**Universidade de São Paulo**

**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucalyptus grandis*

**Eduardo Leal Oliveira Camargo**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração em Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba**

**2008**

**Eduardo Leal Oliveira Camargo**

**Engenheiro Agrônomo**

# Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucalyptus grandis*

Orientador:

Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração em Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba**

**2008**

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

Camargo, Eduardo Leal Oliveira
Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucaliptus grandis* / Eduardo Leal Oliveira Camargo. - - Piracicaba, 2008.
94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Anatomia vegetal 2. Espectrometria de massas 3. Eucalipto 4. Madeira – formação 5. Proteínas de plantas I. Título

CDD 634.9734

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

*...como foi difícil começar essa caminhada,*
*principalmente sem ter suas boas vindas no retorno ao lar!*
*Como a senhora me faz falta!*
*Quantas dificuldades que enfrentei...*
*...decisões tive que tomar!*
*Como gostaria de tê-la ao meu lado,*
*como gostaria de ouvi-la dizer o quanto está orgulhosa!*

*Apesar da saudade, sei que a senhora esteve e estará sempre ao meu lado,*
*esta conquista também é sua.*

*A senhora, Vó Cyrilla,*

*eu dedico essa dissertação!*

*Aos meus pais, Elisabeth e Elpídio,*
*que me ensinaram os valores e princípios para a vida,*

*a minhas irmãs, Carol e Claudia,*
*por todo apoio e compreensão,*

*a minha madrinha Enid,*
*exemplo de vida e dedicação ao próximo,*
*pelo estímulo e apoio incondicional,*

*a Joyce, minha companheira,*
*por todo apoio, dedicação e incentivo,*
*pelo amor e amizade...*

*...a vocês, ofereço essa dissertação!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar sempre meu caminho, dando-me forças para avançar sobre as dificuldades e sabedoria para aprender com estas;

Ao Professor, orientador, Carlos Alberto Labate e a Doutora Mônica Veneziano Labate, por todos os conselhos, exemplos e amizade. Obrigado pelo crescimento profissional e pessoal que me proporcionaram.

À Fernanda Salvato, parceira durante essa caminhada. Você, Fer, fez com que todos as extrações, géis e tantos outros protocolos ficassem bem mais fáceis e, claro, engraçados! Obrigado por sua amizade e por enfrentar comigo todas as dificuldades encontradas durante a elaboração desse trabalho.

À CAPES pelo oferecimento de uma bolsa para elaboração desse trabalho;

À empresa Suzano Papel e Celulose pelo apoio financeiro e material biológico;

À Lívia Maria Franceschini pela amizade, paciência, compreensão e por sempre estar sempre disposta a me ajudar.

À Karem G. Xavier Meirelles por todo incentivo, ajuda e conselhos, torcida e amizade incondicional;

À Maria Solizete Granziol Silva pela amizade e pronta disponibilidade em ajudar os alunos do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas;

Aos professores Murilo de Melo, Beatriz Appezzato da Glória, Ricardo Ferraz de Oliveira, Ricardo Alfredo Kluge, Victor Vitorello, Sonia Maria de Stefano Piedade e Carlos Alberto Labate pelos ensinamentos durantes as disciplinas cursadas;

Aos Professores Marcio Lambais, Ricardo Azevedo e Siu Mui Tsai pelo empréstimo de equipamentos;

À Alexander de Andrade, Luis Felipe Boaretto e Simão Lindoso pela ajuda e sugestões neste trabalho;

À Danielle Gregório G. Caldas, Mayra C. C. Gallo de Carvalho, Gabriela Conti e Michele C.P. Silva pelos conselhos, apoio e amizade;

À Gunta Gutmanis pela amizade e pela companhia durante a elaboração dessa dissertação;

Aos amigos do laboratório Ana Letícia Bertolo, Daniela Defávari do Nascimento, David Henry Moon, Edenilson Rabello, Felipe Marques, Gisele Lacerda, Ivan Mozol, José Matheus Bonatto, Juliana Calderan, Juliano Bragatto, Luis Otávio Pagotto, Lilia Barbosa, Paola Celedón, Simone Bragatto, Thiago Falda, pelos momentos de descontração, mas sempre muito produtivos;

Aos petianos do grupo PET Biotecnologia Agrícola em especial ao tutor Prof. Flávio César Almeida Tavares;

Aos amigos da República Boi Babão Coroiña, Fiotão, Juruna, Tioziño, Frigobar, Tadeu, Kidureza, Rezet, Pegadiña, Liso, Bañero, Duente, Argola, Le-K, Bordado, Kebra-kexo, Dipliq, Kangóti, Di-véio, Refugo, Recruta, Ralado e Vo$^2$bói;

À todos que ajudaram durante a realização da dissertação.

# SUMÁRIO

**RESUMO**..... 9
**ABSTRACT**..... 10
**LISTA DE FIGURAS**..... 11
**LISTA DE TABELAS**..... 13
**1 INTRODUÇÃO**..... 14
**2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**..... 16
**2.1 O eucalipto**..... 16
**2.1.1 O setor florestal brasileiro e a importância do eucalipto**..... 17
**2.1.2 Melhoramento genético do eucalipto**..... 18
**2.1.3 Biotecnologia florestal**..... 19
**2.2 Madeira**..... 20
**2.2.1 Câmbio vascular**..... 20
**2.2.2 Xilema**..... 21
**2.2.3 Xilogênese**..... 23
**2.2.4 Qualidade da madeira**..... 25
**2.2.5 Madeira juvenil e madeira adulta**..... 25
**2.3 Proteômica**..... 27
**2.3.1 Análise proteômica da região cambial de árvores juvenis de *E. grandis***.... 28
**2.3.2 Espectrometria de Massas**..... 30
**2.3.2.1 Gel bidimensional**..... 30
**2.3.2.2 Espectrômetro de massas**..... 31
**2.3.2.3 Bioinformática**..... 33
**3 MATERIAL E MÉTODOS**..... 35
**3.1 Material vegetal e amostragem**..... 35
**3.2 Extração de proteínas**..... 35
**3.2.1 Solubilização de proteínas**..... 36
**3.2.2 Quantificação das proteínas**..... 36
**3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida**..... 37
**3.2.4 Coloração do mini-gel**..... 37

**3.3 Eletroforese bidimensional..... 37**
**3.3.1 Focalização isoelétrica (primeira dimensão)..... 38**
**3.3.2 Eletroforese (segunda dimensão)..... 38**
**3.3.3 Coloração dos géis..... 38**
**3.4 Análise de imagem..... 39**
**3.5 Digestão das proteínas..... 39**
**3.6 LC-MS/MS..... 40**
**3.7 Análise dos espectros de massas..... 41**
**3.8 Identificação das proteínas..... 41**
**4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 42**
**4.1 Extração das proteínas..... 42**
**4.2 Géis bidimensionais..... 43**
**4.2.1 Análise das imagens dos géis..... 44**
**4.2.2 Escolha dos *spots* e digestão..... 45**
**4.3 Espectrometria de Massas..... 45**
**4.3.1 Análise dos espectros..... 45**
**4.3.2 Proteínas da região cambial de árvores adultas de eucalipto..... 47**
**4.3.3 Múltiplos *spots* de uma mesma proteína..... 59**
**4.4 Classificação funcional das proteínas..... 60**
**4.5 Proteínas envolvidas com a xilogênese..... 66**
**4.5.1 Divisão celular..... 66**
**4.5.2 Elongação..... 68**
**4.5.3 Biossíntese da parede celular..... 69**
**4.5.4 Lignificação..... 71**
**4.5.5 Morte celular programada..... 73**
**5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 74**
**REFERÊNCIAS..... 75**
**ANEXOS..... 88**

## RESUMO


### Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucalyptus grandis*

O gênero *Eucalyptus* é a fonte principal de madeira para a indústria de papel e celulose de países tropicais e subtropicais e tem sido extensivamente estudado. Apesar de sua importância econômica, muito pouco é conhecido sobre o controle genético da formação da madeira (xilogênese) no eucalipto. Diferentes propriedades da madeira são observadas durante o desenvolvimento das árvores e a madeira é classificada como madeira juvenil e adulta. A madeira juvenil comparada à adulta apresenta células com paredes delgadas, alta concentração de lignina e baixa densidade; características indesejáveis para a indústria florestal. A identificação de proteínas e genes que regulam os processos genéticos de formação da madeira juvenil e adulta é, portanto, alvo potencial para estudos relacionados a modificações específicas visando melhorar a qualidade da madeira. O objetivo deste trabalho foi identificar as proteínas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* envolvidas no processo de formação da madeira adulta. A proteína total foi extraída de árvores com 22 anos e submetida à eletroforese bidimensional. Os *spots* foram isolados de cada uma das repetições do gel e após digestão tríptica, submetidos ao sequenciamento por cromatografia líquida associada ao espectrômetro de massas Q-TOF Ultima API (Waters, UK). Os espectros foram analisados pelo programa MASCOT MS/MS Ion Search, utilizando o banco de dados MSDB. Um total de 82 proteínas foram identificadas e classificadas em seis categorias funcionais: metabolismo e energia (36%), processos celulares (11%), transporte (2%), estrutura e organização da estrutura (11%), vias de informação (30%) e sem função definida (10%). Muitas das proteínas identificadas participam dos mecanismos de controle da biossíntese da parede celular e, conseqüentemente, da formação da madeira. Os dados gerados irão facilitar uma futura comparação e seleção de proteínas diferencialmente expressas em árvores juvenis e adultas durante xilogênese.


Palavras-chave: Formação da madeira; Madeira adulta; *Eucalyptus*; Proteoma.

## ABSTRACT


### Proteomic analysis of the cambial region from mature *Eucalyptus grandis* trees

The *Eucalyptus* genus is the main source of hardwood for the pulp and paper industry in tropical and subtropical countries and is being extensively studied. Despite its economical importance, very little is known about the genetic control of wood formation (xylogenesis) in eucalypts. Different wood properties are observed during tree development and the wood is classified as juvenile and mature. The juvenile wood is characterized by cells with large lumen and thinner walls, lower density, higher lignin content and poor quality for pulp production, when compared to mature wood. The identification of proteins and genes that regulate the process in both mature and juvenile wood formation is, therefore, a potential target for studies related to specific modifications to alter wood quality. The aim of this work was to identify proteins which participate in the process involved in mature wood formation by isolating proteins from the cambial region of *Eucalyptus grandis*. The total protein was extracted from 22 year-old trees and two-dimensional gel electrophoresis was carried out. Proteins were excised from the gels and after tryptic digestion, MS analysis was conducted by on line chromatography using a Cap-LC coupled to a Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters, UK). The spectra were processed using MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com), and the sequences searched against MSDB database. A total of 82 proteins were identified and classified into six main functional categories: metabolism and energy (36%), cellular processes (11%), transport (2%), structure and structural organization (11%), information pathways (30%), non defined function (10%). Many of the identified proteins play a role in the mechanisms involved in the control of cell wall biosynthesis, and consequently in wood formation. The generated data will facilitate a further comparison and selection of proteins differentially expressed in mature and juvenile trees during xylogenesis.


Keywords: Wood formation; Mature wood, *Eucalyptus*; Proteome.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmbio Vascular formado pelas células iniciais e derivadas..... 21

Figura 2 - Tipos de células presentes no xilema primário e secundário (TAIZ e ZEIGER, 2004)..... 22

Figura 3 - Padrão de deposição das microfibrilas de celulose na parede primária e nas camadas S1, S2 e S3 da parede secundária (TAIZ & ZEIGER, 2004)..... 24

Figura 4 - Localização e principais características da madeira adulta e juvenil..... 26

Figura 5 - Modelo do princípio de análise de um espectrômetro de massas Q-TOF com operação em modo MS/MS..... 32

Figura 6 - Amostragem do material vegetal de árvores de eucalipto. (A) Remoção da casca; (B) Raspagem do tecido da região cambial..... 35

Figura 7 - Proteínas da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos, separadas em gel 12,5% de acrilamida. M: Marcador de peso molecular (SDS-PAGE Standards, Low Range, BioRad) KDa: Kilo Daltons..... 42

Figura 8 - Perfil de distribuição das proteínas de pI 3-10 da região cambial de *E. grandis* com 22 anos. Área delimitada pelo retângulo indica a faixa de pH 4-7, com a maior concentração de proteínas..... 43

Figura 9 - Triplicata dos géis com as proteínas de pI 4-7 da região cambial de *E. grandis* com 22 anos..... 43

Figura 10 - Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação ao gel escolhido como referência..... 44

Figura 11 - Seleção dos parâmetros para busca de íons MS/MS no programa MASCOT..... 46

Figura 12 - Gráfico gerado pelo programa MASCOT com a somatória da pontuação gerada a partir da probabilidade de cada íon. Íons com pontuação superior a 34 indicam uma similaridade com nível de significância > 95%..... 46

Figura 13 - Gel bidimensional (pH 4-7) da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos. Os números correspondem aos *spots* selecionados para a análise..... 59

Figura 14 - Classificação funcional das 106 proteínas identificadas da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos..... 61

Figura 15 - Ciclo do Metil em plantas (MIJNSBRUGGE et al., 2000)..... 63

Figura 16 - Biossíntese de hemiceluloses e pectina a partir da conversão do UDP-D-glicose em UDP-D-glucuronato pela UGDH..... 69

Figura 17 - Imagem ampliada do gel bidimensional da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos. Spots 121, 122, 123 e 125 referentes à proteína UGDH..... 70

Figura 18 - Via de biossíntese de ligninas. Em vermelho, a metilação do Cafeil-CoA em Feruloil-CoA pela CCoAOMT, e os polímeros de lignina e seus precursores. A rota em azul corresponde ao ciclo de produção do S-adenosilmetionina, principal doador de grupos metil para a via de biossíntese de lignina..... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de processamento dos espectros MS/MS..... 41

Tabela 2 - Resultados obtidos para a proteína *UDP glucose 6-dehydrogenase*..... 47

Tabela 3 - Resultados obtidos para a proteína *Adenosylhomocysteinase*..... 47

Tabela 4 - Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos..... 49

# 1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma espécie que apresenta várias características favoráveis para a produção de madeira como facilidade de propagação vegetativa, crescimento rápido, alta produtividade, boa forma de fuste e boa resposta a tratos culturais de manejo e melhoramento genético (MORA e GARCIA, 2000; SILVA, 2005). Em resposta à alta adaptabilidade a diferentes condições de clima e solo, o plantio do eucalipto no Brasil consolidou-se e o setor florestal brasileiro exerce papel de destaque no comércio mundial.

Os programas de melhoramento genético da espécie, associados aos avanços na tecnologia industrial, possibilitaram ao país tornar-se o maior produtor de celulose de fibra curta do mundo (BRACELPA, 2007). De acordo com pesquisas recentes, o consumo médio mundial de madeira deve aumentar a uma taxa de 1,2% a 3,4% ao ano nos próximos cinco anos (PERSPECTIVAS, 2003) e, para suprir essa demanda, o setor de papel e celulose deverá aumentar sua capacidade produtiva.

Mesmo com toda a contribuição do melhoramento genético do eucalipto para a formação de florestas altamente produtivas, ainda existem características inerentes à biologia das árvores que dificultam esse processo. Assim, a biotecnologia florestal surgiu como uma alternativa para se alcançar progressos de forma rápida, manipular e estudar caracteres até então desconhecidos ou que não podiam ser manipulados através do emprego das técnicas de melhoramento convencional.

A madeira é uma fonte renovável de matéria prima utilizada de várias maneiras pelo homem como nas edificações, geração de energia, produção de papel e celulose, dentre outras. Entretanto, apesar de sua importância, o processo genético que controla a formação da madeira ainda é pouco conhecido.

A madeira é formada a partir do desenvolvimento do xilema secundário, processo denominado de xilogênese. Em cada fase do seu desenvolvimento, a expressão ordenada de várias famílias de genes é regulada por sinais ambientais e do desenvolvimento da planta, que influenciam a composição e a morfologia da parede celular do xilema, o fator mais importante na determinação das propriedades da madeira (MEGRAW, 1985).

As variações nas composições químicas, físicas e anatômicas da madeira ocorrem principalmente em função da idade, fatores genéticos e ambientais. A madeira juvenil quando comparada com a adulta, apresenta células com paredes delgadas, alta concentração de lignina e baixa densidade. Para a indústria florestal, o processamento da madeira juvenil pode acarretar características indesejáveis no produto final (BRASIL e FERREIRA, 1979); árvores que apresentam uma proporção maior de madeira adulta geram produtos com melhor qualidade.

A identificação de proteínas e genes que regulam os processos genéticos da formação da madeira juvenil e adulta é, portanto, alvo potencial para modificações específicas com o objetivo de se aumentar a qualidade da madeira. Com o objetivo de fornecer informações críticas e complementares da regulação, quantidade, atividade e interação de cada proteína na célula, a proteômica vem se tornando um campo ativo para os estudos pós-genômica (PLOMION et al., 2006).

Celedon et al. (2007) descreveu as principais proteínas expressas durante a formação da madeira juvenil de *E. grandis*, utilizando técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Partindo da hipótese de que diferentes proteínas iriam ser encontradas durante a formação da madeira adulta, principalmente devido às suas características, este trabalho teve como objetivos identificar e caracterizar as proteínas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos de idade e compreender as principais rotas envolvidas na formação da madeira adulta, principalmente aquelas envolvidas com as proteínas de síntese de parede celular.

Os resultados encontrados e as comparações entre a formação dos dois tipos de madeira irão, futuramente, fornecer informações sobre o processo de formação e qualidade da madeira de eucalipto.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 O eucalipto

O eucalipto é originário da Austrália onde cobre cerca de 90% de sua área territorial, formando densas florestas, com algumas poucas espécies originárias das ilhas de Java, Filipinas, Timor, Papua Nova Guiné e outras (PRYOR, 1976). Atualmente encontra-se amplamente distribuído em países de clima tropical e subtropical entre as latitudes de 9°N e 45°S e altitudes que variam de 30 a 1000 metros, adaptados a diversas condições de clima e solo (BROOKER, 2000).

