LUAN, 2002; YAN et al., 2005).

4.10.8 Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas

Entre os *spots* identificados neste estudo, quatro foram subunidades da proteína

Proteasome (alpha 2, alpha 4, alpha 6 e beta 2). Sabe-se que a atividade proteasome está estreitamente ligada com processos de proliferação celular, e que diminui quando as células são estimuladas a diferenciarem (LIPPERT et al., 2005). Isto está de acordo com o nível de expressão significativo desta enzima (*spots* 70, 77, 78, 103) na região cambial da madeira de eucalipto. A fosforilação reversível de fatores de tradução é considerada um dos principais mecanismos de regulação da síntese de proteínas em células eucarióticas. O *spot* 144 foi identificado como EF-2, um fator de elongação cuja atividade é potencialmente regulada por fosforilação. Diversas isoformas de EF-2 já foram identificadas em plantas e animais (CELIS et al., 1990; SMAILOV et al., 1993), possivelmente devido à ocorrência da modificação pós-traducional. Schnelbogi e Tanner (1991) demonstraram que a proteína conserva um domínio de fosforilação em plantas e animais. Embora a proteína EF-2 tenha sido encontrada no proteoma da região cambial, nenhum transcrito foi identificado na biblioteca de cDNA do mesmo tecido. A proteína *Eucaryotic initiation factor* (eIF-4A), identificada no *spot* 113, tem a função de desespiralizar estruturas secundárias do mRNA durante o início da tradução. Foi observado que a expressão da enzima foi relativamente modesta, assim como a de seu transcrito, presente em apenas duas cópias.

4.11 Discussão geral do experimento

A espectrometria de massa, utilizada para o sequenciamento de peptídeos trípticos de proteínas previamente resolvidas por eletroforese bidimensional, constitui uma estratégia eficiente para conhecer o conjunto de moléculas expressas em um tecido, sob uma determinada condição ou estadiu de desenvolvimento. No presente trabalho, muitas etapas envolvidas na execução de ambas as técnicas foram revistas a partir dos protocolos originais, ajustando a metodologia ao material que se objetivou estudar e ao tipo de espectrômetro de massa disponível para a realização das análises. Dessa maneira, êxito foi alcançado na identificação funcional dos *spots*, sendo a maioria deles abundantemente expressos no tecido analisado. Os espectros de massas MS/MS selecionados para gerar a Tabela 4 mostraram elevada contagem de íons, levando à identificação da maioria dos *spots* com pelo menos dois peptídeos, e em duas bases de

dados, não deixando dúvidas em relação à qualidade e confiabilidade dos resultados apresentados.

Entretanto, para um grande número de *spots* submetidos à digestão e à análise LC/MS/MS, não foram encontrados peptídeos (Figura 15, indicados por asterisco). Na maioria dos casos, muito embora o espectro MS mostrasse uma contagem significativa de íons, nenhum peptídeo dupla ou triplamente ionizado foi selecionado para a fragmentação e análise MS/MS. Mesmo nas situações em que um íon foi direcionado para a análise em *tandem*, não ocorreu contagem suficiente para que o peptídeo fosse sequenciado. Constatar tais averiguações e entender os fatores que poderiam contribuir para o insucesso de parte dos resultados foi, sem dúvida, o ponto mais crítico do trabalho.

Como já esclarecido anteriormente, foram preparados três géis bidimensionais para cada rodada de experimentos. Em cada rodada, os *spots* foram recortados dos géis, digeridos e submetidos à análise LC/MS/MS. Em seguida, os resultados dos programas de busca foram avaliados – os *spots* identificados com probabilidade superior a 70% foram validados; os demais, que tiveram baixa recuperação de peptídeos e aqueles que não apresentaram nenhuma sequência, foram encaminhados para a próxima rodada, a fim de passarem novamente pela análise de espectrometria de massa. Neste esquema, foram realizadas cinco rodadas, totalizando 15 géis bidimensionais pH 4-7. Em todas elas, foi observada elevada taxa de *spots* sem peptídeos recuperados, sendo revelada apenas a análise das massas. Alguns *spots* que se encontraram nesta situação em uma determinada rodada passaram a ser identificados na rodada seguinte, o que pode sugerir digestão incompleta da amostra, no entanto, a maioria deles permaneceu sem solução. Ao analisar visualmente estes *spots* nos géis bidimensionais, foi notado que estes mostraram intensidades diferenciadas, variando do fraco ao muito forte, e que estão distribuídos em uma ampla faixa de massas moleculares e pontos isoelétricos. Estas observações permitem inferir que não se trata de um problema restrito a uma determinada região do gel, e que não afeta apenas os *spots* que não possuem quantidade suficiente de proteína para gerar produtos de digestão passíveis de análise.