A primeira espécie reconhecida oficialmente como pertencente ao gênero *Eucalyptus* foi a *E. obliqua* em 1788, a qual, devido às suas características foi incluída na família *Myrtaceae* (COZZO, 1955). Hoje, o gênero engloba cerca de 700 espécies, sub-espécies, variedades e híbridos naturais, os quais são encontrados desde a forma arbustiva até árvores de grande porte (CRESSWELL et al., 1975).

As espécies de *Eucalyptus* são monóicas, protândricas e preferencialmente alógamas (CARR et al., 1971). São diplóides e, em sua maioria, possuem 22 cromossomos caracterizados por um tamanho extremamente pequeno (RUGGIERI, 1961), com um conteúdo de DNA nuclear (2c) estimado entre 500 e 650 Mpb (GRATTAPAGLIA e BRADSHAW, 1994).

Na América do Sul, o Chile foi o primeiro país a introduzir o eucalipto em 1823, seguido pela Argentina e Uruguai. Por volta de 1868, ainda com finalidades ornamentais, o eucalipto foi introduzido no Rio Grande do Sul por Frederico de Albuquerque e no Rio de Janeiro por Pereira da Cunha. O reconhecimento pela introdução econômica da cultura foi creditado a Navarro de Andrade, que em 1904, a pedido da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, iniciou pesquisas comparativas entre espécies de eucaliptos e espécies florestais nativas. Os primeiros resultados, desta pesquisa pioneira, aconselharam a utilização do eucalipto na produção de lenha, dormentes, postes e moirões.

Por apresentar tantas possibilidades de uso, os plantios foram incorporados gradativamente ao cenário florestal brasileiro (ANDRADE, 1961). A partir da década de

50, o eucalipto passou a ser produzido como matéria prima para o abastecimento de fábricas de papel e celulose (TOMASELLI, 2004).

### 2.1.1 O setor florestal brasileiro e a importância do eucalipto

O setor florestal brasileiro gera cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos e apresentou, em 2005, um faturamento de US$ 27,8 bilhões (3,5% do PIB nacional), contribuindo com US$ 4,2 bilhões em impostos. As exportações brasileiras ligadas ao setor atingiram US$ 7,4 bilhões, correspondendo a aproximadamente 7% do total exportado pelo país (SBS, 2006; LEITE, 2005).

Em 2006, a produção brasileira de celulose alcançou 11,2 milhões de toneladas e a de papel 8,7 milhões de toneladas, registrando um crescimento sobre 2005 de 8% e 1,5%, respectivamente. Segundo pesquisas de institutos internacionais, apesar de já ser o maior produtor de celulose de fibra curta, o resultado da produção de celulose de 2006, levou o Brasil a passar da sétima para a sexta posição como produtor mundial de celulose total e o 11° maior fabricante de papel (BRACELPA, 2007).

O plantio do eucalipto no Brasil foi consolidado graças ao seu excelente potencial para produção de madeira e por apresentar uma série de características favoráveis, entre elas: alta adaptabilidade a diferentes condições de clima e solo; elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa; crescimento rápido, alta produtividade e boa forma de fuste; boa resposta a tratos culturais de manejo e melhoramento genético; adequação aos mais diferentes usos e aceitação de mercado (MORA e GARCIA, 2000; SILVA, 2005).

O desenvolvimento de florestas produtivas e de rápido crescimento, associado à tecnologia industrial, viabilizará a produção de papéis com padrão de qualidade internacional. De acordo com pesquisas recentes, o consumo médio mundial de madeira deve aumentar a uma taxa de 1,2% a 3,4% ao ano nos próximos cinco anos (PERSPECTIVAS, 2003) e, para suprir essa demanda, o setor de papel e celulose apresentou ao governo um programa nacional de investimentos da ordem de US$ 14,4 bilhões para o período de 2003 a 2012, destinados à expansão da capacidade produtiva e ao aumento da competitividade das indústrias brasileiras no cenário mundial (BRACELPA, 2006).

A expectativa para 2007 é de que a produção brasileira atinja 11,8 milhões de toneladas de celulose e 9 milhões de toneladas de papel, o que representará um crescimento de cerca de 5,5% e 2,8%, respectivamente, em relação à produção registrada em 2006 (BRACELPA, 2007).

### 2.1.2 Melhoramento genético do eucalipto

A grande variedade de espécies de eucalipto introduzidas no Brasil no início do século XX transformou o Horto Florestal de Rio Claro, Estado de São Paulo, no mais completo banco de germoplasma de eucalipto no Brasil (Andrade, 1961) e, rapidamente essas áreas se tornaram pólos de fornecimento de sementes para programas de formação de florestas por incentivo do governo federal brasileiro.

Os programas de melhoramento genético do eucalipto tiveram como objetivo inicial a avaliação da adaptabilidade das inúmeras espécies em regiões específicas, que foi realizado através de ensaios de progênies e verificação da resposta destas às diferentes condições ambientais (KAGEYAMA, 1980).

Com espécies mais adaptadas, o melhoramento florestal passou a buscar o aumento da produtividade volumétrica da madeira a cada ciclo de seleção, sem com isso, comprometer a base genética da população (MENK, 1989). As grandes empresas nacionais utilizaram-se da seleção massal, seguida da obtenção de clones das árvores superiores e da seleção de famílias de meios-irmãos, para a obtenção de populações melhoradas (PEREIRA et al., 1994). Com o sucesso desses esforços, hoje a produtividade dos plantios comerciais de eucalipto no Brasil passou de 12 $m^3$/ha.ano para uma média de 39 $m^3$/ha.ano (BRACELPA, 2007).

Uma das técnicas que contribuiram para a obtenção de ganhos genéticos foi a de hibridação. Embora a obtenção de híbridos já ocorresse desde a década de 70, ela era restrita ao uso da polinização aberta entre espécies compatíveis, que deveriam florescer ao mesmo tempo. Dessa forma, um método de cruzamento controlado que explorava a protandria do eucalipto foi desenvolvido nos anos 80 e levou a uma expansão de híbridos produzidos artificialmente no Brasil (ASSIS, 1985; BRIGATTI et al., 1983; MARTINS e IKEMORI, 1987). Um exemplo importante é o da hibridação entre

*Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*, que resultou em um híbrido interespecífico resistente ao cancro e com elevada produção volumétrica (FERREIRA, 1983).

Na década de 80, a técnica de clonagem possibilitou a produção de mudas de materiais genéticos superiores, resultantes dos programas de melhoramento e de plantios comerciais já estabelecidos (REZENDE, 2006). Além do aumento na produtividade, a clonagem possibilitou a produção de matéria-prima mais uniforme, o que gerou grandes benefícios para as indústrias.

Mesmo com toda a contribuição do melhoramento genético do eucalipto para a formação de florestas altamente produtivas, ainda existem características inerentes à biologia das árvores que dificultam esse processo. Entre elas estão: longo ciclo de vida, porte, maturação tardia, polinização cruzada, alta complexidade da análise dos descendentes após cruzamentos e retrocruzamentos, dificuldade de obtenção de ganhos significativos para caracteres complexos e necessidade de grandes áreas para plantios experimentais (VALVERDE, et al., 2007; CAMPBELL et al., 2003). Assim, a biotecnologia florestal surgiu como uma alternativa para se alcançar progressos de forma rápida, manipular e estudar caracteres até então desconhecidos ou que não podiam ser manipulados através do emprego das técnicas de melhoramento convencional.

### 2.1.3 Biotecnologia florestal

A biotecnologia de árvores recebe uma menor atenção quando comparada às grandes culturas agrícolas, mesmo sabendo-se que o impacto de sua utilização seria potencialmente maior na área florestal (MERKLE; NAIRN, 2005). A maioria dos trabalhos sobre aplicação de técnicas de biotecnologia nas angiospermas está concentrada no gênero *Populus*, que de maneira equivalente ao *Eucalyptus* no Brasil, assume importância econômica fundamental na indústria de base florestal de vários países europeus, caracterizados por serem altamente desenvolvidos e possuírem sólida estrutura de pesquisa (Meireles, 2006). Dessa forma, *Populus* foi o primeiro gênero florestal a ser regenerado *in vitro* já no final dos anos 60, o primeiro a ser geneticamente transformado (FILLATTI et al., 1987) e o primeiro a ter uma espécie com

o genoma totalmente seqüenciado (BRUNNER et al., 2004; revisado por MEIRELES, 2006).

As contribuições da biotecnologia ao gênero *Eucalyptus* são igualmente importantes, e trouxeram grande auxílio ao melhoramento convencional. Em 2002, González e colaboradores conseguiram obter plantas transgênicas de eucalipto através de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, possibilitando assim, a introdução ou modificação de genes de interesse.

No Brasil já existem dois projetos de sequenciamento de ESTs (*expressed sequence tags*) de eucalipto, o GENOLYPTUS e o FORESTS, ambos de iniciativa de empresas do setor e órgãos nacionais e estaduais de fomento à pesquisa (MCT e FAPESP), com a participação de universidades, mas que não tem os dados disponibilizados publicamente.

## 2.2 Madeira

Em espécies perenes, a adição sucessiva de xilema secundário, diferenciado a partir do câmbio vascular, origina um tecido único chamado de madeira (MIJNSBRUGGE et al., 2000).

A madeira é uma fonte renovável de matéria prima utilizada de várias maneiras pelo homem como nas edificações, geração de energia, produção de papel e celulose dentre outras (Celedon et al., 2007). Atualmente, além de sua importância econômica, a madeira é apontada como principal agente fixador de carbono, contribuindo para a redução dos excessos de $CO_2$ atmosférico e conseqüentemente o aquecimento global.

### 2.2.1 Câmbio vascular

O câmbio vascular é um meristema secundário, que se diferencia juntamente com o tecido vascular primário, a partir do procâmbio, e é responsável pelo crescimento em diâmetro das gimnospermas e muitas angiospermas dicotiledôneas (LARSON, 1994). Esse crescimento secundário é especialmente importante para o desenvolvimento das árvores, assegurando suas vidas perenes a partir da renovação do xilema e floema funcionais (PAUX et al., 2004).

O termo câmbio não é um consenso entre os pesquisadores da área. Alguns se referem ao câmbio como a camada unisseriada de células iniciais e usam o termo região cambial para a faixa que compreende, além da camada de células iniciais, as camadas subseqüentes das suas células derivadas.

O câmbio vascular (Figura 1) contém dois tipos de células meristemáticas: células iniciais fusiformes e células iniciais radiais. As células inicias fusiformes são alongadas, altamente vacuoladas, divididas longitudinalmente para se auto regenerarem e cujas células derivadas se diferenciam em células condutoras do xilema e floema secundário. Já as células iniciais radiais são pequenas e suas células derivadas incluem as fileiras radialmente orientadas de células do parênquima no interior da madeira, também designados como raios parenquimáticos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

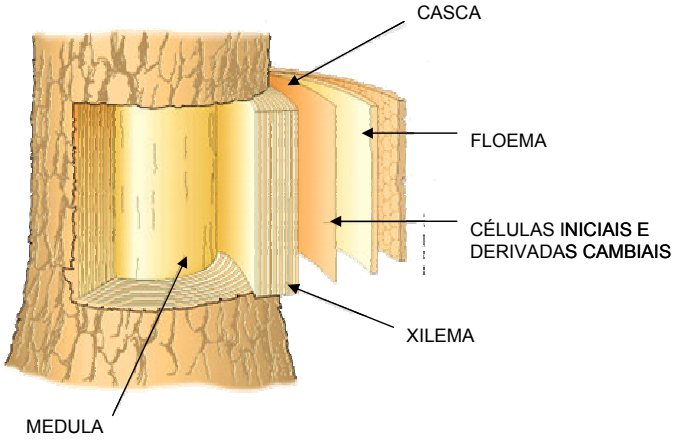


Figura 1 - Câmbio Vascular formado pelas células iniciais e derivadas

### 2.2.2 Xilema

O xilema é um tecido responsável pelo transporte de água e solutos à longa distância, armazenamento de nutrientes e suporte mecânico (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2006). Ele pode ser classificado como primário, quando se origina do procâmbio, e secundário, quando se origina do câmbio vascular.

Os xilemas primário e secundário são constituídos por elementos condutores, células parenquimáticas, fibras e alguns outros tipos celulares (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2006) (Figura 2). Segundo os autores, os elementos condutores podem

ser traqueídes ou elementos de vasos. As traqueídes são células que não possuem perfurações, típicas de gimnospermas e algumas angiospermas primitivas. Elas se posicionam em fileiras longitudinais, justapondo-se às extremidades não perfuradas. Já os elementos de vaso são característicos das angiospermas e das ordens mais evoluídas de gimnospermas. Estes também ocorrem em fileiras longitudinais e se comunicam através das placas de perfuração, constituindo os vasos.

As células parenquimáticas podem estar presentes no parênquima axial ou radial e são responsáveis pelo armazenamento e translocação de água e solutos à curta distância. As fibras são células de sustentação, responsáveis pela rigidez ou flexibilidade da madeira. Estas possuem forma alongada e extremidades afiladas, com maior dimensão no sentido do eixo longitudinal do tronco da árvore. As paredes das fibras variam em espessura, mas geralmente são mais espessas que as paredes das demais células do xilema secundário.

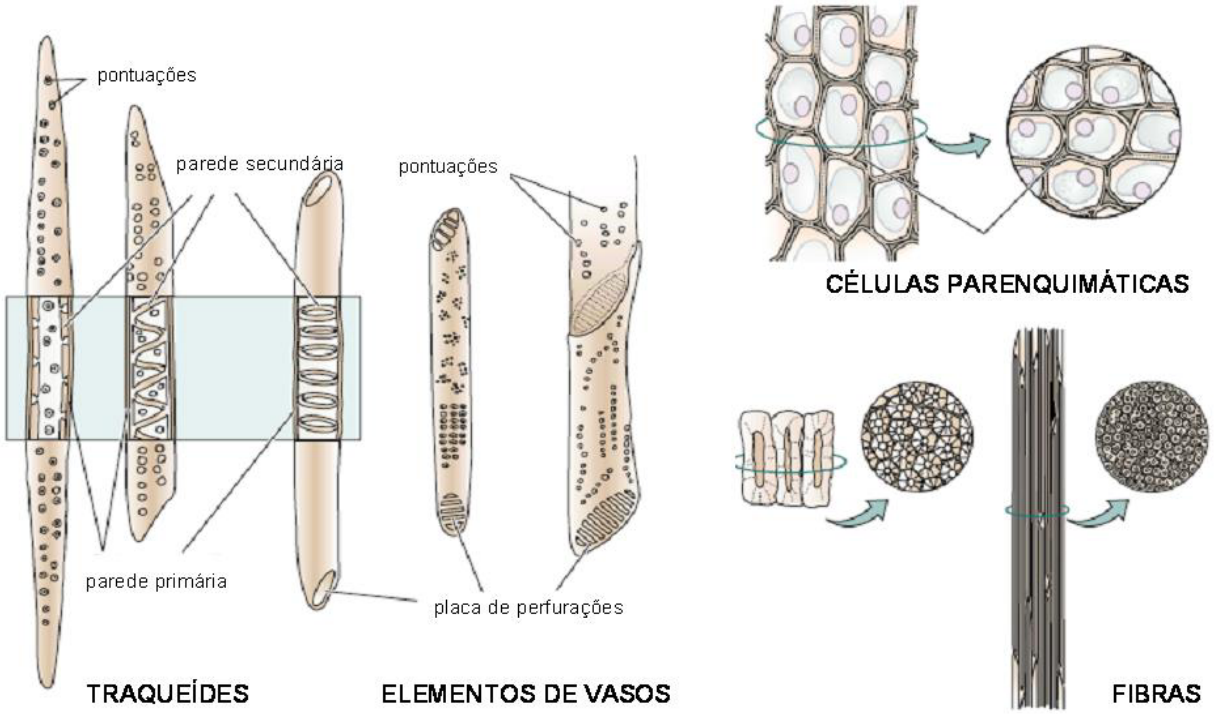


Figura 2 - Tipos de células presentes no xilema primário e secundário (TAIZ & ZEIGER, 2004)

### 2.2.3 Xilogênese

O desenvolvimento do xilema secundário, formação da madeira, é denominado de xilogênese. O desenvolvimento do xilema secundário ocorre através de cinco eventos seqüenciais: divisão celular, elongação, biossíntese da parede celular, lignificação e morte celular programada (CHAFFEY, 2002). Em cada fase, a expressão ordenada das famílias de genes é regulada por sinais ambientais e do desenvolvimento da planta, que influenciam a composição e a morfologia da parede celular das células do xilema, sendo assim, o fator mais importante na determinação das propriedades da madeira (MEGRAW, 1985).

Quando as células iniciais do câmbio vascular se dividem, periclinalmente para dentro, uma célula permanece no estado meristemático enquanto a outra, mais interna, se torna a célula mãe do xilema. A célula mãe do xilema pode, por sua vez, sofrer ainda um limitado número de divisões celulares ou, sem mais divisões, se diferenciar em células do xilema secundário (LARSON, 1994).

Uma vez formada, a nova célula do xilema passará por um processo de diferenciação, determinado pelos quatro eventos restantes: expansão celular, espessamento da parede celular (envolvendo a deposição de celulose e hemiceluloses), lignificação e morte celular programada (PLOMION et al., 2001).

Após a divisão, as células que ainda são compostas apenas de parede celular primária, se expandem, formando uma zona onde os elementos de vasos e as fibras já apresentam características morfológicas diferentes. Durante a expansão, cada tipo celular difere em comprimento, polaridade e tipo de extensão. As fibras e células do parênquima se expandem primeiramente na direção radial, com suas paredes expandindo-se uniaxialmente; enquanto os vasos, em adição à expansão radial, podem sofrer um crescimento tangencial (CALDAS, 2007). O padrão básico do arranjo entre os diferentes tipos celulares do xilema é bastante conservado, apesar de seus diferentes padrões de expansão (CATESSON, 1989).

O espessamento orientado da parede secundária é regulado através da deposição controlada de microfibrilas de celulose (FLADUNG et al., 1991). Enquanto a orientação das microfibrilas na parede primária é aleatória ou longitudinal (FUNADA, 2000), na parede secundária consiste de três camadas S1, S2 e S3, e é marcada pela

formação de um denso arranjo helicoidal, quase transversal (ABE et al., 1997) (Figura 3).