Além da baixa abundância da maioria dos *spots* resolvidos em géis 2D, outras limitações inerentes à técnica de eletroforese bidimensional podem ter contribuído para o grande número de *spots* sem peptídeos recuperados. É difícil prever quantas proteínas estão representadas nos *spots* pois, freqüentemente, produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel 2D. Além disso, um mesmo *spot* pode conter mais de uma proteína ou sofrer contaminação de uma proteína abundante localizada próxima a um *spot*, levando à falsa impressão de ser abundante. Gion et al. (2005) verificaram que 15,4% dos *spots* identificados por espectrometria de massa, corresponderam a misturas de proteínas. Gygi et al (2000) observaram em um gel bidimensional, produtos de 6 genes de levedura presentes em um único *spot*. Porubleva et al. (2001) alertaram que a quantidade de proteína contida em um *spot* pode ser reduzida por degradação proteolítica, e fragmentos proteolíticos não podem gerar peptídeos trípticos suficientes para a análise MS/MS, constituindo outro fator que pode contribuir para o insucesso da identificação de uma proteína.

Devido à complexidade da mistura protéica extraída de um tecido, vêm sendo desenvolvidas diversas estratégias que visam melhorar a separação de proteínas e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de identificação. Em géis bidimensionais, é recomendado utilizar faixas estreitas de pH a fim de aumentar a resolução das proteínas no gel e de melhorar a separação entre elas. Considerando a disponibilidade comercial de fitas de acrilamida com diferentes gradientes de pH, utilizadas para a isoeletrofocalização, as proteínas da região cambial separadas nos géis pH 4-7 poderiam conseguir maior resolução nas faixas de pH 3,5-5,5 / 4,5-5,5 / 5-6,5 e outras, para minimizar parte das limitações citadas.

Outra alternativa é utilizar técnicas de fracionamento combinadas no formato 2D, como a cromatografia líquida bidimensional (2D-HPLC), que utiliza uma coluna de troca iônica na primeira dimensão e outra de fase-reversa na segunda dimensão, para separar as proteínas em frações antes de serem digeridas (WAGNER et al., 2000). Recentemente, uma técnica de separação de alta resolução foi desenvolvida por Essader et al., (2005), na qual proteínas foram separadas na primeira dimensão em fitas de acrilamida com gradiente estreito de pH; em seguida, foram recortadas em pequenos pedaços para que os peptídeos fossem recuperados em uma série de lavagens e

eluídos por cromatografia de fase reversa na segunda dimensão. Comparando esta técnica com 2D-HPLC, os autores constataram que, para a separação das proteínas na primeira dimensão, o uso de fitas com gradiente de pH aumentou em 13% o número de proteínas identificadas, em relação ao uso da coluna de troca catiônica.

Diante do exposto, deve ser ponderado que, embora a técnica de eletroforese bidimensional proporcione, de fato, a separação de centenas de proteínas em um único gel, apenas uma parte delas pôde ser efetivamente identificada por espectrometria de massa. A maioria das proteínas identificadas no presente trabalho foi observada em abundância no tecido cambial. Estas proteínas exercem funções conhecidas, já descritas e relacionadas em diversos organismos, e muitas delas apresentam elevado grau de conservação, sendo encontradas em diferentes tipos de células. Provavelmente, as proteínas envolvidas diretamente em rotas metabólicas de interesse, especialmente na biossíntese de compostos da parede celular, estavam presentes, dentro da faixa de pH utilizada para separá-las, em quantidade insuficiente para permitir sua identificação. Identificar tais proteínas é essencial para o avanço no conhecimento sobre a regulação dos genes durante a formação da madeira. Para tanto, torna-se evidente, a partir deste estudo inicial, a necessidade de progredir no refinamento e combinação das tecnologias proteômicas, visando, a médio e longo prazos, o isolamento e manipulação de genes de interesse para incorporar à madeira de eucalipto, características mais favoráveis a diversos usos finais, especialmente para a produção de polpa celulósica e papel.

5 CONCLUSÕES

(i) A utilização da espectrometria de massa associada à cromatografia líquida, permitiu identificar *spots* abundantemente expressos na região cambial da madeira de *Eucalyptus grandis*, aos 6,3 anos de idade, separados previamente por eletroforese bidimensional;

(ii) Um grande número de *spots* de proteínas da região cambial, resolvidos em géis 2D, mostrou baixo nível de expressão e foram pobremente identificados, acusando limitações da técnica LC/MS/MS para o conhecimento de proteínas específicas do tecido e do processo celular estudados. O avanço no conhecimento do proteoma da madeira de eucalipto dependerá de melhorias nas técnicas de separação e sequenciamento das proteínas, bem como do uso combinado de métodos, que resultem no aumento da eficiência de identificação.

(iii) Em função das várias etapas de regulação dos genes e das limitações inerentes às técnicas utilizadas, uma correlação clara entre os níveis de proteínas e transcritos correspondentes não pôde ser definida, sendo observada apenas uma tendência a um grupo restrito de proteínas, cujo níveis de expressão foram inversamente proporcionais aos de seus respectivos mRNAs.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.H.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

ALLONA, I.; QUINN, M.; SHOOP, E.; SWOPE, K.; STCYR, S.; CARLIS, J.; RIEDL, J.; RETZEL, E.; CAMPBELL, M.M.; SEDEROFF, R.; WHWTTEN, R.W. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequenciag. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 16, p. 9693-9698, Aug. 1998.

AMSTRONG, J.P.; SKAAR, C.; de ZEEUW, C. The effect of specific gravity on several mechanical properties of some woods. **Wood Science Technology**, New York, v. 18, p. 137-146, 1984.

ANDERSEN, N.G.; ANDERSEN, N.L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, p. 443-453, 1996.

ANDERSON, L.E.; BRYANT, J.A.; CAROL, A.A. Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. **Protoplasma**, New York, v. 223, p. 103-110, June 2004.

ANDERSSON-GUNNERÅS, S.; MELLEROWICZ, E.J.; SEGERMAN, O.; OHMIYA, Y.; COUTINHO, P.M.; NILSSON, P.; HENRISSAT, B.; MORITZ, T.; SUNDBERG, B. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 144-165, Mar. 2006.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 2006. 120 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ANDRADE, E.N. **O Eucalipto**. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p.

ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 189, p. 32-51, 1996.

AUERBACH, G.; HUBER, R.; GRÄTTINGER, M.; ZAISS, K.; SCHURIG, H.; JAENICKE, R.; JACOB, U. Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. **Structure**, Philadelphia, v. 5, n. 11, p. 1475-1483, Nov. 1997.

BAE, M.S.; CHO, E.J.; CHO, E.Y.; PARK, O.K. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 652-663, 2003.

BALDWIN, M.A. Protein Identification by Mass Spectrometry. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.

BEYER, K.; BARDINA, L.; GRISHINA, G.; SAMPSON, H.A.J. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. **The Journal of allergy and clinical immunology**, St. Louis, v. 110, n. 1, p. 154-159, 2002.

BHALERAO, R.; NILSSON, O.; SANDBERG, G. Out of the woods: forest biotechnology enters the genomic era. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 206-213, 2003.

BISHOP, J.D.; MOON, B.C.; HARROW, F.; GOMER, R.H.; DOTTIN, R.P.; BRAZILL, D.T. A second UDP-Glucose pyrophosphorylase is required for differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. **Journal Biology Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 32430-32437, Aug. 2002.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 121-127, Mar. 1999.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-95, 1987.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review Of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOLAND, D.J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; **Forest trees of Australia**. Melbourne: CSIRO Publications, 1994. 687 p.

BOWMAN, E.J.; KENDLE, R.; BOWMAN, B.J. Disruption of *vma-1*, the gene encoding the catalytic subunit of the V-ATPase, causes severe morphological changes in *Neurospora crassa*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 167-176, Jan. 2000.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p.248-254, May 1976.

BRASIL se prepara para o mercado de redução de emissões. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 93, ano 15, nov. 2005. Disponível em < <http://www.remade.com.br/revista>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

BRAZETT, M.D. **Industrial Wood. Shell/World Wide Fund for Nature Tree Plantation Review**. London: Shell International Petroleum Company and World Wide Fund for Nature Tree Plantation, 1993. 68 p.

BRITO, J.O.; BARRICHELO, L.E.G. Correlações entre características físicas e químicas da madeira e a produção de carvão vegetal: I: Densidade e teor de lignina da madeira de eucalipto. **IPEF**, Piracicaba, n.14, p. 9-20, 1977.

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

BURLINGAME, A.L.; BOYD, R.K.; GASKELL, S.J. Mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 70, n. 16, p. 647R-716R, 1998.

CAMPO, S.; CARRASCAL, M.; COCA, M.; ABIAN, J.; SAN SEGUNDO, B. The defense of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 2, p. 385-396, 2004.

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

CARRÉ, I.A.; KIM, J.Y. MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1551-1557, July 2002.

CARR, S.G.M.; CARR, D.J.; ROSS, F.L. Male flowers in Eucalyptus. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 19, n. 1, p. 73-83, 1971.

CARRILHO, S.T. **Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus grandis***. 1995. 29 p. Monografia (Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

CELEDON, P.F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa**. 2006. 112 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CELIS, J.E.; MADSEN, P.; RYAZANOV, A.G. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Whashington, v. 87, p. 4231-4235, 1990.

CHAFFEY, N. Cambium: old challenges – new opportunities. **Trees – Structure and Function**, Berlin, v. 13, n. 13, p. 138-151, Fev. 1999.

CHAFFEY, N. **Cell and molecular miology of wood formation**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 530 p.

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.

CHIGNARD, N., BERETTA, L. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery. **Gastroenterology**, Baltimore, v.127, n. 5, p. 120-125, 2004.

CLUGSTON, S.L.; DAUB, E.; HONEK, J.F. Identification of glyoxalase I sequences in *Brassica oleracea* and *Sporobolus stapfianus*: Evidence for gene duplication events. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 230-234, Aug. 1998.