A lignificação das células começa pelos vasos, onde deposita-se primeiramente na lamela média, particularmente nos cantos das células, quando estas completam a deposição da camada S1 (TERASHIMA et al., 1993). A camada S2 é lignificada durante sua formação, juntamente com a deposição de celulose e hemiceluloses, processo que se intensifica com a formação da camada S3 (MLLEROWICZ et al., 2001). Quando a lignificação é finalizada, os elementos de vasos e fibras sofrem morte celular programada (PCD), a qual envolve morte do protoplasto. Esse processo leva as células ao final da diferenciação, tornando-as prontas para assumirem suas funções.

A madeira, portanto, é um produto do câmbio vascular e é composta de um conjunto de células do xilema secundário que são acumuladas ao longo do desenvolvimento das espécies lenhosas (LARSON, 1994).

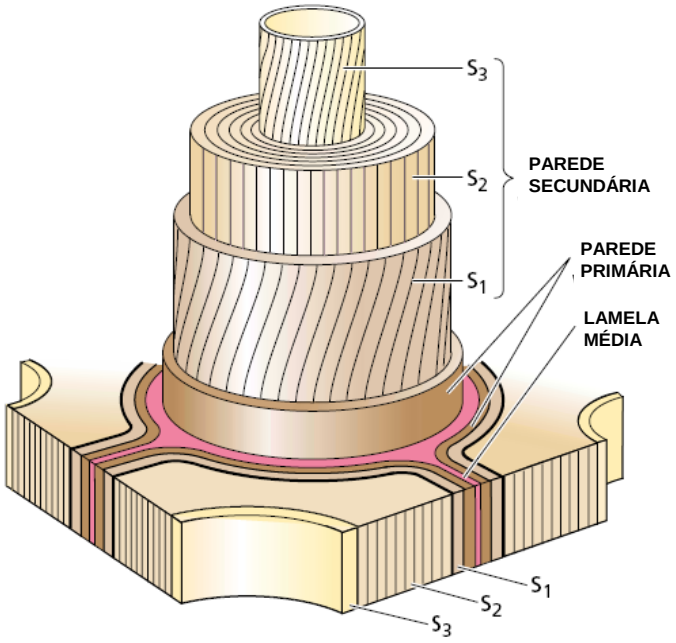


Figura 3 - Padrão de deposição das microfibrilas de celulose na parede primária e nas camadas S1, S2 e S3 da parede secundária (TAIZ & ZEIGER, 2004)

### 2.2.4 Qualidade da madeira

De acordo com Shimoyama (1990), qualidade se refere à adequação da madeira para um determinado uso ou à sua capacidade de preencher os requisitos à fabricação de um dado produto. Conhecendo-se a qualidade da matéria prima e o processo a ser utilizado é possível obter-se a otimização entre ambos e obter um produto final de alta qualidade.

A madeira é um material heterogêneo que possui diferentes tipos de células, adaptadas a desempenharem funções específicas. As variações nas composições químicas, físicas e anatômicas da madeira são grandes entre espécies, ocorrendo variações também dentro de uma mesma espécie, principalmente em função da idade, fatores genéticos e ambientais. Há também diferenças entre o cerne e alburno, madeira de início e fim de estação de crescimento e, em escala microscópica, entre células individuais (BROWNING, 1963).

A madeira varia de árvore para árvore, bem como dentro de troncos individuais. Segundo Mallan (1995), a variação no sentido radial é a fonte de variação mais importante, sendo que a sua extensão é determinada pela proporção de madeira juvenil e suas características físico-químicas e anatômicas ao longo do tronco.

### 2.2.5 Madeira juvenil e madeira adulta

As árvores apresentam diferentes taxas de crescimento, assim como diferentes características celulares, durante seu desenvolvimento. Em plantas que apresentam crescimento secundário, essas características podem ser melhor observadas e a madeira produzida, classificada em juvenil e adulta.

As variações que ocorrem durante o período juvenil estão relacionadas principalmente às dimensões celulares, à organização da parede celular e às características físico-químicas da madeira. Entretanto, a variação de gradiente dentro da zona juvenil diminui com o passar do tempo.

Para a indústria florestal, o processamento da madeira juvenil, pode produzir características indesejáveis no produto final (BRASIL e FERREIRA, 1979); árvores que apresentem uma proporção maior de madeira adulta geram produtos com maior qualidade. As toras de eucalipto que são encaminhadas para a produção de papel e

celulose, entretanto, são cortadas quando estão com sete anos de idade, ou seja, constituídas ainda, por grande parte de madeira juvenil.

A madeira juvenil localiza-se na região central da árvore e apresenta a forma de um cilindro, com diâmetro quase uniforme, desde a base até o topo (EVANS et al., 2000) (Figura 4). De maneira geral, apresenta uma elevação dos valores de densidade, comprimento da fibra, espessura da parede etc, da fase juvenil até atingirem a maturidade, onde os valores permanecem mais ou menos constantes. Na fase juvenil a taxa de incorporação de biomassa é crescente e tende a se estabilizar, até que a árvore atinja a idade adulta (TRUGILHO et al., 1996). Em relação à madeira adulta, a madeira juvenil apresenta ainda uma maior quantidade de xilanas e ligninas, menor conteúdo de celulose e glucomananas, menor comprimento de fibras e vasos, menor diâmetro celular, paredes celulares mais finas, menor densidade básica, maiores ângulos microfibrilares, maiores proporções de fibras e menores proporções de vasos (TRUGUILHO et al., 1996).

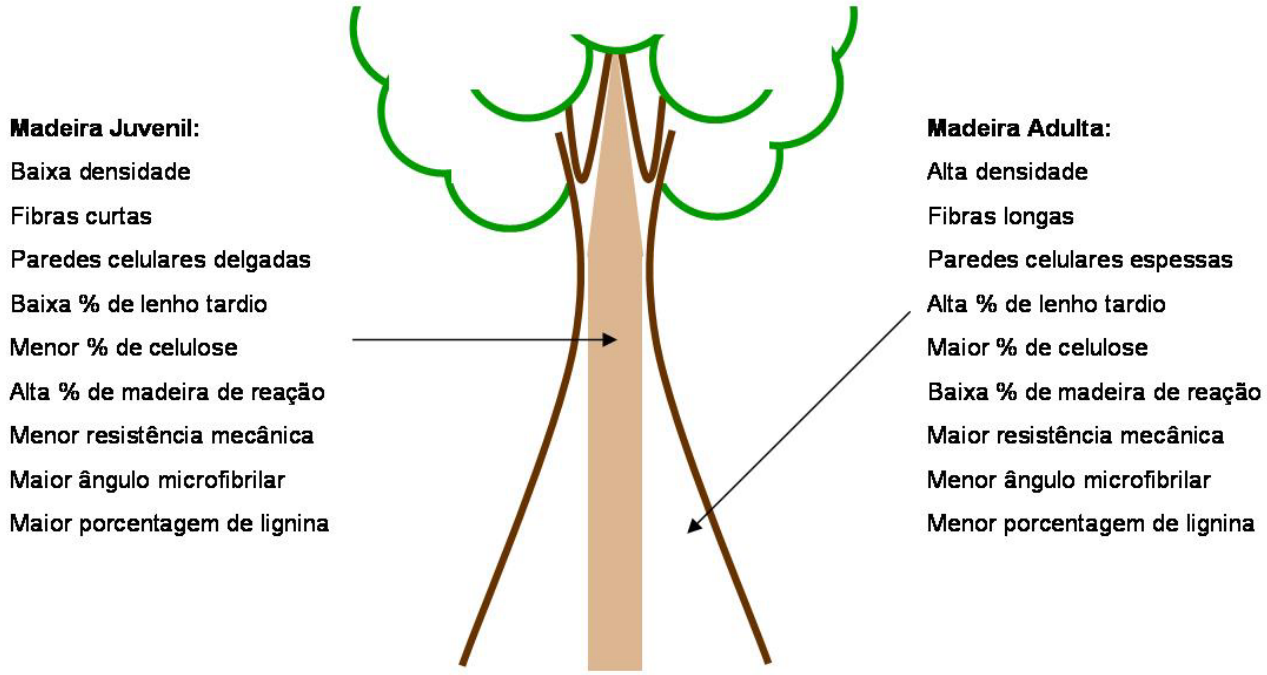


Figura 4 – Localização e principais características da madeira adulta e juvenil

Oliveira e colaboradores (2005), avaliando teores de umidade e de densidade básica na madeira de sete espécies de eucalipto com idades entre 22 e 26 anos concluíram que, existe uma queda no gradiente de umidade no sentido medula-casca, com exceção do *E. grandis* que mostrou uma distribuição heterogênea. Quanto a densidade básica, os autores concluíram que houve um aumento dessa propriedade na direção medula-casca, com perfis de variação distintos para cada espécie. No caso do *E. grandis*, a madeira de densidade menos variável foi verificada somente a partir de 25 cm de diâmetro do tronco.

O período de juvenilidade do eucalipto é variável entre as espécies, podendo ser superior a 10 anos em algumas espécies plantadas na Austrália (OLIVEIRA et al., 2005). PLUMPTRE (1983), estudando *Pinus caribaea*, verificou que a formação da madeira juvenil e a transição dessa para madeira adulta variam de acordo com a constituição genética da árvore, com o clima e com as atividades silviculturais.

A produção de polpa a partir do lenho juvenil é menor quando comparada a do lenho adulto, tanto com base em massa seca quanto com base em massa úmida. O papel fabricado de polpa de lenho juvenil tem maior resistência à tração, ao estouro, à dobra, apresenta folha mais lisa e possui maior densidade aparente (ZOBEL e VAN BUIJTENEN, 1989). A madeira adulta, mais homogênea quanto a sua densidade no interior do tronco, comporta-se melhor nas operações de processamento e reflete maior uniformidade nas demais propriedades tecnológicas. As árvores em idade de corte contêm altas proporções de madeira juvenil e, portanto, um menor valor econômico (CALDAS, 2007).

## 2.3 Proteômica

Esta técnica é baseada no conceito de que o proteoma corresponde ao conjunto completo de proteínas produzidas por uma célula ou organismo, sob uma condição particular (WILKINS et al., 1995). Com o objetivo de fornecer informações complementares ao mecanismo de regulação, quantidade, atividade e interação de cada proteína no interior da célula, esta técnica tornou-se uma ferramenta extremamente útil para os estudos de pós-genômica e vem crescendo a cada ano (PLOMION et al., 2006).

As proteínas exercem papel fundamental nas funções biológicas. Portanto, seu entendimento trará uma perspectiva global de como essas moléculas interagem e cooperam para criar e manter um sistema biológico ativo. As proteínas são os agentes responsáveis pelos fenótipos definitivos das células. Conseqüentemente, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo, apenas pelo estudo dos genes (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

A grande maioria dos estudos de proteômica de plantas têm se concentrado no perfil do proteoma de vários órgãos, tecidos, células e organelas das principais culturas cultivadas. Entre os gêneros florestais, *Populus* e *Pinus* têm sido extensivamente pesquisados. Plomion e colaboradores (2006) catalogaram o proteoma de vários tecidos e órgãos de *Populus*, relacionando este a diversas proteínas de resposta ao estresse hídrico.

O estudo da xilôgenese entre as espécies arbóreas tem se concentrado em modelos de formação de parede celular, principalmente através da comparação de tecidos sob diferentes idades e diferentes condições fisiológicas. A comparação entre madeira juvenil e adulta já foi realizada em *Populus* (MIJNSBRUGGE et al., 2000; PLOMION et al., 2006) e em *Pinus* (GION et al., 2005). Neste último, ainda analisou-se as proteínas expressas no xilema, sob indução de madeira de tensão e durante diferentes estações do ano. Juan et al. (2006) propôs uma nova abordagem para o estudo de formação de madeira e analisou o proteoma do tecido vascular secundário a partir de um sistema de regeneração.

As pesquisas com eucalipto ainda são recentes, Celedon et al. (2007) descreveram as principais proteínas expressas durante a formação da madeira juvenil de *Eucalyptus grandis* em três diferentes idades.

### 2.3.1 Análise proteômica da região cambial de árvores juvenis de *E. grandis*

Com o objetivo de descrever as principais proteínas expressas durante o processo de formação da madeira juvenil em *E. grandis*, além de identificar proteínas diferencialmente expressas, Celedon et al. (2007) analisaram o proteoma da região cambial de eucalipto em três idades diferentes até a idade de corte. A proteína total foi extraída de plântulas com seis meses e árvores juvenis com três e seis anos.

Utilizando-se a metodologia de eletroforese bidimensional e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, 240 proteínas foram identificadas.

Muitas das proteínas identificadas estão relacionadas com os processos de formação da madeira. Proteínas envolvidas na formação do citoesqueleto representaram 20% das identificações. Nesse caso, as α e β tubulinas e várias actinas, assim como a proteína actina-associada *profilin*, foram identificadas. Uma proteína CDC48, relacionada à regulação do ciclo celular, foi descrita e a UDP-glicose pirofosforilase, envolvida na biossíntese de hemiceluloses e pectinas, foi identificada em múltiplos *spots* nas três idades.

A assimilação de carbono e nitrogênio está interconectada a uma série de enzimas e metabólitos para a produção dos componentes básicos da parede celular (celulose, hemiceluloses, pectinas e ligninas) durante a formação da madeira. A glutamina sintase foi a única proteína envolvida com o metabolismo de nitrogênio que foi identificada, e está correlacionada a reciclagem da amônia produzida durante o início da lignificação. A *S*-adenosilmetionia sintase (SAMS), envolvida no metabolismo de aminoácidos, foi encontrada em 3 *spots* e com diferentes níveis de expressão entre as idades. A atividade da SAMS tem sido correlacionada as proteínas envolvidas na lignificação, dentre elas a acido caféico 3-*O*-metiltransferase (COMT) e a cafeil-CoA *O*-metiltransferase (CCoAOMT), também identificadas.

Neste trabalho, também foi identificada a ascorbato peroxidase, enzima envolvida em processos de desintoxicação por espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo celular de ROS está relacionado à morte celular programada, último processo da xilogênese.

A otimização do método de identificação de proteínas da região cambial de árvores juvenis, assim como a correlação com os processos envolvidos na formação da madeira, pode ser alcançada através de repetições dos géis bidimensionas e análise dos *spots* por espectrometria de massas e pela utilização de técnicas complementares. Esforços nesse sentido estão sendo realizados pelo grupo de trabalho do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, assim como uma futura comparação dos géis e proteínas de árvores juvenis e adultas.

### 2.3.2 Espectrometria de Massas

A análise de proteínas requer métodos para separar, de forma criteriosa, amostras de proteínas em seus componentes individuais. Esses métodos, de maneira geral, podem ser classificados como seletivos e não seletivos. Os métodos seletivos têm por objetivo isolar proteínas individuais a partir de propriedades específicas, como ligações ou funções bioquímicas, são utilizados principalmente no estudo de modificações pós-traducionais e são a base da tecnologia utilizada nos estudos de arranjos de proteínas.

Os não seletivos têm como base o fracionamento de amostras complexas de proteínas em subfrações para análises futuras. Esses métodos são normalmente utilizados em projetos de proteômica que visam estudar propriedades gerais como o peso molecular, ponto isoelétrico ou carga de determinadas proteínas.

Na proteômica, a tecnologia de separação de proteínas é explorada aos seus limites (TWYMAN, 2004). A grande quantidade e diversidade química tornam difícil a escolha de um método de separação que represente igualmente todas as proteínas de uma amostra. Além de ser representativa, a técnica de separação deve ser de fácil automação e principalmente ser compatível com as análises de espectrometria de massas.

As principais técnicas utilizadas nos trabalhos de proteoma são a eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida multidimensional, também conhecida por *shot gun*.

#### 2.3.2.1 Gel bidimensional

Os protocolos que utilizam focalização isoelétrica e eletroforese seqüencial foram desenvolvidos em meados dos anos 70. O´Farrell (1975) foi o primeiro a utilizá-los em protêomica quando separou proteínas de *E. coli* e obteve um perfil de 1000 frações protéicas. Hoje, os principais sistemas de eletroforese bidimensional utilizam, em uma primeira dimensão, fitas IPG para focalização isoelétrica e em segunda dimensão, são capazes de resolver aproximadamente 2500 *spots* em um mesmo gel (TWYMAN, 2004). Entretanto, o proteoma de organismos eucariotos tem ordens de grandezas muito superiores a essas.

A técnica é extensivamente utilizada, mas tem como principais fatores limitantes problemas com resolução, sensibilidade, reprodutibilidade e automação. Outra limitação é a dificuldade de se focalizar proteínas com alto peso molecular, hidrofóbicas e extremamente básicas ou ácidas (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

Apesar de muitos autores relatarem dificuldades, principalmente, com a solubilização das proteínas, muitas alternativas de otimizações de protocolos já foram propostas para cada tipo de material biológico (KHOUDOLI et al., 2004). Assim, fatores limitantes vêm sendo superados pelo uso de maior número de repetições de géis (RUBINFELD et al., 2003), novos *softwares* e cuidadosas análises de imagem de géis (ROGERS et al.2003), seleção de faixas de pH estreitas que aumentam a resolução da amostra (GÖRG et al., 1999), enriquecimento de frações de proteínas baseado em características químicas (CORTHALS et al., 2000) e aplicação de protocolos específicos para recuperação de proteínas de baixa solubilidade (MÉCHIN et al., 2003).

Apesar de muitas técnicas complementares já estarem sendo utilizadas, a eletroforese bidimensional continua sendo uma opção para o estudo da expressão de proteínas e posterior identificação por espectrometria de massas. Os géis bidimensionais são vantajosos uma vez que proporcionam uma visão global do proteoma de um determinado experimento.

#### 2.3.2.2 Espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas é um instrumento que mede a razão massa/carga de íons submetidos ao vácuo. A partir dos dados gerados por seus espectros, a massa molecular dos peptídeos e resíduos de aminoácidos pode ser determinada com precisão, assim como a composição molecular de uma amostra.