COMEÇA a segunda fase do Genolyptus. Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel. Disponível em: <http://www.abtcp.org.br/m5.asp?cod_noticia=721&codpagina=496>. Acesso em: 05 mar. 2006.

CONSOLI, L.; DAMERVAL, C. Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 2983-2989, 2001.

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, n. 4/5, p. 1098-1108, Apr./May 1999.

COTTERIL, P.P.; DEAN, C.A.; CAMERON, J.; BRINDBERGS, M. Nucleus breeding: a new strategy for rapid improvement under clonal forestry. In: IUFRO MEETING ON BREEDING TROPICAL TREES, 1989, Pattaya, Thailand. **Proceedings...** Washington: AACC Press, 1989. p. 1-15.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DAVIS, G.L. Floral morphology and the development of gametophytes in *Eucalyptus stellulata* Sieb. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 17, n. 2, p. 177-190, 1969.

DAVIS, R.H.; TANAKA, C.K.; VENSEL, W.H.; HURKMAN, W.J.; McCORMICK, S. Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 4864-4884, 2005.

DIXON, R.A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathway to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, New York, v. 57, n. 7, p. 1069-1084, Aug. 2001.

DIXON, D.P.; CUMMINS, I.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 258-266, June 1998.

DEJARDIN, A.; LEPLE, J.C.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; COSTA, G.; PILATE, G. Expressed sequence tags from poplar wood tissues – a comparative analysis from multiple libraries. **Plant Biology**, New York, v. 7, n. 1, p. 55-64, Jan. 2004.

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, n. 24, p. 15794-15799, Nov. 2002.

DOWNES, G.M.; HUDSON, I.L.; RAYMOND, C.A.; DEAN, G.H.; MICHELL, A.J.; SCHIMLECK, L.R.; EVANS, R.; MUNERI, A. **Sampling plantation *Eucalyptus* for wood and fibre properties**. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing, 1997. 132 p.

DROBAK, B.K.; FRANKLIN-TONG, V.E.; STRAIGER, C.J. The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. **New Phytologist**, Cambridge, v. 163, p. 13-30, 2004.

DUCK, N.; FOLK, W. Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 1031-1039, Nov. 1994.

DUNHAM, I.; SHIMIZU, N.; ROE, B.A. The DNA sequence of human chromosome 22. **Nature**, London, v. 402, n. 6761, p. 489-495, Dec. 1999.

EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 22, p. 475-483, 1949.

ESPARTERO, J.; PINTOR TORO, J.A.; PARDO, J.M. Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 217-227, May 1994.

ESSADER, A.S.; CARGILE, B.J.; BUNDY, J.L.; STEPHENSON Jr., J.L. A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 24-34, Jan. 2005.

EVANS, R. Rapid measurement of the transverse dimensions of tracheids in radial wood sections from *Pinus radiata*. **Holzforschung**, Berlin, v. 48, p. 168-172, 1994.

EVANS, R.; DOWNES, G.M.; MENS, D.; STRINGER, S. Rapid measurement of variation in tracheid transverse dimension in a radiata pine. **Appita Journal**, Victoria, v. 48, p. 134-138. 1995.

EVANS, R.; KIBBLEWHITE, R.P.; LAUSBERG, M. Relationships between wood and pulp properties of twenty five 13-years-old radiata pine trees. In: APPITA ANNUAL GENERAL CONFERENCE, CRC SYMPOSIUM FIBRES BEYOND, 52, 2000, Brisbane, Australia. **Proceedings...**, Brisbane: ACES, 1998. p. 10-22.

FAO. Global Forest resources assessment 2000 – main report. FAO Forestry paper. Disponível em < <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp> > Acesso em 28 mar. 2006.

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, n. 4926, p. 64-71, Oct. 1989.

FERREIRA, M. Melhoramento florestal e silvicultura intensiva com eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 31, p. 5-11, 1983.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. dos. Melhoramento genético florestal do Eucalyptus no Brasil . breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1997. p. 14-34.

FERREIRA, S. **Produção e qualidade da madeira serrada de clones de híbridos de *Eucalyptus* spp.** 2003. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FILLATTI, J.J.; SELLMER, J.; McCOWN, B.; HAISSIG, B.; COMAI, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 206, p. 192-199, 1987.

FOELKEL, C.E.B. Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 4, p. 66-69, July/Dec. 2005.

FORSTHOEFEL, N. R.; CUSHMAN, M.A.; CUSHMAN, J.C. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 108, n. 3, p. 1185-1195, July 1995.

FRANKLIN, E.C. Estimation of genetic parameters through four generations of selection in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE ON BREEDING THEORY, PROGENY, TESTING AND SEED ORCHARDS, 1986, Williamsburg. **Proceedings...** Washington, AACC Press, 1986. p. 200-209.

GIBEAUT, D.M. Nucleotide sugars and glucosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology And Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 69-80, 2000.