As análises podem ser realizadas a partir de íons de peptídeos intactos (MS) e de íons de peptídeos fragmentados (MS/MS). Nas análises MS, também conhecidas por *fingerprint*, os valores de m/z dos peptídeos são correlacionados a proteínas de um banco de dados específico. Já as análises de MS/MS são utilizadas para obtenção das seqüências de aminoácidos, a partir da determinação das massas de seus resíduos, e da correlação dessas, com os bancos de dados disponíveis. Trata-se, portanto, do

sequenciamento de proteínas e muitas vezes da obtenção de moléculas até então desconhecidas.

O equipamento contém três componentes principais: uma fonte de ionização, analisadores de massas e um detector (Figura 5). A grande variedade de espectrômetros de massas disponíveis no mercado são, na verdade, combinações de diferentes tipos de fontes de ionização e analisadores de massas, que conferem a estes, determinados níveis de sensibilidade e exatidão nos resultados.

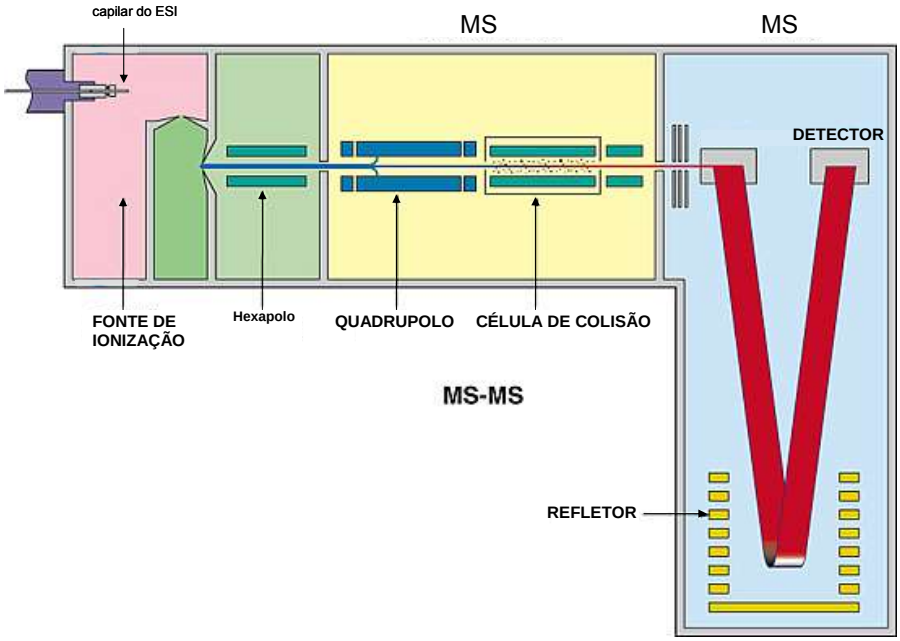


Figura 5 - Modelo do princípio de análise de um espectrômetro de massas Q-TOF com operação em modo MS/MS

A função da fonte de ionização é converter a solução contendo os peptídeos em íons na fase gasosa (TWYMAN, 2004). As duas formas de ionização mais tradicionalmente utilizadas são a eletronebulização (ESI) e a dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI).

A eletronebulização foi desenvolvida por FENN et al. (1989) e trata-se de um pequeno capilar que produz, no vácuo, uma gotícula carregada com a solução de peptídeos. Por fazer uso de uma solução líquida, essa fonte de ionização pode ser acoplada a colunas de cromatografia líquida.

A ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (KARAS e HILLENKAMP, 1988) tem como princípio a vaporização de uma matriz, composta pelos peptídeos a serem analisados, pela ação de um laser. Em ambos os casos, após a evaporação do solvente, as partículas seguem, no vácuo, até os analisadores de massas.

Os principais analisadores de massas são o quadrupolo (Q) e o tempo de vôo (*time of flight*, TOF). Equipamentos com mais de um analisador ou híbridos, com tipos de analisadores diferentes, são muito comuns.

O analisador quadrupolo (PAUL e STEINWEDEL, 1953) é composto por quatro bastões metálicos paralelos, carregados por cargas opostas e corrente alternada. Pela ação de diferentes potenciais elétricos, os íons são separados por suas cargas. Esse tipo de analisador tem baixa resolução e, na maioria das vezes, é utilizado apenas como um filtro de massas para outros analisadores.

Os analisadores por tempo de vôo (WILEY e MACLAREN, 1955) têm como princípio, a separação dos íons pelo tempo que levam para percorrer determinado espaço no vácuo. Íons com menor relação m/z alcançam maior velocidade e conseqüentemente são os primeiros a serem detectados. Os TOFs apresentam alta resolução e conferem a seus espectrômetros de massas uma maior sensibilidade na detecção.

#### 2.3.2.3 Bioinformática

As análises dos espectros gerados pelos espectrômetros de massas são processadas automaticamente com o auxílio de *softwares* específicos (RUSSELL et al., 2004). As análises manuais são muito trabalhosas, principalmente pela quantidade de espectros gerados, e são realizadas apenas em casos específicos.

Para identificação das proteínas, existem inúmeros programas que fazem uso de diferentes tipos de algoritmos, muitos deles desenvolvidos para condições de análises específicas. SEQUEST (YATES et al., 1995) e MASCOT (PERKINS et al., 1999) são dois dos programas mais citados em publicações na área. Cada tipo de algoritmo difere entre si principalmente pela taxa de falsos positivos, ou seja, pela taxa de identificação errônea de proteínas.

Durante as buscas, os programas interpretam os espectros gerados pelos peptídeos ou pela fragmentação destes e, a partir de digestões teóricas de proteínas ou fragmentação teórica de peptídeos depositados nos bancos de dados, comparam os valores obtidos. As comparações entre as informações teóricas e experimentais geram listas de proteínas com diferentes graus de similaridade e estas, são ordenadas de acordo com a probabilidade estatística determinada pelo algorítmo e pelos parâmetros definidos pelo usuário (CHAMRAD et al., 2003).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Material vegetal e amostragem

Foram amostrados 30 indivíduos de *Eucalyptus grandis* com 22 anos, pertencentes a uma população de matrizes. O material vegetal proveniente da Fazenda Estrela, município de Itapetininga, Estado de São Paulo, Brasil, (23°35'20''S e 48°03'11"O), na altitude de 656 m, foi fornecido pela empresa Suzano Papel e Celulose.

Para coleta do material vegetal, uma área retangular da casca foi retirada do caule das árvores, a 1,60 m de altura do solo (Figura 6). A técnica, baseada em Goffner et al. (1992) e Celedon et al. (2007), não é destrutiva. Para garantir que todo material meristemático fosse representado na amostragem, a raspagem do tecido exposto foi realizada no tronco e na casca, uma vez que Foucart et al. (2006) quando fizeram uso desse procedimento, observaram que grande parte dessas células permanecem aderidas à casca.

Após serem removidas, as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas, no laboratório, com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. O material foi armazenado em freezer (-80°C).

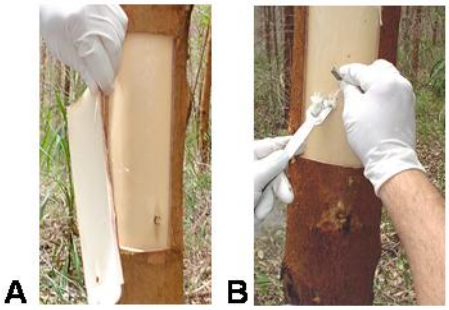


Figura 6 - Amostragem do material vegetal de árvores de eucalipto. (A) Remoção da casca; (B) Raspagem do tecido da região cambial

## 3.2 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações propostas por Saravanan e Rose (2004) (ANEXO A).

Aproximadamente 2 g do material vegetal armazenado a (-80°C) foram homogeneizados em 20 mL de tampão de extração (ANEXO B), e mantidos sob

agitação, por 30 min a 4°C. Em seguida, adicionou-se um volume igual de fenol saturado em Tris HCl pH 8,5 aos tubos contendo a amostra. Esses foram deixados novamente sob agitação por 30 min a 4°C. Após centrifugação (10.000 *g*) por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Com a finalidade de eliminar-se a maior parte das impurezas da amostra, duas lavagens adicionais com tampão de extração foram realizadas, sendo que em cada lavagem, o volume foi completado com fenol para garantir um maior rendimento da extração.

As proteínas foram precipitadas pela adição de 5 volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol ao sobrenadante recuperado. Após 12 h a -20°C, procedeu-se uma centrifugação (10.000 *g*) por 30 min a 4°C. O precipitado foi submetido a duas lavagens com 0,1 M de acetato de amônio, uma lavagem com metanol (100%) e uma com acetona (100%), sendo que, entre cada lavagem, as amostras foram mantidas por 1 h a -20°C, antes de serem centrifugadas (10.000 *g*), por 30 min a 4°C. O precipitado resultante foi submetido à secagem em dissecador a 4°C.

### 3.2.1 Solubilização de proteínas

O precipitado de proteínas, resultante da extração de 2 g do material vegetal, foi solubilizado em 1 mL do tampão de solubilização (ANEXO C), ao qual adicionou-se 15 mM de iodoacetamida, para realização da alquilação das proteínas. Após um período (1 h) de manutenção das amostras no escuro a 4°C, adicionou-se 2 M tiouréia às mesmas.

### 3.2.2 Quantificação das proteínas

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o *Kit Biorad Protein Assay* (BioRad), de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), em triplicata.

Para cada reação utilizou-se 2,5 µL do extrato de proteínas, 2,5 µL de HCl (0,1 N), 1,5 mL de reagente corante (ANEXO D). Após homogeneização, cada reação foi transferida para cubetas de vidro, seguida de leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

O valor obtido foi interpolado em uma curva de calibração, previamente estabelecida, utilizando-se da mesma metodologia para concentrações conhecidas da proteína padrão BSA (albumina do soro bovino).

### 3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamidada

Após quantificação, o extrato protéico resultante foi submetido à verificação da qualidade das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970).

Em 5 µL de tampão de desnaturação (ANEXO E), um volume igual do extrato foi adicionado. Após 1 min a 95°C, a amostra e um marcador de peso molecular para proteínas (Bio Rad) foram aplicados ao gel de poliacrilamida: 10 cm x 8,5 cm (Mini-PROTEAN II Cell, Bio Rad). Para realização da eletroforese, o gel foi preparado com duas concentrações diferentes de poliacrilamida. Para os primeiros 2 cm, junto às canaletas de aplicação, utilizou-se a concentração de 4% (p/v) e as amostras foram submetidas a uma corrente de 50 V. Na parte inferior do gel, chamada de gel de corrida, utilizou-se a concentração de 12,5% (p/v) de acrilamida e as amostras foram submetidas a uma corrente de 80 V até atingirem o limite inferior do minigel.

Para a corrida foram utilizados tampões Laemmli inferior e superior (ANEXO F).

### 3.2.4 Coloração do mini-gel

O minigel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) de acordo com Neuhoff et al. (1985), com algumas alterações propostas por Hesse e Jahn (2004).

Após 1 hora em solução fixadora (ANEXO G), o gel foi lavado duas vezes com água Milli-Q por 10 minutos antes de ser transferido para a solução de coloração (ANEXO H) por, no mínimo, 48 horas. Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante (≈ 40 rpm).

O excesso de corante foi removido com água Milli-Q e os géis conservados em 15 % (p/v) de sulfato de amônio a 4ºC.

## 3.3 Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1979) consiste de duas etapas: em uma primeira dimensão, as proteínas são separadas pelo ponto isoelétrico e na segunda dimensão, são separadas pelo peso molecular.

### 3.3.1 Focalização isoelétrica (primeira dimensão)

A focalização isoelétrica foi conduzida em sistema Ettan IPGPhor (Amersham Biosciences), a 20°C, utilizando-se fitas IEF de pH 3-10 não linear e pH 4-7 (IPG strips, Amersham Biosciences).

As fitas de pH 3-10 foram utilizadas para uma caracterização geral da amostra. Cerca de 900 µg de proteínas foram solubilizadas em tampão de focalização (ANEXO I). Já para as amostras focalizadas em fitas com pH 4-7, cerca de 1500 µg de proteínas foram solubilizadas em tampão de focalização (ANEXO J).

O programa de focalização foi estabelecido seguindo-se os seguintes passos: reidratação a 50 µA por 1 h, 30 V por 11 h, 100 V por 1 h, 200 V por 1 h, 400 V por 1 h, 100 V por 1h, 5000 V por 10 h e 8000 V até atingir 77.000 Vh. Após a focalização as fitas foram estocadas a -80°C.

### 3.3.2 Eletroforese (segunda dimensão)

Para a realização da eletroforese vertical, as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio (ANEXO K). Para redução, emergiu-se as fitas em solução de equilíbrio com 1% (p/v) de dithiothreitol (DTT) por 15 min e em seguida, para alquilação, na mesma solução contendo 2,5% (p/v) de iodoacetamida (IAA) e traços do corante bromofenol blue por 15 min.

As fitas foram moldadas no alto de um gel vertical com 0.5% de agarose em tampão Laemmli superior. A eletroforese, SDS-PAGE, foi realizada em gel de 12% de policacrilamida com 1,5 mm de espessura utilizando-se o sistema SE-630 (Amersham Biosciences). A migração das proteínas foi efetuada com amperagem fixa a 30 mA por gel, até o corante alcançar a base do mesmo.

### 3.3.3 Coloração dos géis

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 de acordo com o procedimento utilizado para coloração dos minigéis (MATERIAL E MÉTODOS 3.2.4).

### 3.4 Análise de imagem

A digitalização das imagens dos géis foi feita em scanner modelo UTA-1100, através do programa LabScan versão 5.0 (Amersham Biosciences) e as imagens analisadas automaticamente, pelo programa Image Master Elite v 3.0 software (GE Amershan Biosciences).

Os *spots* foram determinados seguindo-se os parâmetros: *Sensitivity*= 8035, *Operator Size*= 99, *Noise Factor*= 5 e *Background*= 1. Após este procedimento, uma edição manual, com algumas adições e deleções de *spots*, foi reallizada e os géis foram alinhados para verificar-se a reprodutibilidade destes.

Para obter-se uma quantificação relativa de cada proteína dentro da amostra, os volumes médios dos *spots* foram obtidos em percentual sobre o total de *spots* detectados. Os pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) experimentais das proteínas foram determinados automaticamente pelo programa, a partir de 5 pontos de referência anotados manualmente, e os teóricos, foram sugeridos pelo banco do SwissProt referentes à proteína com maior similaridade para cada dado experimental.

### 3.5 Digestão das proteínas

Um total de 360 *spots* fori selecionado e submetido à metodologia de digestão de proteínas proposta por Celedon et al. (2007), com algumas modificações (ANEXO L).

Os *spots* foram isolados de cada uma das repetições do gel e após serem fragmentados com auxílio de um bisturi, foram imersos em solução de descoloração (ANEXO M) até a completa remoção do corante.

Após desidratação com 100% de Acetonitrila (ACN), procedeu-se a redução e alquilação dos spots: os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 40 min a 55ºC. O excesso de líquido foi removido e substituído por 55 mM de IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio .

Após 30 min no escuro, à temperatura ambiente, o líquido excedente foi removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio, seguido de nova desidratação com 100% de ACN. Os fragmentos de gel foram finalmente reidratados com solução de 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 contendo 10

ng/μL de tripsina (Promega V5111). Após a reidratação total, os géis foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão, realizada a 37ºC por 14 h.

A ação da tripsina foi finalizada com a adição de solução bloqueadora (ANEXO N) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens com solução de eluição I (ANEXO O), solução de eluição II (ANEXO P) e 100% de ACN. Em cada uma das etapas da eluição, os fragmentos de gel foram submetidos à sonicação (40 KHz e 30 Watts), por 20 min em banho a 45ºC com auxílio do sonicador Ultra Som, Thronton-IPEC Eletrônica Ltda. Os sobrenadantes de cada *spot* foram misturados e transferidos para um mesmo tubo e o volume final da amostra foi reduzido a 10 µl em concentrador a vácuo (Eppendorf modelo 5301) à temperatura ambiente.

### 3.6 LC-MS/MS

Os peptídeos foram solubilizados em 1% de ácido fórmico e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Q-TOF Ultima API (Waters, Micromass), acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar CaplC XE Pump (Waters).

Os peptídeos resultantes da digestão *in-gel* foram separados por coluna Symmetry C18 em tampão A (0,1% de ácido fórmico, 5% ACN em água Milli-Q) com um gradiente linear de 90 minutos com 0-80% do tampão B (0,1% de ácido fórmico, 5% ACN em água Milli-Q). A ionização por ESI foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,0 KV e temperatura do cone igual a 90ºC, na presença de 5 psi de Nitrogênio. A energia de colisão por gás Argônio foi mantida em 15 psi. Todos os parâmetros foram definidos através do programa MassLynx v 2.1.

O Q-TOF modelo Ultima API, utilizado nas análises, conta com um sistema Nanolock Spray (Waters, Micromass), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição dos espectros de cada amostra. Todas as aquisições foram calibradas com um peptídeo padrão GFP ($GLU^1$-fibrinopeptide B; Sigma), em concentração igual a 100 fmol/μl e injeção automática de 0,6 μl/min.

### 3.7 Análise dos espectros de massas

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram processados pelo programa MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com).

Os parâmetros utilizados por cada um dos programas estão reunidos na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de processamento dos espectros MS/MS

| **Parâmetros MASCOT MS/MS *Íon Search*** | |
|---|---|
| Banco de dados | MSDB |
| Taxonomia | Viridiplantae (Plantas Verdes) |
| Enzima | Tripsina |
| Número de clivagens perdidas | 1 |
| Modificações fixas | Carbamidomethyl (C) |
| Modificações variáveis | Nenhuma |
| Tolerância de peptídeos | 50 ppm |
| Tolerância do Fragmento | 0.2 Da |
| Carga do íon | 2+ |
| Valores das Massas | Monoisotópicas |
| Formato dos dados | Micromass(. PKL) |
| Instrumento | ESI – QUAD – TOF |

### 3.8 Identificações das proteínas

A identificação dos espectros e possíveis similaridades com proteínas foi feita automaticamente. O programa MASCOT calcula uma pontuação para cada proteína encontrada a partir da probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 4.1 Extração das proteínas

De acordo com a literatura, a extração fenólica produz uma amostra mais pura (HURKMAN e TANAKA, 1986), uma vez que ácidos nucléicos, polifenóis, lipídios e carboidratos, que comumente provocam manchas nos géis bidimensionais (SARAVAN e ROSE, 2004), são facilmente removidos da amostra por ficarem aderidos à fase solúvel do tampão de extração.

A metodologia de extração fenólica e solubilização das proteínas utilizadas foram as mesmas propostas por Celedon et al. (2007) para extração de proteínas de madeira juvenil. O ácido tricloroacético (TCA) também pode ser utilizado para extração de proteínas, mas em análise comparativa feita por Meirelles (2006), mostrou-se menos eficiente e com menor rendimento.

Após a solubilização e quantificação das proteínas, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade da extração (Figura 7). Esta mostrou-se muito eficiente e a amostra não apresentou sinais de contaminação com impurezas ou degradação.

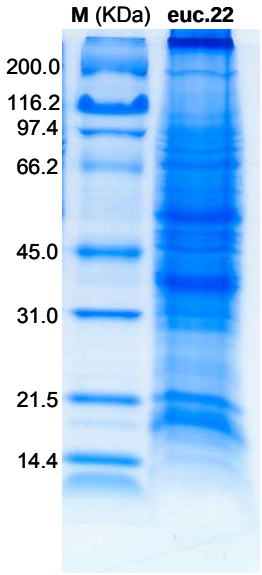


Figura 7 – Proteínas da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos, separadas em gel 12,5% de acrilamida. M: Marcador de peso molecular (SDS-PAGE Standards, Low Range, BioRad) KDa: Kilo Daltons

## 4.2 Géis bidimensionais

O perfil das proteínas expressas na região cambial foi primeiramente caracterizado em gel de pH 3-10. Pela Figura 8 observou-se que a maior parte das proteínas está concentrada na região de pH 4-7.

Para uma melhor separação das proteínas e retirada dos spots para sequenciamento (TWYMAN, 2004), os géis foram preparados em triplicata utilizando-se fitas IPG de intervalos de pH 4-7 (Figura 9) e mostram um perfil eletroforético muito semelhante.

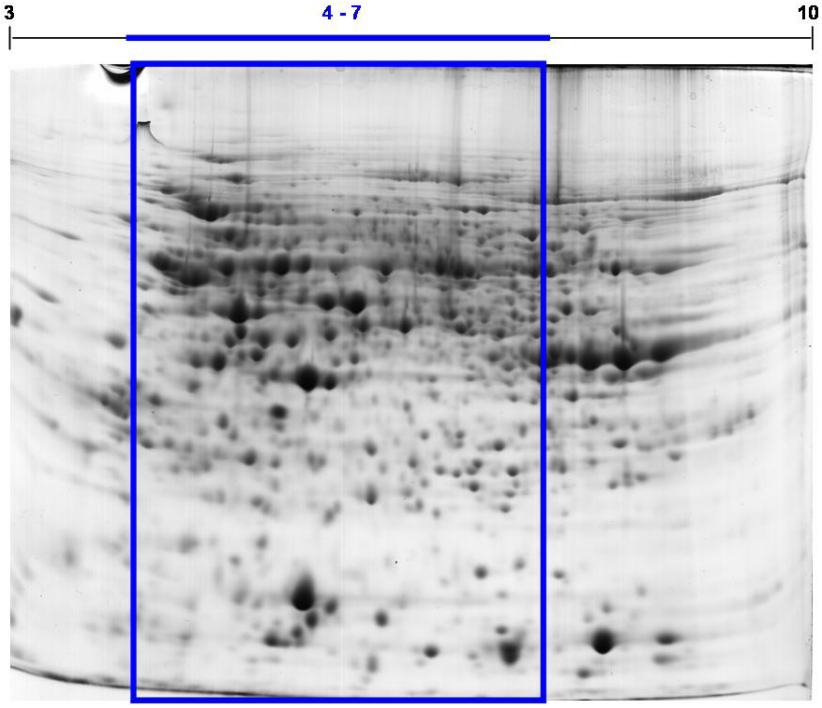


Figura 8 - Perfil de distribuição das proteínas de pI 3-10 da região cambial de *E. grandis* com 22 anos. Área delimitada pelo retângulo indica a faixa de pH 4-7, com a maior concentração de proteínas

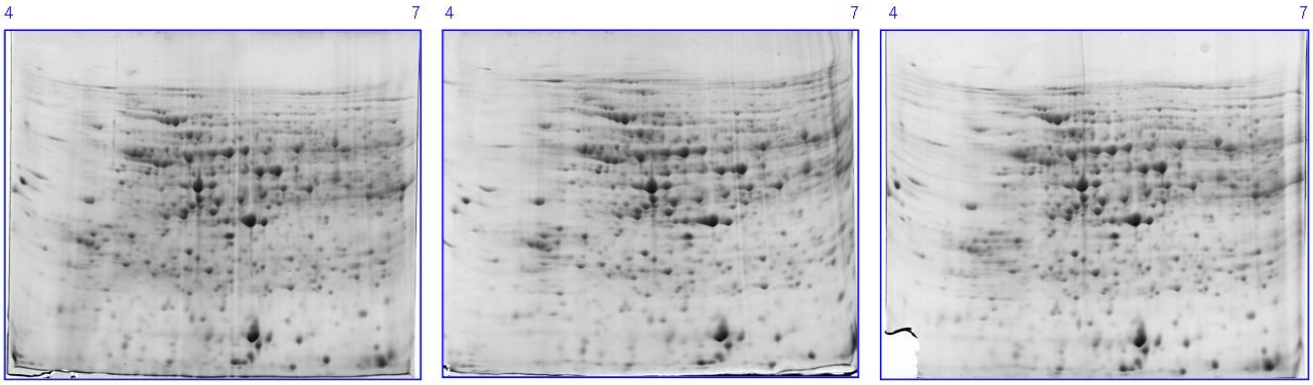


Figura 9 - Triplicata dos géis com as proteínas de pI 4-7 da região cambial de *E. grandis* com 22 anos

### 4.2.1 Análise das imagens dos géis

O alinhamento dois géis foi realizado automaticamente a partir de um gel escolhido como referência. A Figura 10 mostra a orientação dos vetores gerados a partir do pareamento do mesmo *spot* entre o gel de referência e um dos géis analisados.

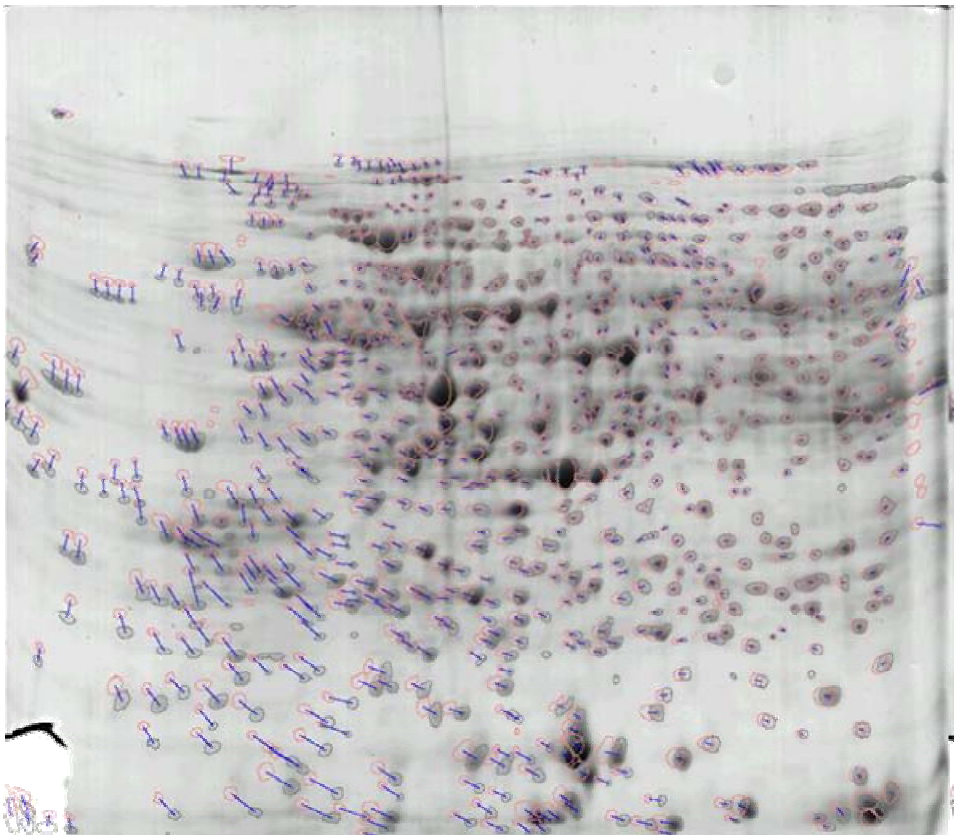

Figura 10 - Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação ao gel escolhido como referência

A extremidade esquerda do gel representado mostra uma pequena variação na migração dos *spots*, uma vez que os vetores podem ser observados com proporções maiores. Observa-se que houve grande reprodutibilidade entre as repetições, o que também pode ser observado pelo número de *spots* detectados em cada gel: 823, 820 e 775. Esses desvios e ausência de *spots* são causados principalmente por variações na focalização isoelétrica e na eletroforese, constantemente descritas na literatura e inerentes à técnica.

As massas moleculares e os pontos isoelétricos experimentais de cada proteína podem ser visualizados na Tabela 4, junto às proteínas identificadas.

### 4.2.2 Escolha dos *spots* e digestão

A retirada dos *spots* foi realizada com base em uma análise visual, privilegiando aqueles que apresentavam coloração mais intensa ou que estavam mais bem definidos. Um total de 360 *spots* foi selecionado, e destes, 250 submetidos à espectrometria de massas.

Para digestão e posterior análise dos resíduos dos peptídeos, todas as repetições de um mesmo *spot* foram agrupadas, obtendo-se assim uma maior concentração de proteína de cada amostra. O período em que as amostras foram submetidas à ação da tripsina foi de no máximo 14 h, uma vez que períodos prolongados levavam à identificação da própria tripsina nas análises. Esses resultados são comuns, pois a Tripsina acaba se autodigerindo e seus resíduos são facilmente ionizados e detectados pelo espectrômetro de massas.

## 4.3 Espectometria de Massas

### 4.3.1 Análise dos espectros

Os espectros MS/MS foram analisados utilizando-se o algoritmo do programa MASCOT (www.matrixscience.com) e selecionando-se os parâmetros escolhidos para a busca (Figura 11).

A escolha dos parâmetros é de fundamental importância para uma identificação precisa das proteínas. Optou-se pelo banco de dados MSDB (Mass Spectrometry protein sequence Data Base) uma vez que este tem uma ótima qualidade de sequências, principalmente por não conter seqüências redundantes. Como as amostras foram reduzidas e alquiladas, ou seja, as ligações dissulfeto dos resíduos de cisteína foram rompidas e estabilizadas com a inserção de um grupamento alquil pela iodoacetamida, selecionou-se a carbamidomethyl (C) como modificação fixa.

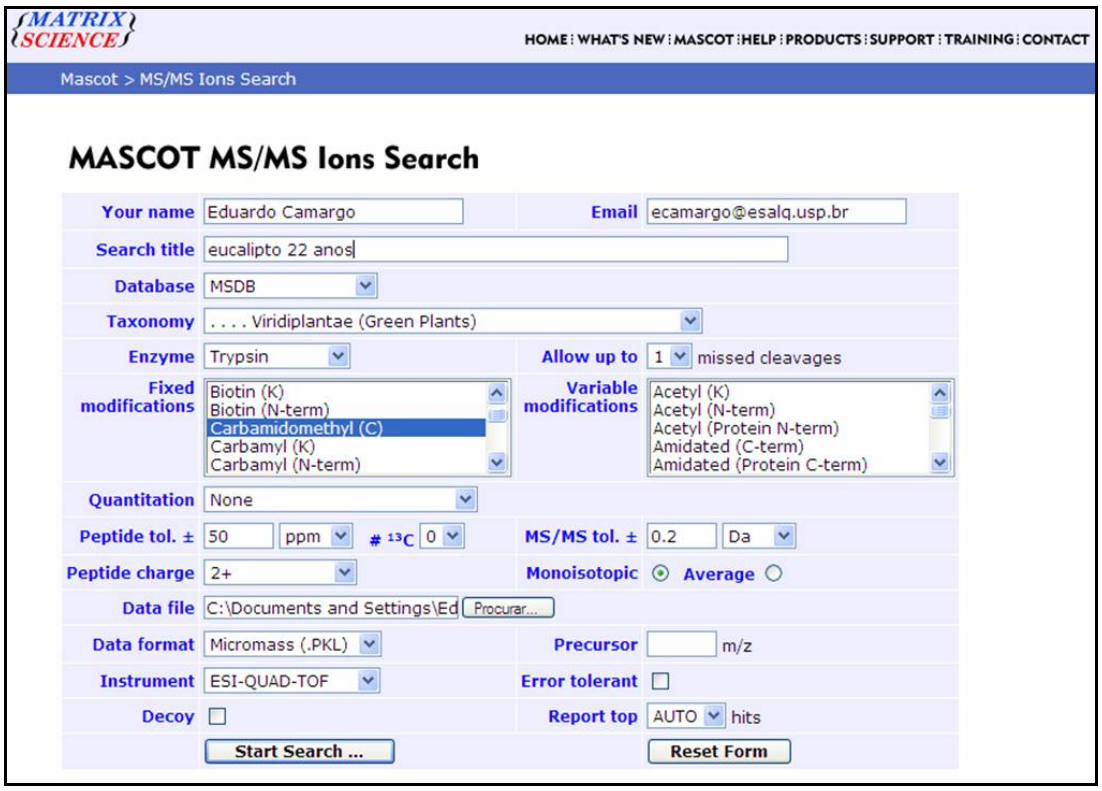


Figura 11 - Seleção dos parâmetros para busca de íons MS/MS no programa MASCOT

Analisou-se cada espectro separadamente e o resultado foi apresentado com base na somatória da pontuação gerada a partir da probabilidade de cada peptídeo, presente no espectro MS/MS, ser um evento aleatório. A Figura 12 mostra o gráfico gerado pelo programa MASCOT a partir do spot 121, onde as proteínas *UDP glucose 6-dehydrogenase* e *Adenosylhomocysteinase* foram identificadas (Tabela 2 e 3).

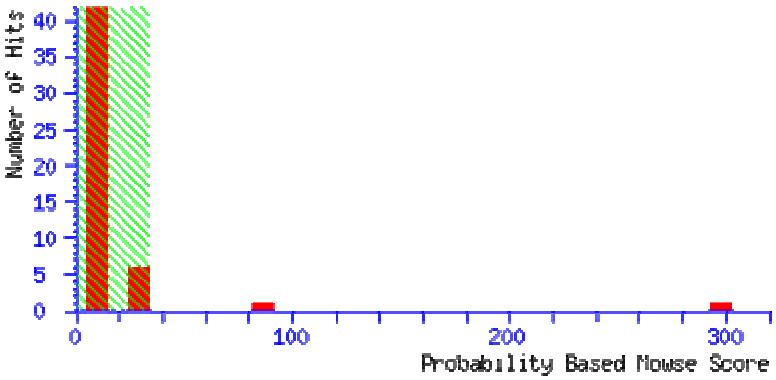


Figura 12 - Gráfico gerado pelo programa MASCOT com a somatória da pontuação gerada a partir da probabilidade de cada íon. Íons com pontuação superior a 34 indicam uma similaridade com nível de significância > 95%

Tabela 2 - Resultados obtidos para a proteína *UDP glucose 6-dehydrogenase*

| UDP glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22) | | score |
|---|---|---|
| nº de acesso: T08818 | PM: 53478; pI: 5.74 | 298 |
| Peptídios | K.IAILGFAFK.K | 70 |
| | K.LAANAFLAQR.I | 90 |
| | K.AADLTYWESAAR.M | 88 |
| | R.ILTTNLWSAELSK.L | 27 |
| | K.FLNASVGFGGSCFQK.D | 23 |

Tabela 3 - Resultados obtidos para a proteína *Adenosylhomocysteinase*

| Adenosylhomocysteinase | | score |
|---|---|---|
| nº de acesso: Q84RD8 | PM: 53790; pI: 5.69 | 90 |
| Peptídios | R.DSAAVFAWK.G | 30 |
| | K.SGIIVLAEGR.L | 30 |
| | R.ITIKPQTDR.W | 30 |

As duas proteínas referentes ao *spot* 121 apresentaram uma pontuação muito superior a 34, valor determinado pela análise, portanto infere-se que estas têm uma probabilidade de mais de 95% de corresponderem à *UDP glucose 6-dehydrogenase* e *Adenosylhomocysteinase*.

A presença de duas ou mais proteínas em um mesmo *spot* pode ser explicada pelos valores de peso molecular e ponto isoelétrico muito próximos e a co-migração de ambas durante a eletroforese bidimensional. Em *Pinus*, uma taxa de 15% de co-migração foi observada em fitas de pH 4-7 do proteoma de xilema (Gion et al., 2005).

### 4.3.2 Proteínas da região cambial de árvores adultas de eucalipto

Submeteu-se a espectrometria de massas um total de 250 *spots*. Destes, 99 apresentaram similaridade com proteínas do banco de dados MSDB. A identificação de proteínas, muitas vezes exclusivas de um determinado tecido ou espécie, depende da disponibilidade de uma base de dados específica e pode revelar muitas vezes,

proteínas ainda desconhecidas e a identificação de novos genes, contribuindo assim para elucidação de diversos processos celulares. A falta de um banco de dados público de eucalipto diminuiu, portanto, as chances de identificação de muitos espectros, principalmente pela necessidade de se ampliar a busca por seqüências em um grande número de espécies.