GION, J.M.; LALANNE, C.; LE PROVOST, G.; FERRY-DUMAZET, H.; PAIVA, J.; CHAUMEIL, P.; FRIGERIO, J.M.; BRACH, J.; BARRE, A.; DE DARUVAR, A.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; SOMMERER, N.; NEGRONI, L.; PLOMION, C. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 14, p. 3731-3751, Sept. 2005.

GOFFNER, D.; JOFFROY, I.; GRIMA-PETTENATI, J.; HALPIN, C.; KNIGHT, M.E.; SCHUCH, W.; BOUDET, A.M. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. **Planta**, Berlin, v. 188, n. 1, p. 48-43, Aug. 1992.

GOUJON, T.; SIBOUT, R.; EUDES, A.; MACKAY, J.; JOUANIN, L. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology And Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 677-687, 2003.

GRANIER, F. Extraction of plant protein for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 9, n. 11, p. 712-718, 1988.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 369-379, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, J.R. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 24, n. 5, p. 1074-1078, may 1994.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 39-63, Mar. 2002.

GRIMA-PETTENATI, J.; FEUILLET, C.; GOFFNER, D.; BORDERIES, G.; BOUDET, A.M. Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, n. 6, p. 1085-1095, Mar. 1993.

GRÜBER, G.; WIECZOREK, H.; HARVEY, W.R.; MÜLLER, V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 204, n. 15, p. 2597-2605, Aug. 2001.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.F.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular And Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, Mar. 1999.

GYGI, S.P.; CORTHAIS, G.L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 17, p. 9390-9395, Aug. 2000.

HAYAMA, R.; COUPLAND, G. Shedding light on the circadian clock and photoperiodic control of flowering. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 3-19, Feb. 2003.

HENZEL, W.; BILLECI, T.M.; STULTS, J.T.; WONG, S.C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 11, p. 5011-5015, Sept. 1993.

HERTZBERG, M.; ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; ANDERSON, A.; ERLANDSSON, R.; BLOMQVIST, 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. 14732-14737, Dec. 2001.

HIGA, A.R.; RESENDE, M.D.V. de. Melhoramento genético de *Eucalyptus* spp. na Embrapa. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7, 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. UFPR, 1993. p. 727.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**, Berlin: Springer Verlag, 1997. 362 p.

HILL, K.D.; JOHNSON, L.A.S. Systematic studies in the *Eucalyptus*: a revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, Wales, v. 6, n. 2/3, p. 185-504, 1995.

HOWARTH, C.J. Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock. **Plant Cell And Environment**, Oxford, v. 14, p. 831-841, 1991.

HURKMAN, W.; TANAKA, C. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, Washington, v. 81, n. 3, p. 802-806, July 1986.

IDEKER, T.; THORSSON, V.; RANISH, J.A.; CHRISTMAS, R.; BUHLER, J.; ENG, J.K.; BUMGARNER, R.; GOODLETT, D.R.; AEBERSOLD, R.; HOOD, L. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. **Science**, Washington, v. 292, p. 929-934, May 2001.

INOUE, Y.; KIMURA, A. Identification of the structural gene for glyoxalase I from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 42, p. 25958-25965, Oct. 1996.

IUSEUM, A.N.; CORREA de LIMA, J.P.; MERCADO, R.S. Brazil: The Forest sector's participation in international trade. In: NAGY, A. (Ed.). **International Trade in Forest Products**. Bicester: A.B. Academic Publishers, 1988, p. 37-46.

IVKOVICH, M.; KOSHY, M. Optimisation of multiple trait selection of Western Hemlock including pulp e paper properties. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 59, n. 5/6, p. 577-582, July/Oct. 2002.

KAGEYAMA, P.Y. **Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden**. 1980. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 20, p.2299-2301, Oct. 1988.

KAZAN, K. Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, n.10, p. 468-471, Oct. 2003.

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

KERIM, T.; IMIN, N.; WEINMAN, J.J.; ROLFE, B.G. Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 5, p. 738-751, 2003.

KLECZKOWISKI, L.A.; GEISLER, M.; CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H. UDP-Glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n.3, p. 912-918, Mar. 2004.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, p. 231-243, 1975.

KÜLTZ, D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3119-3124, Sept. 2003.

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

LAL, S.K.; JOHNSON, S.; CONWAY, T.; KELLEY, P. Characterization of a maize cDNA that complements an enolase-deficient mutant of *Escherichia coli*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, n. 5, p. 787-795, May 1991.

LANDRY, S.J.; GIERASCH, L.M. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to *in vivo* protein folding. **Annual Review of Biophysics And Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 23, p. 645-669, 1994.

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, n. 6, p. 820-830, Oct. 2003.

LEE, P.S.; SHAW, L.B.; CHOE, L.H.; MEHRA, A.; HATZIMANIKATIS, V.H.; LEE, K.H. Experimental insights into the relation between mRNA and protein expression patterns in *Escherichia coli*. **Biotechnology And Bioengineering**, New York, v. 84, n. 7, p. 834-841, Dec. 2003.

LEITE, N.B. Avanços da silvicultura brasileira são significativos. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 4, p. 58-61, July/Dec. 2005.