Utilizando um banco com seqüências de nucleotídeos de *Pinus*, Gion et al. (2005) aumentaram em 53,4% a taxa de 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 estágios de embriogênese somática em *Picea glauca*, utilizando um banco composto por ESTs de três espécies de *Picea* em associação a seqüências de nucleotídeos de *Pinus taeda* e *Populus spp* (Genebank). Dessa maneira, um aumento da taxa de identificação de proteínas de 38% para 62% quando ambos os bancos foram combinados, levou à descoberta de proteínas envolvidas em diversos processos celulares nunca antes associadas à embriogênese.

A Tabela 4 apresenta as proteínas que foram identificadas nos *spots* do gel bidimensional da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos (Figura 13).

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continua)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 03 | chaperonine 60K alpha chain | PW0005 | Brassica napus | 82 | R.AALQAGIDK.L<br>K.LLVEFENAR.V<br>K.LADAVGLTLGPR.G<br>R.NVVLDEFGSPK.V | 57625 / 4.99 | 74236 / 4.80 |
| 05 | BiP | Q587K1 | Glycine max | 106 | R.LSQEEIER.M<br>K.DAGVIAGLNVAR.I<br>K.FELSGIPPAPR.G<br>K.VFSPEEISAMILTK.M | 73549 / 5.06 | 89052 / 5.06 |
| 06 | glucose-regulated protein 78 | AAA34139 | Lycopersicon esculentum | 155 | K.VQQLLK.D<br>R.LSQEEIER.M<br>K.DAGVIAGLNVAR.I<br>K.FDLTGIPPAPR.G | 73190 / 5.10 | 88462 / 5.10 |
| 07 | Putative hsp70 | Q6L509 | Oryza sativa | 51 | K.DNNLLGK.F<br>K.DAGVIAGLNVMR.I<br>R.VEIIANDQGNR.T<br>R.TTPSYVAFTDTER.L<br>K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M<br>R.IINEPTAAAIAYGLDKK.A | 70791 / 5.10 | 81816 / 5.09 |
| 08 | Putative hsp70 | Q6L509 | Oryza sativa | 74 | R.VEIIANDQGNR.T<br>R.TTPSYVAFTDTER.L<br>K.ATAGDTHLGGEDFDNR.M | 70791 / 5.10 | 81476 / 5.14 |
| 12 | RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplast [Precursor] | T06412 | Pisum sativum | 116 | K.IVNDGVTVAK.E<br>K.LADLVGVTLGPK.G<br>R.DLINILEDAIR.S<br>K.VVAAGANPVLITR.G<br>K.SQYLDDIAILTGGTVIR.E | 62945 / 5.85 | 71155 / 5.25 |
| 14 | GroEL-like chaperone, ATPase | Q1RSH3 | Medicago truncatula | 64 | K.IGVQIIQNALK.T<br>K.QRPLLIVAEDVESDALATLILNK.L | 61130 / 5.91 | 70743 / 5.38 |
| 61 | 14-3-3 protein | Q1AP39 | Manihot esculenta | 178 | R.NLLSVAYK.N<br>K.EAAESTLLAYK.S<br>K.TVDVEELTVEER.N | 29813 / 4.75 | 27593 / 4.55 |
| 63 | 14-3-3 protein | Q1S3Y3 | Medicago truncatula | 97 | K.DSTLIMQLLR.D<br>K.LDVELTVEER.N<br>K.DSTLIMQLLR.D | 29346 / 4.81 | 29539 / 4.62 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 67 | H+-transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) delta' chain precursor | A41740 | Ipomoea batatas | 56 | K.GLAEFTQK.L<br>R.IDANLVQK.G | 21305 / 5.93 | 17529 / 4.64 |
| 71 | Translationally controlled tumor protein-like protein | Q8H6A5 | Zea mays | 51 | K.VVDIVDTFR.L<br>R.LQEQPPFDKK.S | 18678 / 4.5 | 16172 / 4.24 |
| 72 | Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 3 | BAB11113 | Arabidopsis thaliana | 76 | K.LGMKPITGVSR.V<br>K.NILFVISKPDVFK.S<br>K.IEDLSSQLQSQAAEQFK.A | 17876 / 5.10 | 27365 / 4.12 |
| 75 | caffeoyl-CoA O-methyltransferase (EC 2.1.1.104) | T10731 | Eucalyptus gunnii | 235 | R.LIELVK.V<br>K.ILAMDINR.E<br>R.DFVLELNK.A<br>R.ENYELGLPVIQK.A<br>R.EGPALPILDQLIEDGK.Q<br>K.SLLQSDALYQYILETSVYPR.E | 27896 / 5.02 | 23879 / 4.78 |
| 78 | Aluminum-induced protein | Q5MCR8 | Codonopsis lanceolata | 92 | K.SANEVVLVIEAYK.A | 25259 / 5.41 | 24319 / 4.96 |
| 79 | chalcone isomerase (EC 5.5.1.6) A | ISPJA1 | Petunia x hybrida | 53 | R.GLEIQGK.F<br>R.DVVTGPFEK.F | 26074 / 5.26 | 23642 / 5.09 |
| 80 | Protein At5g26667. | Q3E929 | Arabidopsis thaliana | 67 | K.FLIDGFPR.N<br>R.EDDNIETIR.K | 23110 / 6.36 | 21884 / 5.01 |
| 81 | 20S proteasome alpha 6 subunit. | Q8H1Y2 | Nicotiana benthamiana | 83 | K.QGSAAIGLR.S<br>R.LFQVEYAMEAVK.Q<br>K.VDDHIGVAIAGLTADGR.V | 29858 / 5.07 | 30869 / 5.09 |
| 82 | Protein At3g56190 | Q2V3N8 | Arabidopsis thaliana | 131 | K.FTDVVK.E<br>R.HSLNNNLLK.Y<br>K.EFDSMTPLDSWK.T | 27232 / 5.21 | 32019 / 5.13 |
| 83 | Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (Fragment). | Q9SWB9 | Eucalyptus globulus | 79 | R.DFVLELNK.A<br>R.ENFEIGLPVIQK.A | 19803 / 4.79 | 25330 / 5.18 |
| 85 | Ascorbate peroxidase. | Q945R5 | Hordeum vulgare | 55 | K.TGGPFGTMK.C<br>K.YAADEDAFFADYAEAHLK.L | 27964 / 5.10 | 22642 / 5.31 |
| 86 | Putative serine carboxypeptidase | Q7G6W4 | Oryza sativa | 52 | R.IASVAETGPLK.F | 44017 / 5.01 | 22964 / 5.18 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 88 | Putative proteasome 20S beta1.1 subunit (Fragment). | Q6R1M8 | Brassica napus | 81 | K.EEAEQLVVK.A<br>R.TVIINSEGVTR.N<br>K.NMLQTGLIVGGWDK.Y | 18614 / 7.74 | 19807 / 5.21 |
| 89 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1, mitochondrial [Precursor] | T51815 | Arabidopsis thaliana | 75 | R.LGANSLLDIVVFGR.A<br>K.AVIELENYGLPFSR.T | 69612 / 5.86 | 19128 / 5.25 |
| 91 | Putative mitochondrial F0 ATP synthase D chain | Q7XXS0 | Oryza sativa | 76 | K.FDALLVELK.E<br>K.YVDTVTPQYKPK.F | 19713 / 5.19 | 16443 / 5.10 |
| 100 | Putative spindle disassembly related protein CDC48. | Q1G0Z1 | Nicotiana tabacum | 251 | K.AFEEAEK.N<br>K.LAGESESNLR.K<br>R.GSSVGDAGGAADR.V<br>R.LGDVVSVHQCPDVK.Y<br>K.NAPSIIFIDEIDSIAPK.R | 90645 / 5.13 | 103162 / 5.24 |
| 103 | Putative ankyrin-repeat protein | Q6TKQ6 | Vitis aestivalis | 61 | K.TPIDVAK.L<br>K.LNNQHEVLK.L | 37918 / 4.53 | 52540 / 4.03 |
| 104 | Putative ankyrin-repeat protein | Q6TKQ6 | Vitis aestivalis | 45 | K.TPIDVAK.L<br>K.LNNQHEVLK.L | 38089 / 4.53 | 51034 / 4.08 |
| 106 | Malic oxidoreductase. | Q1SRX6 | Medicago truncatula | 121 | R.QYEVPLQK.Y<br>K.VLVQFEDFANHNAFELLAK.Y | 65638 / 5.98 | 81748 / 7.00 |
| 108 | transketolase (EC 2.2.1.1) 3 | S54300 | Craterostigma plantagineum | 121 | R.FGASAPAGK.I<br>K.SNSYSVHGSALGAK.E | 56152 / 5.80 | 91452 / 6.69 |
| 109 | transketolase (EC 2.2.1.1) 3 | S54300 | Craterostigma plantagineum | 94 | R.FGASAPAGK.I<br>K.SNSYSVHGSALGAK.E | 56152 / 5.80 | 91149 / 6.60 |
| 111 | Glucose-6-phosphate isomerase. | Q1PCD2 | Solanum lycopersicum | 66 | R.AILPYSQALEK.L<br>R.FLANVDPIDVAR.N | 62739 / 6.53 | 74545 / 6.69 |
| 112 | Adenylyl cyclase associated protein | Q9ZWM6 | Gossypium hirsutum | 49 | K.ELYLPGLR.D<br>K.DSVLQIQGK.V | 50602 / 6.22 | 71630 / 6.75 |
| 113 | Putative T-complex protein 1, ETA subunit (AT3g11830/F26K24_12). | Q9SF16 | Arabidopsis thaliana | 33 | K.SQLFINSYAK.A<br>R.GGADQFIEEAER.S<br>R.LAIGDLATQYFADR.D | 59739 / 6.03 | 76809 / 6.71 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 114 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, chloroplast [Precursor] | T52296 | Arabidopsis thaliana | 130 | K.YVGVSLVGK.T<br>K.TLAVMGFGK.V<br>K.TLAVMGFGK.V<br>K.VAESDALIVR.S<br>R.GGVIDEDALVR.A | 66413 / 5.81 | 78551 / 6.59 |
| 116 | chaperonin 60 alpha chain precursor, chloroplast | T06518 | Pisum sativum | 68 | R.GILNVAAIK.A<br>K.LADAVGLTLGPR.G<br>K.VGAATETELEDR.K<br>K.ISAIKDIIPLLEK.T<br>R.GYISPQFVTNPEK.S | 61941 / 5.15 | 81341 / 6.31 |
| 117 | Putative CCT chaperonin gamma subunit. | Q5Z6U5 | Oryza sativa | 108 | R.IDDIVSGIK.K<br>K.ALEDALAVLDK.I<br>K.WPYEAAALAFEAIPR.T | 60860 / 6.23 | 77643 / 6.30 |
| 118 | unknow protein | Q1KUM7 | Cleome spinosa | 38 | R.ATLQFLEK.F<br>K.GIDPPSLDLLAR.E | 59069 / 6.19 | 74607 / 6.31 |
| 119 | unknow protein | Q1KUM7 | Cleome spinosa | 113 | R.ATLQFLEK.F<br>R.VLVDGFEIAK.R<br>K.GIDPPSLDLLAR.E<br>K.SEINAGFFYSNAEQR.E | 59525 / 6.19 | 74421 / 6.35 |
| | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase cytoplasmic isoform-like | Q2XTC4 | Solanum tuberosum | 76 | R.LILDTIR.G<br>K.TFPALFNLYR.Q<br>R.GGYFDEYGIIR.D | 58800 / 5.97 | |
| 120 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase cytoplasmic isoform-like | Q2XTC4 | Solanum tuberosum | 250 | R.LILDTIR.G<br>R.FFLPLWNR.D<br>K.ELVQNLLVLR.F<br>K.TFPALFNLYR.Q<br>R.GGYFDEYGIIR.D | 58800 / 5.97 | 67920 / 6.51 |
| 121 | probable UDPglucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22) | T08818 | Glycine max | 298 | K.IAILGFAFK.K<br>K.LAANAFLAQR.I<br>K.AADLTYWESAAR.M<br>R.ILTTNLWSAELSK.L<br>K.FLNASVGFGGSCFQK.D | 53478 / 5.74 | 67100 / 6.51 |
| | Adenosylhomocysteinase | Q84RD8 | Medicago truncatula | 90 | R.DSAAVFAWK.G<br>K.SGIIVLAEGR.L<br>R.ITIKPQTDR.W | 53790 / 5.69 | |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 122 | UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22) | Q84TT8 | Colocasia esculenta | 268 | R.ETPAIDVCK.G<br>K.LAANAFLAQR.I<br>K.AADLTYWESAAR.M<br>R.IITTNLWSAELSK.L<br>K.FLNASVGFGGSCFQK.D | 53517 / 6.06 | 64136 / 6.53 |
| | Adenosylhomocysteinase | Q84RD8 | Medicago truncatula | 57 | K.SGIIVLAEGR.L<br>K.VAVVCGYGDVGK.G<br>R.IVGVSEETTTGVK.R | 53790 / 5.69 | |
| 123 | Putative mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2a | Q6YWQ9 | Oryza sativa | 50 | K.IVLELAAR.S | 45739 / 5.90 | 64200 / 6.58 |
| | probable UDPglucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22) | T08818 | Glycine max | 48 | K.IAILGFAFK.K<br>K.HVFEADIVFVSVNTPTK.T | 53478 / 5.74 | |
| | tubulin beta chain | UBKM | Chlamydomonas reinhardtii | 46 | K.LAVNLIPFPR.L | 50157 / 4.82 | |
| 124 | Tubulin Alpha | Q2TFP2 | Glycine max | 96 | R.LISQIISSLTTSLR.F<br>R.TVQFVDWCPTGFK.C<br>R.AVFVDLEPTVIDEVR.C | 50345 / 4.99 | 59911 / 6.60 |
| 125 | UDP-glucose dehydrogenase. | Q6S4U9 | Populus tomentosa | 115 | K.IAILGFAFK.K<br>K.AADLTYWESAAR.T<br>K.FLNASVGFGGSCFQK.D<br>K.EAHGVCILTEWDEFK.T | 53534 / 5.92 | 65372 / 6.77 |
| 127 | Cell division protein FtsZ. | Q1SU03 | Medicago truncatula | 34 | K.FDLMYAK.R<br>K.EIVDLCLDR.I<br>R.QLFHPEQLISGK.E<br>R.AVFVDLEPTVIDEVR.T | 50207 / 4.91 | 59100 / 6.76 |
| 128 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1-like. | Q5ZDX8 | Oryza sativa | 42 | R.GFALFVYK.T<br>R.GFALFVYK.T | 44242 / 8.43 | 57904 / 6.76 |
| 132 | Translation factor; Elongation factor G, III and V. | Q1S825 | Medicago truncatula | 63 | R.LWGENFFDPATK.K<br>K.NATLTNEKEVDAHPIR.A<br>R.YRVENLYEGPLDDQYATAIR.N<br>R.NGNEYLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR.I<br>R.NGNEYLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR.I | 94081 / 5.80 | 106119 / 6.68 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 133 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14) | S57636 | Madagascar periwinkle | 243 | R.EGLPLRK.A<br>K.YLFAGVVDGR.N<br>K.GVTGFGFDLVR.G<br>K.FALESFWDKK.S<br>K.AGINVIQIDEAALR.E<br>K.YGAGIGPGVYDIHSPR.I | 85089 / 6.10 | 98200 / 6.79 |
| 134 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14) | S57636 | Madagascar periwinkle | 235 | K.SWLAFAAQK.V<br>K.YLFAGVVDGR.N<br>K.FALESFWDK.K<br>K.GVTGFGFDLVR.G<br>K.FALESFWDKK.S<br>K.AGINVIQIDEAALR.E<br>K.YGAGIGPGVYDIHSPR.I<br>K.LQEELDIDVLVHGEPER.N | 84804 / 6.10 | 98309 / 6.90 |
| 135 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14) | S57636 | Catharanthus roseus | 111 | K.YLFAGVVDGR.N<br>K.GVTGFGFDLVR.G<br>K.FALESFWDKK.S<br>K.AGINVIQIDEAALR.E | 85089 / 6.10 | 98250 / 7.00 |
| 138 | Aconitate hydratase. | BAD05751 | Oryza sativa | 106 | R.ILLESAIR.N<br>K.IIDWENTSPK.L<br>K.FYSLPALNDPR.I<br>K.INPLVPVDLVIDHSVQVDVAR.S | 98591 / 5.67 | 103420 / 6.31 |
| 140 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit | Q8W317 | Oryza sativa | 73 | K.ADVFLLVGTQPR.V<br>K.ADVFLLVGTQPR.V<br>R.ANVILPSSAFSEK.E | 81065 / 5.86 | 93372 / 6.13 |
| 141 | AT5g20890/F22D1_60 (Hypothetical protein At5g20890) (T-complex protein 1, beta subunit) (Hypothetical protein). | Q940P8 | Arabidopsis thaliana | 223 | K.IGIGQPK.R<br>K.SHAIEAFSR.A<br>R.VDEIITCAPR.R<br>K.LIEEIMIGEDK.L<br>K.DSFLDEGFILDK.K<br>R.VLLGGGWPEMVMAK.E<br>K.DSFLDEGFILDKK.I | 57753 / 5.59 | 70215 / 5.97 |
| 142 | pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) | DCZMP | Zea mays | 69 | R.VNVLFK.H<br>K.ELLEWGSR.V<br>K.AVKPVMVGGPK.I | 66355 / 6.47 | 75105 / 6.02 |
| 143 | pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) | DCZMP | Zea mays | 83 | K.AVKPVMVGGPK.I<br>R.VSAANSRPPNPQ.- | 66355 / 6.47 | 75354 / 5.94 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 144 | Phosphoglycerate dehydrogenase. | Q9LT69 | Arabidopsis thaliana | 61 | R.APDDLDTR.L<br>K.ISLCDALIVR.S<br>R.GGVIDEEALLR.A | 62368 / 8.41 | 70920 / 5.73 |
| 145 | GDP dissociation inhibitor 1-like. | Q2VCK0 | Solanum tuberosum | 39 | K.YLYFK.A<br>K.VHKVPATDMEALK.S<br>R.FQGGSPYIYPLYGLGELPQAFAR.L | 50114 / 5.60 | 69001 / 5.67 |
| 146 | Aldehyde dehydrogenase. | Q1S775 | Medicago truncatula | 116 | K.IAFTGSSATGSK.I<br>K.EEVFGPVLCVK.T<br>R.ELGEWGLDNYLSVK.Q | 54961 / 5.30 | 69001 / 5.58 |
| 147 | T-complex protein 1 epsilon subunit (Fragment). | Q9ZSQ6 | Mesembryanthemum crystallinum | 90 | R.FQELTPEK.L<br>R.WVGGVELELIAIATGGR.I | 47015 / 5.50 | 70450 / 5.48 |
| 148 | succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) flavoprotein alpha chain [imported] | T51815 | Arabidopsis thaliana | 120 | R.AFGGQSLDFGK.G<br>K.AVIELENYGLPFSR.T | 69612 / 5.86 | 87585 / 6.19 |
| 149 | Putative CCT chaperonin gamma subunit. | Q5Z6U5 | Oryza sativa | 87 | R.IDDIVSGIK.K<br>R.NLQDAMSVAR.N<br>K.ALEDALAVLDK.I | 60860 / 6.23 | 81341 / 6.18 |
| 151 | Putative DNA-binding protein GBP16. | Q5W6H1 | Oryza sativa | 75 | K.AWLALGTK.T<br>K.AADVLAAANTAAEVALR.L | 43170 / 6.62 | 57761 / 6.49 |
| 153 | Mitogen-activated protein kinase. | Q8GZR5 | Malus micromalus | 61 | R.YFLYQLLR.G<br>R.LITELLGSPDDSSLGFLR.S | 47701 / 5.78 | 47871 / 6.37 |
| 158 | glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase | AAA89207 | Taxus baccata | 43 | K.KVVISAPSK.D<br>R.NPEEIPWGEVGAEYVVESTGVFTDKDK.A | 36878 / 6.41 | 42191 / 6.51 |
| 159 | Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] / golgi associated protein se-wap41 | T04331 | Zea mays | 48 | K.ASCISFK.D<br>K.ASNPFVNLK.K<br>R.NLDFLEMWR.A + Oxidation (M) | 41691 / 5.75 | 46926 / 6.61 |
| 160 | GDP-mannose-3,5-epimerase | CAD70055 | Arabidopsis thaliana | 283 | K.KLPIHHIPGPEGVR.G<br>K.ISITGAGGFIASHIAR.R<br>R.SFTFIDECVEGVLR.L<br>R.FFYASSACIYPEFK.Q | 43130 / 5.85 | 52409 / 6.63 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI experimental |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 161 | Chalcone synthase | Q2ENC2 | Populus trichocarpa | 49 | R.VLVVCSEITAVTFR.G | 43721 / 5.72 | 49406 / 6.73 |
| | Alcohol dehydrogenase | Q9S700 | Arabis blepharophylla | 34 | K.FGVTEFVNPK.D<br>K.KGQSVAIFGLGAVGLAAAEGAR.I<br>K.ILFTSLCHTDVYFWEAK.G | 41595 / 5.65 | |
| 162 | Anthocyanidin synthase | Q84V01 | Brassica oleracea | 125 | K.INYYPK.C<br>R.DLSLWPK.T<br>R.TFAQHIEHK.L<br>K.LANNASGQLEWEDYFFHLVYPEDKR.D | 41120 / 5.14 | 47042 / 6.80 |
| 163 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (EC 1.2.1.12) | G3PC | Dianthus caryophyllus | 143 | K.TLLFGEK.A<br>K.YDSVHGQWK.H<br>K.AGIALNDNFIK.L<br>R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T | 36877 / 6.46 | 42933 / 6.79 |
| 164 | Fructose-bisphosphate aldolase | Q94JJ0 | Oryza sativa | 109 | K.EAAWGLAR.Y<br>K.TWQGRPENVEAAQK.A<br>K.GLVPLPGSNNESWCQGLDGLASR.C | 42253 / 8.81 | 42542 / 6.89 |
| 166 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (EC 1.2.1.12) | G3PC | Dianthus caryophyllus | 110 | K.AGIALNDNFIK.L<br>R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T | 36877 / 6.46 | 46383 / 7.07 |
| 169 | Chalcone synthase | Q2WBN0 | Misopates orontium | 48 | M.VTVEEVR.R<br>R.EVGLTFHLLK.D | 42694 / 6.15 | 51417 / 6.94 |
| 173 | Mov34-1 | Q1SL61 | Medicago truncatula | 90 | K.VVIDAFR.L<br>R.AVAVVVDPIQSVK.G<br>R.QTTSNLGHLNKPSIQALIHGLNR.H | 34547 / 6.31 | 36907 / 6.89 |
| 177 | Translation initiation factor IF5 | Q1SIP1 | Medicago truncatula | 65 | R.LFFLR.C<br>R.VFNILR.E<br>K.NFEGILR.R | 30562 / 5.95 | 36754 / 6.66 |
| 182 | cysteine proteinase inhibitor | T10057 | Ricinus communis | 50 | K.FDMILK.V + Oxidation (M)<br>K.ELQEFK.H | 23290 / 6.17 | 25100 / 6.45 |
| 185 | Unknow protein | Q8LF67 | Arabidopsis thaliana | 102 | R.ETGQALDR.L<br>R.GSSIWYGCVLR.G<br>R.GDVNTVSVGSGTNIQDNSLVHVAK.S | 30123 / 7.13 | 27139 / 6.58 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(continuação)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI exper. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 187 | vicilin precursor | S22477 | Theobroma cacao | 185 | R.FAENSPPLK.G<br>R.AISQQATSPR.H<br>K.LTIAVLALPVNSPGK.Y<br>K.APLSPGDVFVAPAGHAVTFFASK.D | 66157 / 6.17 | 30589 / 6.95 |
| 188 | Ras small GTPase, Rab type | Q1S416 | Medicago truncatula | 108 | K.QVTFHR.K K.QVTFHR.K<br>R.VCENIPIVLCGNK.V<br>K.SNYNFEKPFLYLAR.K | 25200 / 6.38 | 27206 / 6.95 |
| 190 | proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1) chain PBF1 [imported] | T47893 | Arabidopsis thaliana | 43 | R.MSTGYSILSR.D<br>R.HLIYQHQHNK.Q<br>K.GCVFTYDAVGSYER.V | 24628 / 6.95 | 21577 / 6.90 |
| 192 | Triose-phosphate isomerase (Fragment) | Q7X9R3 | Gossypium barbadense | 87 | K.VATPAQAQEVHCELR.K<br>K.VATPAQAQEVHCELRK.W | 11439 / 6.92 | 23563 / 6.68 |
| 197 | Soluble inorganic pyrophosphatase | Q2P9V1 | Papaver rhoeas | 88 | K.VKYELDK.K<br>R.VLYSSVVYPHNYGFIPR.T | 24401 / 5.90 | 20716 / 6.33 |
| 200 | Putative quinone reductase (Fragment) | Q6YCG4 | Vitis vinifera | 106 | K.AFLDATGGLWR.T<br>K.GGSPYGAGTFAGDGSR.Q | 17612 / 5.59 | 19627 / 6.38 |
| 202 | proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1) chain PBB1 [imported] | T51977 | Arabidopsis thaliana | 74 | K.KTEVLLTK.I<br>G.TTIVGLIFKDGVILGADTR.A | 29536 / 6.66 | 22605 / 6.58 |
| 206 | Ascorbate peroxidase | Q1AFF4 | Vitis pseudoreticulata | 82 | R.IAWHSAGTFDVK.T | 27769 / 5.58 | 26558 / 6.81 |
| 210 | proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1) beta chain PBD1 [imported] | T51982 | Arabidopsis thaliana | 186 | R.GELATALR.K<br>K.IVDKDGAR.D<br>K.LVAASGEPGDR.V<br>R.VQFTEYVQK.N<br>R.LVVAPPNFVIK.I | 22526 / 5.95 | 18765 / 6.47 |
| 219 | S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like. | Q8W0C5 | Oryza sativa | 85 | R.VLVVDGGGSLR.C<br>R.ALQPIFQIYGR.R | 18338 / 5.35 | 12001 / 5.17 |
| 220 | RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif) | Q1SWQ7 | Medicago truncatula | 55 | R.NITVNEAQSR.G<br>K.AFSQYGEIIDSK.I | 16354 / 5.24 | 10342 / 5.14 |
| 223 | Glutathione peroxidase | Q8W2G9 | Hevea brasiliensis | 42 | K.GGIFGDNIK.W<br>K.AEYPIFDK.V | 19523 / 5.23 | 15007 / 5.33 |

Tabela 4 – Proteínas identificadas da região cambial de árvores de *Eucalyptus grandis* com 22 anos

(conclusão)

| *Spot* | Proteína | Nº de acesso | Similaridade | Score Mascot | Peptídeos | PM / pI teórico | PM / pI exper. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 225 | Class I heat shock protein (Fragment) | Q7XY72 | Kandelia candel | 43 | R.ILQISGER.R | 15250 / 5.58 | 12773 / 5.47 |
| 227 | Seed maturation protein PM31 | Q9XET1 | Glycine max | 64 | R.ADLPGVK.K<br>K.ILQISGER.V | 17736 / 6.10 | 12407 / 5.56 |
| 232 | glycine-rich protein | T03442 | Oryza sativa | 68 | R.DAIQGMNGK.E<br>R.NITVNEAQSR.R | 20633 / 9.51 | 10273 / 5.76 |
| 234 | Actin-depolymerizing factor 4 | AAD09110 | Arabidopsis thaliana | 114 | R.FLELK.A<br>R.FIVYK.I<br>K.QVIVEK.V<br>K.MIYASSK.D | 16368 / 6.73 | 11871 / 5.88 |
| 244 | Ubiquitin-conjugating enzyme 1 | Q45W77 | Arachis hypogaea | 53 | K.DKWSPALQIR.T<br>K.LELFLPEEYPMAAPK.V | 17195 / 6.74 | 10011 / 6.89 |
| 249 | Putative beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase | Q6I5L0 | Oryza sativa | 112 | R.DILPHR.F<br>R.FPFLLVDR.V<br>R.ENFFFAGIDK.V | 23325 / 8.98 | 14288 / 6.53 |
| 250 | Chloroplast allene oxide cyclase precursor (EC 5.3.99.6) | Q2PP43 | Ipomoea nil | 133 | K.LFYTFYLK.G<br>K.LQQLIFPFK.L | 26144 / 8.90 | 16498 / 6.50 |
| 251 | heat shock protein hsp17.6L | T07625 | Glycine max | 64 | K.ADIPGLK.K<br>K.VQIEDDR.V | 17561 / 5.69 | 13116 / 6.32 |
| 255 | Putative alpha3 proteasome subunit (Fragment) | Q93X39 | Nicotiana tabacum | 43 | R.TTIFSPEGR.L<br>K.LLQTSTSTEK.M<br>R.LYQVEYAMEAIGNAGSAIGILAK.D | 18126 / 6.12 | 23330 / 5.91 |
| 261 | proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1) delta chain | T03985 | Nicotiana tabacum | 43 | R.LLSYNNK.D<br>R.TSTGMYVANR.A | 25168 / 5.18 | 19191 / 5.53 |
| 268 | Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC 4.1.1.39) (RuBisCO large subunit) (Fragment) | RBL | Bixa orellana | 67 | K.EIKFEFEAMDTL.-<br>R.DITLGFVDLLRDDFIEK.D | 51747 / 6.04 | 25204 / 5.38 |
| | Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (Fragment) | Q9SWB9 | Eucalyptus globulus | 53 | R.DFVLELNK.A<br>R.ENFEIGLPVIQK.A | 19860 / 4.79 | |

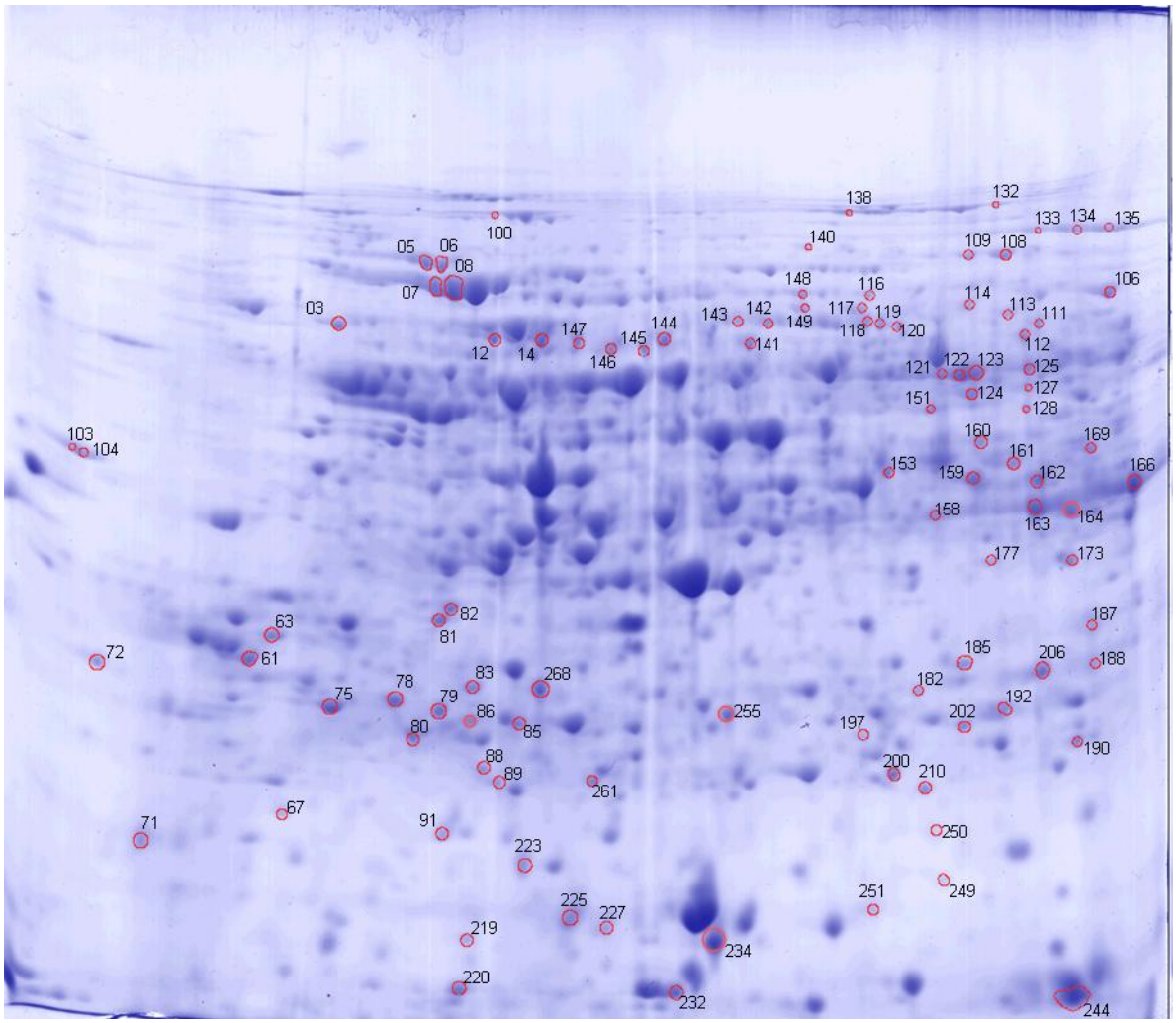


Figura 13 - Gel bidimensional (pH 4-7) da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos. Os números correspondem aos *spots* selecionados para a análise

### 4.3.3 Múltiplos *spots* de uma mesma proteína

As proteínas *hsp70*, *14-3-3*, *caffeoyl-CoA O-methyltransferase*, *transketolase*, *Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*, *UDP glucose dehydrogenase*, *Chalcone synthase*, *Adenosylhomocysteinase*, *Pyruvate decarboxylase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase* foram identificadas em mais de um *spot*, muitas apresentando diferenças na massa molecular e no ponto isoelétrico.

Esse comportamento protéico é relatado por vários trabalhos que utilizam a eletroforese bidimensional para o sequenciamento de proteínas. Mathesius et al.

(2001), em análise proteômica de raiz de *Medicago truncatula*, identificaram uma mesma proteína em vários *spots*. No proteoma de *Pinus*, 40% das proteínas identificadas foram encontradas em mais de um *spot*. A enzima S-adenosilmetionina Sintetase, por exemplo, apresentou similaridade a 14 *spots* (GION et al., 2005).

As espécies de eucariotos superiores utilizam mecanismos de edição de RNA, *splicing* alternativo, promotores alternativos e modificações pós-traducionais (PTM) para produzir múltiplas isoformas de proteínas de um mesmo gene (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005). Esses mecanismos ou até mesmo degradação das proteínas pela manipulação das amostras (HERBERT et al., 2001), podem ser apontados como possíveis causadores da presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína (JORGE et al., 2005).

Os mecanismos de PTM como a fosforilação, acetilação, alquilação, metilação dentre outras, adicionam grupos funcionais que alteram a atividade, conformação e interações de um grande número de proteínas (MANN e JENSEN, 2003). Mais de 300 sítios de fosforilação foram encontrados no proteoma de membrana de *Arabidopsis* (CHEN e HARMON, 2006). No *splicing* alternativo, o mRNA pode ser seletivamente processado e traduzido em proteínas com diferenças estruturais e funcionais (MACKNIGHT et al., 2002). Evidências mostram que a maior parte dos genes podem sofrer essas variações e resultam em múltiplas isoformas (ROBERTS et al., 2002).

A grande variedade de isoformas transcricionais e pós-traducionais podem desempenhar diferentes funções e, ainda, a expressão de diferentes isoformas de uma mesma proteína pela célula, um mecanismo central de controle. A expressão de isoformas é o maior mecanismo de regulação celular (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005).