LI, L.; CHENG, X.F.; LESHKEVICH, J.; UMEZAWA, T.; HARDLING, S.A.; CHIANG, V.L. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in Angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 7, p. 1567-1585, July 2001.

LIMA, W.P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 1993. 301 p.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, 1988

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 2, p. 461-473, Feb. 2005.

LOPEZ, M.; BERGGREN, K.; CHERNOKALSKAYA, E.; LAZAREV, A.; ROBINSON, M.; PATTON, W. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, n. 17, p. 3673-3683, Nov. 2000.

LORENZ, W.W.; DEAN, J.F. SAGE profiling and demonstration of differential gene expression along the axial developmental gradient of lignifying xylem in loblolly pine (*Pinus taeda*). **Tree Physiology**, Heron, v. 22, p. 301-310, 2002.

LUAN, S. Signalling drought in guard cells. **Plant Cell And Environment**, Oxford, v. 25, p. 229-237, 2002.

MACKNIGHT, R.; DUROUX, M.; LAURIE, R. Functional significance of the alternative transcript processing of the *Arabidopsis* floral promoter FCA. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 877-888, Apr. 2002.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, London, v. 21, p. 255-261, Mar. 2003.

MATHESIUS, U.; KEIJZERS, G.; NATERA, S.H.; WEINMAM, J.J. DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE, B.G. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. **Proteomics**, Weinheim, v. 1, P. 11, P. 1424-1440, Nov. 2001.

MATHEWS, I.I.; ERION, M.D.; EALICK, S.E. Structure of human adenosine kinase at 1,5 Å resolution. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 15607-15620, 1998.

MÉCHIN, V.; CONSOLI, L.; LE GUILLOUX, M.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 7, p. 1299-1302, July 2003.

MEGRAW, R. **Wood quality factors in loblolly pine**. Atlanta: Tappi Press, 1985. 96 p.

MEHRA, A.; LEE, K.H.; HATZIMANIKATIS, V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. theoretical considerations. **Biotechnology And Bioengineering**, New York, v. 84, n. 7, p. 822-833, Dec. 2003.

MELLEROWICZ, E.J.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 239-274, n. 1/2, Sept. 2001.

MENKE, A.L. de M.; ODA, S.; VENCOSKY, R. Problemas no melhoramento genético clássico do eucalipto em função da alta intensidade de seleção. **IPEF**, Piracicaba, n. 41/42, p. 8-17, jan./dez. 1989.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood Tree Biotechnology. **In Vitro Cellular And Development Biology. Plant**, Columbia, v. 41, p. 602-619, Oct. 2005.

MIJNSBRUGGE, K.V.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; BOERJAN, W. Tissue-specific expression conferred by the S-adenosyl-L-methionine synthase promoter of *Arabidopsis thaliana* in transgenic poplar. **Plant And Cell Physiology**, Tokyo, v. 37, p. 1108-1115, 1996.

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

MOFFATT, B.A.; STEVENS, Y.Y.; ALLEN, M.S.; SNIDER, J.D.; PEREIRA, L.A.; TODOVORA, M.; SUMMERS, P.S.; WERETILNYK, E.A.; McCAFFREY, L.M.; WAGNER, C. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. **Plant Physiology**, Washington, v. 128, n. 3, p. 812-821, Mar. 2002.

MOFFATT, B.A.; WANG, L.; ALLEN, M.; STEVENS, Y.; QIN, W.; VON SCHWARTZENBERG, K. Adenosine kinase of *Arabidopsis thaliana*: kinetic properties and gene expression. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 4, p. 1775-1785, Dec. 2000.

MOFFATT, B.A.; PETHE, C.; LALOUE, M. Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. **Plant Physiology**, Washington, v. 95, n. 3, p. 900-908, Mar. 1991.

MOK, D.W.S.; MARTIN, R.C. Cytokinin metabolic enzymes. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.). **Cytokinins. Chemistry, Activity and Function**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 129-137.

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

MÜLLER, V.; RUPPERT, C.; LEMKER, T. Structure and function of the A_1A_0 -ATPases from Methanogenic Archaea. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 31, p. 15-28, 1999.

MUNERI, A.; BALODIS, V. Determining fibre coarseness of small wood samples from *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus grandis* by Kajaani FS200 fibre analyzer. **Appita Journal**, Victoria, v. 50, p. 405-408, 1997.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 18 jan. 2006.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest Biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In **Vitro Cellular And Development Biology. Plant**, Columbia, v. 41, p. 701-717, Nov./Dec. 2005.

NIE, L.; WU, G.; ZHANG, W. Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 339, n. 2, p. 603-610, Jan. 2006.

NISHI, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H^+)-ATPASES – nature's most versatile proton pumps. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 3, p. 94-102, Feb. 2002.

O Eucalipto e suas origens. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 59, ano 11, set. 2001. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista>>. Acesso em: 05 mar. 2006.

O'Farrel, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal Of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

PANDEY, A., MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, London, v. 405, n. 6788, p. 837-846, June 2000.

PANSHIN, A.J.; de ZEEUW, C. **Textbook of wood technology**. New York: McGraw-Hill book Company, 1980. 722 p.

PARSONS, M.; FURUYA, T.; PAL, S.; KESSLER, P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. **Molecular And Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 115, p. 19-28, 2001.

PAULUS, C.; KÖLLNER, B.; JACOBSEN, H.J. Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension. **Planta**, Berlin, v. 189, n. 4, p. 561-566, Apr. 1993.

PAUX, E.; TAMASLOUKHT, M.B.; LADOUCE, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATTI, J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 263-280, May 2004.

PAUX, E.; CAROCHA, V.; MARQUES, C.; SOUSA, A.M. de.; BORRALHO, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, p. 89-100, 2005.

PEREIRA, A.B.; MARQUES JÚNIOR.; O.G.; RAMALHO, M.A.P.; ALTHOFF, P. Eficiência da seleção precoce em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., avaliadas na região noroeste do Estado de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 45-50, 1994.

PILATE, G.; DEJARDIN, A.; LAURANS, F.; LEPLE, J.C. Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 164, n. 1, p. 63-72, Oct. 2004.

PLOMION C, PIONNEAU C, BAILLERES H. Analysis of protein expression along the normal to tension wood gradient in *Eucalyptus gunnii*. **Holzforschung**, Berlin, v. 57, p. 353-358, 2003.

PLOMION C, PIONNEAU C, BRACH J, COSTA P, BAILLERES H. Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 3, p. 959-969, July 2000.

PORUBLEVA, L.; VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.; CHITNIS, P. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, n. 9, p. 1724-1738, May 2001.

POT, D.; CHANTRE, G.; ROZENBERG, P.; RODRIGUES, J.C.; JONES, G.L.; PEREIRA, H.; HANNRUP, B.; CAHALAN, C.; PLOMION, C. Genetic control of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Annals of Forest Science**, Paris, v. 59, n. 5/6, p. 563-575, July/Oct. 2002.

PRYOR, L.D. **The Biology of *Eucalyptus***. London: Edward Arnold, 1976. 82p.

PRYOR, L.D. Selecting and breeding for cold resistance in *Eucalyptus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 6, p. 98-109, 1957.

RAYMOND, C. Genetics of *Eucalyptus* wood properties. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 59, n. 5/6, p. 525-531, July/Oct. 2002.

RENAUT, J.; LUTTS, S.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J.F. Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. **Plant Biology**, New York, v. 6, n. 1, p. 81-90, 2004.

RESENDE, M.D.V. de. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999, cap. 17, p. 589-647.

REZENDE, G.D.S.P. O Eucalipto Aracruz. Disponível em: <<http://www.aracruz.com.br/web/pt/imprensa/artigos/artigos3.htm>>. Acesso em 6 abr. 2006.

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; de VIENNE, D.; ZIVY, M. **Plant Physiology**, Washington, v. 117, n. 4, p. 1253-1263, Aug. 1998.

RIENTIES, I.M.; VINK, J.; BORST, J.W.; RUSSINOVA, E.; DE VRIES, S.C. The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 lambda and the PP2C phosphatase KAPP. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 3, p. 394-405, June 2005.

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

ROCHA, M.P.; TOMASELLI, I. Efeito do modelo de corte nas dimensões de madeira serrada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus dunni*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n. 1, p. 94-103, 2001.

RODRIGUEZ, L.C.E. Modernização do setor depende de mais investimentos. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 4, p. 72-75, July/Dec. 2005.

RUGGERI, P. Contributo alla carilogia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 14, p. 111-120, 1961.

SAINT-JEAN, A.P.; PHILLIPS, K.R.; CREIGHTON, D.J. Active monomeric and dimeric forms of *Pseudomonas putida* glyoxalase I: Evidence for 3 D domain swapping. **Biochemistry**, Washington, v. 37, n. 29, p. 10345-10353, July 1998.

SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2522-2532, Sept. 2004.

SCHEELE, G.A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 5375-5385, 1975.

SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 7, p. 411-415, 2002.

SCHNELBOGI, G.; TANNER, W. **Plant Physiology**, Washington, v. 97, n. 1, p. 469-471, Sept. 1991.

SEDEROFF, R.R.; CAMPBELL, M.; O'MALLEY, D.; WHETTEN, R. Genetic regulation of lignin biosynthesis and the potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v. 28, p. 313-355, 1994.

SHELBOURNE, C.J.A. Genetic gains from different kinds of breeding population and seed or plant production population. **South African Forestry Journal**, v. 160, p. 49-66, 1992.

SHEORAN, I.S.; OLSON, D.J.H.; ROSS, A.R.S.; SAWHNEY, V.K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 14, p. 3752-3764, Sept. 2005.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.; PODTELEJNIKOV, A.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 25, p. 14440-14445, Dec. 1996.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometry sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, J. C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 92, p. 61-66, out. 2005.

SINGH, B.; HAO, W.H.; WU, Z.C. Cloning and characterization of cDNA for adenosine kinase from mammalian (Chinese hamster, mouse, human and rat) species. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 241, n. 2, p. 564-571, Oct. 1996.

SINHA, K.M.; GOSH, M.; DAS, I.; DATTA, A.K. Molecular cloning and expression of adenosine kinase from *Leishmania donovani*: identification of unconventional P-loop motif. **The Biochemistry Journal**, London, v. 399, p. 667-673, 1999.

SMAILOV, S.; LEE, A.V.; ISKAKOV, B.K.; Study of phosphorylation of translation elongation factor 2 (EF-2) from wheat germ. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 219-223, Apr. 1993.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e números do setor florestal brasileiro**. São Paulo: SBS, 2005.

SPYCHALA, J.; DATT, N.S.; WAKUBAYASHI, K.; FOX, I.H.; GRIBBIN, T.; MITCHELL, S.B. Cloning of human adenosine kinase cDNA: functional expression and sequence similarity to ribo- and fructokinases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 1232-1237, 1996.

STEEN, H., MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sept. 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, Out. 1998.

STRAIGER, C.J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. **Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 257-288, 2000.

SWISS PROT. Disponível em: < <http://br.expasy.org/sprot> >. Acessos em: 2005 e 2006.

TOLFO, A.L.T.; PAULA, R.C. de.; BONINE, C.A.V.; BASSA, A.; VALLE, C.F. do. Parâmetros genéticos para caracteres de crescimento, de produção e tecnológicos da madeira em clones de *Eucalyptus* spp. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 67, p. 101-110, abr. 2005.

TOMASELLI, I.; SIQUEIRA, J.D.P. O apagão e o Brasil Florestal 2020. **STCP Informativo**, São Paulo, n. 8, p. 4-9, 2005.

TRUGILHO, P.F.; LIMA, J.T.; MORI, F.A.; LINO, A.L. Avaliação de clones de *Eucalyptus* para a produção de carvão vegetal. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 104-114, 2001.

TURNBULL, J.W. Eucalypt plantations. **New Forests**, Dordrecht, v. 17, n. 1/3, p. 37-52, 1999.

TURNBULL, J.W. Future use of Eucalyptus: opportunities and problems. In: SCHONAU, A.P.G. (Ed). INTERNATIONAL UNION OF FORESTRY RESEARCH ORGANISATIONS SYMPOSIUM ON INTENSIVE FORESTRY: THE ROLE OF *Eucalyptus*. Pretoria, 1991, p. 2-27.

UMEDA, U.; HARA, C.; MATSUBAYASHI, Y.; LI, H.H. Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, p. 469-478, 1994.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579-620, 1991.

ZHI CHUN, Z. GUANG RONG, L.; GUANG LIN, H.; BING XING, C.; YAO KE, L. Genetic control of wood chemical composition and its implication for wood breeding of Masson pine. **Scientia Silva Sinicae**, New York, v. 36, p. 110-115, 2000.

ZOBEL, B.; JETT, J. **Genetics of wood production**. New York: Springer-Verlag, 1995. 337 p.

WAGNER, K.; RACAITYTE, K.; UNGER, K.K.; MILIOTIS, T.; EDHOLM, L.E.; BISCHOFF, R.; MARKO-VARGA, G. Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 893, n. 2, p. 293-305, Oct. 2000.

WATERS, E.R.; LEE, G.J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 296, p. 325-338, Mar. 1996.

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

WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 585-609, 1998.

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 And Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.

WILM, M.; MANN, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 1-8, 1996.

WIMMER, R.; DOWNES, G.M.; EVANS, R.; RASMUSSEN, G., FRENCH, J. Direct effects of wood characteristics on pulp and handsheet properties of *Eucalyptus globules*. **Holzforschung**, Berlin, v. 56, p. 244-252, 2002.

WINTER, H.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 31-67, 2000.

WULFKUHLE, J.; ESPINA, V.; LIOTTA, L.; PETRICOIN, E. Genomic and proteomic technologies for individualization and improvement of cancer treatment. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 17, p. 2623-2632, 2004.

YAMAMOTO, K.; KISS, J.Z. Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 128, n. 2, p. 669-681, Feb. 2002.

YAN, J.X.; SANCHEZ, J.C.; BINZ, P.A.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D. Method for identification and quantitative analysis of protein lysine methylation using matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometry and amino acid analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, n. 4/5, p. 749-754, Apr./May 1999.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n.1, p. 235-244, Jan. 2005.

YANG, S.H.; VAN ZYL, L.; NO, E.G.; LOOPSTRA, C.A. Microarray analysis of genes preferentially expressed in differentiating xylem of loblolly pine (*Pinus taeda*). **Plant Science**, Limerick, v. 166, n. 5, p. 1185-1195, May 2004.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pré mRNA in higher plants. **The Journal Of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 40623-40632, 2002.