### 4.4 Classificação funcional das proteínas

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função biológica em seis categorias funcionais (Figura 14), baseadas em Rison et al. (2000) com algumas modificações propostas por Carvalho et al. (2008).

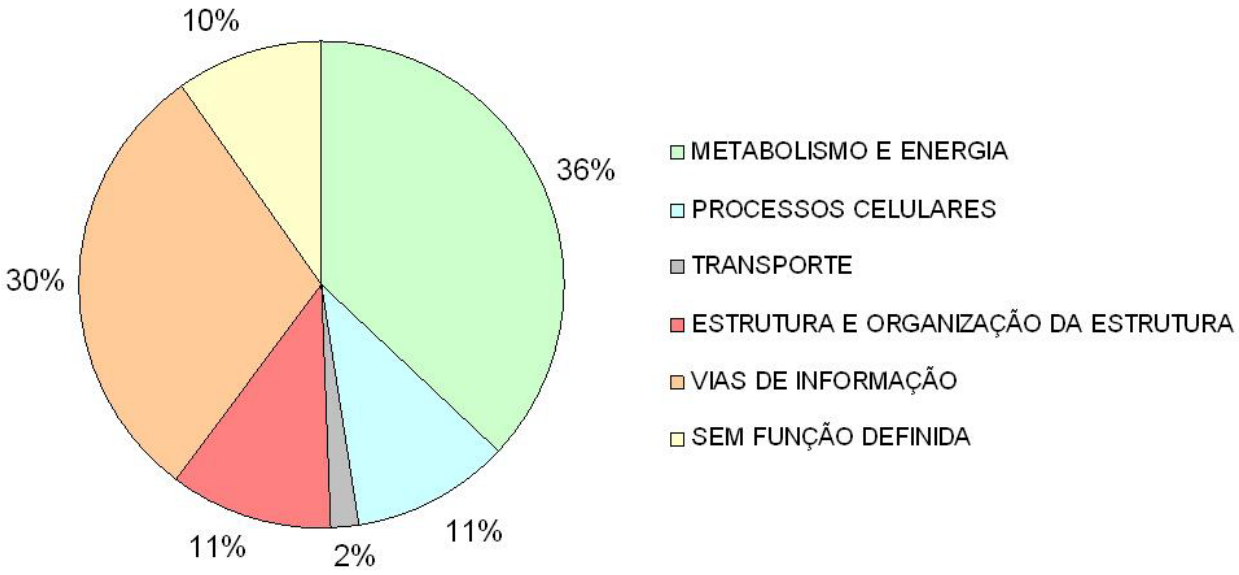


Figura 14 - Classificação funcional das 106 proteínas identificadas da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos

A categoria Metabolismo e Energia está representada pelo maior número de proteínas (36%). Dentre elas, estão proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, síntese de energia, metabolismo de aminoácidos e metabolismo secundário. As enzimas *Succinate dehydrogenase*, *Malic oxidoreductase*, *Transketolase*, *Glucose-6-phosphate isomerase*, *Glucose-6-phosphate 1-*dehydrogenase, *Pyruvate decarboxylase*, *Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase*, *GDP-mannose-3,5-epimerase*, *Fructose-bisphosphate aldolase*, *Triose-phosphate isomerase*, *Aconitate hydratase* e *Ribulose bisphosphate carboxylase large chain* estão envolvidas no metabolismo basal da célula, responsáveis pela síntese de carboidratos e intermediários da glicólise e ciclo de Krebs. A proteína *Transketolase* é uma enzima chave no processo oxidativo do ciclo das pentoses fosfato, responsável pela síntese de UDP-intermediários. Em *Populus*, a diminuição da expressão dessa enzima provocou uma redução do fluxo de carbono para essa via (FERREIRA et al., 2006). A *GDP-mannose-3,5-epimerase* está relacionada a biossíntese de vitamina C, carboidrato envolvido em várias funções dentro da célula como processos antioxidantes, fotossíntese, divisão celular, regulação do crescimento e funcionando também como cofator de várias enzimas (WOLUCKA et al., 2003).

*H+-transporting two-sector ATPase*, *Putative mitochondrial F0 ATP synthase D chain* e *NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit* estão relacionadas à síntese de energia, principalmente à produção de ATP.

A enzima *Alcohol dehydrogenase* foi identificada no proteoma da região cambial de árvores juvenis (CELEDON et al., 2007) e, neste trabalho, em árvores adultas. Esta foi identificada, no material adulto, juntamente com a enzima *Chalcone synthase*, mas correspondendo ao mesmo *spot* em ambos tecidos. Em análise comparativa da expressão de 25 genes da região cambial desses dois tecidos, Caldas (2007) verificou um nível de expressão cerca de 700 vezes maior nas árvores adultas. A *Alcohol dehydrogenase* também foi encontrada no proteoma da região cambial de tecidos maduros e juvenis de *Pinus.* Neste trabalho, o volume dos *spots* no material adulto, correspondentes à proteína, foram maiores (GION et al., 2005).

Segundo Drew (1997), mudanças metabólicas por anoxia, diminuição da oxigenação, proporcionam uma manutenção das células através da produção de ATP anaerobicamente, minimizando a acidificação do citoplasma associada a morte celular. O oxigênio nas células da região cambial, ao contrário dos tecidos fotossintetizantes, encontra uma barreira física criada pela casca. Dessa forma, o intenso metabolismo heterotrófico a partir do qual é produzida a energia necessária para a manutenção de suas elevadas taxas de crescimento, observadas principalmente durante o crescimento secundário, poderia ser gerado através da fermentação alcoólica (KIMMERER e STRINGER, 1988). Árvores adultas possuem cascas mais espessas e maior densidade da madeira, quando comparadas com árvores juvenis. Assim, como conseqüência, a necessidade de se realizar fermentação alcoólica deve ser maior.

Gartner (1996) levantou a hipótese de que a produção de madeira juvenil é influenciada pela presença de casca fotossintetizante, e que a transição da fase juvenil para a fase adulta ocorre concomitantemente com a transição da casca fotossintetizante para a não fotossintetizante. Segundo Pfanz et al. (2002), o tronco das árvores, com casca fotossintetizante, possuem cloroplastos funcionais nas células do parênquima radial e medular, capazes de utilizar o $CO_2$ interno e a luz incidente para produção de açúcar. Esta re-fixação de $CO_2$ pode compensar em 60-90% a perda de carbono que ocorre durante a respiração, produzindo $O_2$. Se nas árvores adultas a

casca já não pode realizar esse processo, provavelmente o aumento da respiração anaeróbica é necessário, justificando os resultados observados.

A avaliação dos *spots* não evidenciou nenhuma alteração de volume entre os dois materiais, principalmente pela presença de duas proteínas no material de árvores de 22 anos. Certamente a *Alcohol dehydrogenase* deve estar representada em outros *spots*, que ainda não foram identificados.

O metabolismo dos aminoácidos está representado pelas enzimas *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*, envolvida na produção de serina, *Aldehyde dehydrogenase*, envolvida na biossíntese de valina, e pelas enzimas envolvidas no ciclo do metil. As proteínas *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase* e *S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like* estão relacionadas com a síntese de precursores para a formação de metionina. Em plantas, a síntese de metionina e outros aminoácidos está relacionada ao Ciclo do Metil (Figura15), e este é ativado pela enzima *Adenosylhomocysteinase* (MIJNSBRUGGE et al., 2000).

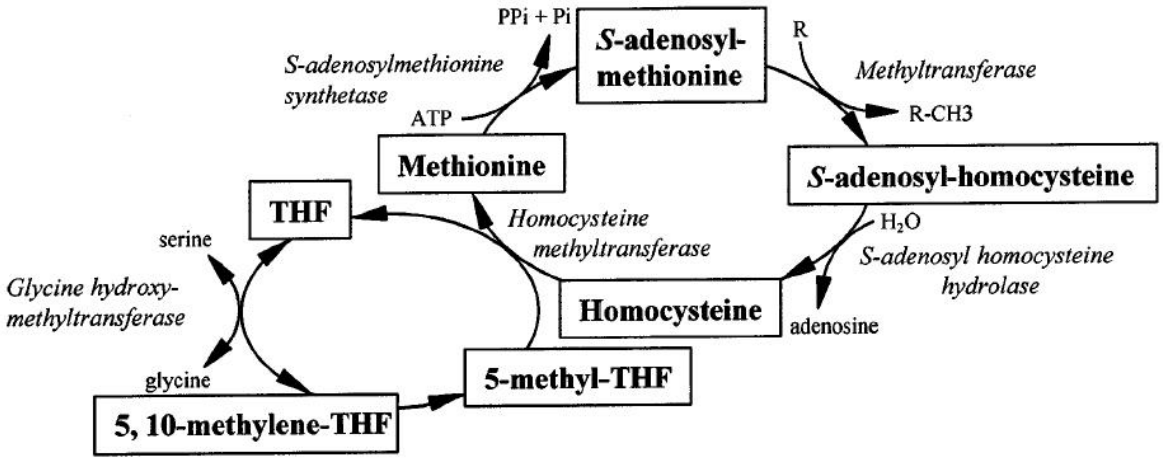


Figura 15 – Ciclo do Metil em plantas (MIJNSBRUGGE et al., 2000)

As proteínas *Chalcone isomerase*, *Chalcone synthase* e *Anthocyanidin synthase* estão envolvidas na síntese de flavonóides e outros compostos do metabolismo secundário. Em perfil transcricional da região cambial de eucalipto avaliado com auxílio da técnica SAGE, Carvalho et al. (2008), observaram que a *tag* mais abundante correspondeu ao RNAm do gene que codifica uma *Isoflavone reductase*. Esse resultado

aponta para uma possível importância da rota de metabólitos secundários para esse tipo de tecido. A enzima *Anthocyanidin synthase* converte a reação do *leucoanthocyanidin* para o pigmento *anthocyanidin*, responsável pelo padrão de coloração da madeira (SAITO e YAMAZAKI, 2002), um importante fator de qualidade da mesma.

A segunda categoria mais abundantemente encontrada foi a de Vias de Informação (30%), representada principalmente pelas proteínas de choque térmico (HSP) e relacionadas à síntese e degradação de cadeias polipeptídicas. As HSPs são também denominadas de chaperonas e exercem papel fundamental na conformação tridimensional de proteínas e conseqüentemente na variedade de atividades e especificidade. Várias proteínas identificadas podem ser relacionadas com à proteólise. *A Ubiquitin-conjugating enzyme* e muitas subunidades do proteossomo são proteínas responsáveis pela sinalização e degradação de cadeias polipeptídicas. As vias de proteólise dependentes de ubiquitinização exercem papel crucial durante o desenvolvimento dos organismos. Especialmente em plantas, já foi demonstrado que a ação de fitoreguladores é dependente dessas vias de proteólise (HELLMANN e ESTELLE, 2002).

A categoria Processos Celulares (11%) reune as proteínas relacionadas à divisão e regulação celular e aos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. As proteínas 14-3-3 têm grande importância na transmissão de sinais; atuam sobre proteínas já fosforiladas e têm a função complementar além da modificação da proteína alvo (FERL, 2004). Sua função na região cambial ainda não foi descrita, mas já foram relatadas no proteoma (CELEDON et al., 2007) e na analise transcricional (CARVALHO et al., 2008) da região cambial de árvores juvenis de eucalipto, o que sugere que estas podem estar relacionadas a processos de desenvolvimento e/ou diferenciação celular. As proteínas envolvidas na transdução de sinais estão representadas pela *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), uma quinase, e pela *Soluble inorganic pyrophosphatase*. As MAPK são proteínas quinase-receptoras, responsáveis pela ativação de diversas cascatas de sinalização, principalmente em resposta a estresses bióticos e abióticos (LI et al., 2007).

Proteínas com função na divisão celular também foram identificadas. As TCTP (*Translationally controlled tumor protein-like protein*) são proteínas importantes no crescimento e divisão celular, muitas vezes relacionadas à estabilização dos microtúbulos. Em ervilha, a expressão desta proteína foi observada em células da ponta de raízes em divisão (WOO e HAWES, 1997) e em eucalipto, a expressão de três genes de proteínas TCTP na região cambial sugere que esta, desempenha papel importante nesse tecido (CARVALHO et al., 2008). As proteínas CDC (*Putative spindle disassembly related protein CDC48*) são proteínas quinases dependentes de ciclina que desempenham função regulatória e interagem com proteínas SNAREs especializadas no transporte de vesículas para deposição da parede celular. A proteína *Cell division protein FtsZ* é essencial ao processo de divisão celular, e é responsável pela organização da região de formação do septo da divisão.

Duas das proteínas identificadas têm função de defesa contra estresses. A *Ascorbate peroxidase* está relacionada ao estresse oxidativo, e a *Vicilin precursor*, um peptídeo antimicrobiano, está relaciona a proteção contra patógenos, principalmente bactérias e fungos (MARCUS et al., 1999).

Na categoria Estrutura e Organização da Estrutura (11%) foram identificadas as proteínas mais importantes para a biossíntese de madeira, principalmente aquelas responsáveis pela organização do citoesqueleto e as relacionadas ao metabolismo da parede celular. O citoesqueleto é formado por microtúbulos e filamentos de actina, gerados a partir das proteínas tubulinas e actinas, respectivamente (DROBAK et al., 2004). As *Tubulin Alpha* e *Beta chain* e a *Actin-depolymerizing factor 4* foram identificadas na região cambial de arvores adultas de eucalipto. A deposição padronizada de microfibrilas de celulose na parede celular secundária é um dos principais eventos do desenvolvimento das células do xilema, sendo preciso e dinamicamente regulado pelo citoesqueleto (ODA e HASEZAWA, 2006).

As principais proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular foram a *Adenylyl cyclase associated protein*, envolvida no processo de elongação das fibras (KAWAI et al., 1998); *Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]*, uma proteína se-wap41 associada ao complexo de Golgi, que está relacionada à formação dos plasmodesmas (SAGI et al., 2005), *UDP-glucose dehydrogenase* (UGDH), envolvida na

biossíntese de hemiceluloses (LABATE et al., 2008) e a *Caffeoyl-CoA O-methyltransferase* (CCoAOMT), envolvida na biossíntese de lignina (COSTA et al., 1999).

A categoria Transporte (2%) foi pouco representada pelas proteínas identificadas, o que não significa que tenha menor importância para as células do tecido estudado. As proteínas *GDP dissociation inhibitor* e *Ras small GTPase* estão relacionadas ao transporte de vesículas, muito importantes no processo de formação de madeira, uma vez que, os polissacarídeos da parede celular sintetizados no complexo de Golgi e os complexos protéicos envolvidos na síntese de celulose são exportados através de vesículas.

Como as identificações são feitas através de buscas em banco de dados e nestes, grande parte das seqüências são depositadas a partir de projetos de sequênciamento de ESTs, algumas proteínas encontradas eram seqüências até então hipotéticas, e foram classificadas como sendo da categoria Sem Função Definida (10%).

### 4.5 Proteínas envolvidas com a xilogênese

A xilogênese ocorre através de cinco eventos seqüenciais: divisão celular, elongação, biossíntese da parede celular, lignificação e morte celular programada (CHAFFEY, 2002), cada uma caracterizada pela expressão de proteínas específicas e que determinarão as propriedades da madeira.

#### 4.5.1 Divisão celular

Os monômeros de actina e tubulina, componentes esseciais do citoesqueleto, podem ser polimerizados e despolimerizados (TAIZ e ZEIGER, 2004). Muitas proteínas como a *Actin-depolymerizing factor 4* são responsáveis pela manutenção do equilíbrio dinâmico entre as formas polimerizadas e despolimerizadas. Os microtúbulos são formados a partir da polimerização das proteínas *Tubulin Alpha* e *Beta chain* e junto aos microfilamentos de actina, desempenham papel fundamental no ciclo de vida das células, principalmente ao se condensarem no eixo de divisão celular e formarem o fragmoplasto. Essa estrutura originará as paredes celulares das células-filhas e

delimitará a formação da lamela média, o que pode explicar a identificação de proteínas regulatórias como a *Cell division protein FtsZ.* A

A auxina (IAA) é o principal fitoregulador envolvido no crescimento cambial e no desenvolvimento do sistema vascular (UGGLA, 1996). O padrão de divisão e diferenciação celular é coordenado por um gradiente de auxina, e como já mencionado, a ação de fitoreguladores é dependente de vias de proteólise. Paux et al. (2004) demonstraram, durante a formação da madeira em eucalipto, que a sinalização por auxina é dependente de proteólise via ubiquitinina, o que explica a identificação da *Ubiquitin-conjugating enzyme* e muitas subunidades do proteossomo no tecido estudado.

Muitas proteínas identificadas são expressas de forma diferencial no momento da citocinese celular. E é nesse momento que se formam os plasmodemos, interligações da membrana plasmática entre duas células vizinhas, que facilitam o transporte de substâncias entre a parede celular. Uma vez que, a grande maioria das células vegetais é interconectada dessa maneira, os citoplasmas formam um *continuum*, denominado simplasto (TAIZ e ZEIGER, 2004). A *Alpha-1,4-glucan-protein synthase*, identificada no tecido estudado, é uma proteína plasmodesmo-associada e exerce função no direcionamento de vesículas de deposição de polissacarídeos a partir do complexo de Golgi. As proteínas CDC, como já mencionado, também desempenham função regulatória no transporte de vesículas para deposição da parede celular.

A *T-complex protein 1 epsilon subunit*, também chamada de complexo CCT, é uma chaperona de alto peso molecular, que em animais foi melhor caracterizada e está relacionada à afinidade entre actina e tubulina na formação do citoesqueleto (STERNLICHT et al., 1993). Em coleóptilo de milho, observou-se a deposição pronunciada de CCT em regiões de arranjos de microfibrilas (HIMMELSPACH et al., 1997). Já em tabaco, NICK et al. (2000) sugeriram que a CCT desempenha um papel no controle espacial da deposição da parede celular, em especial na região do fragmoplasto durante a citocinese. A identificação desta proteína na região cambial de árvores de eucalipto juvenis (CELEDON et al., 2007) e nesse trabalho, em árvores adultas, desperta para a necessidade de uma melhor caracterização funcional desta proteína.

### 4.5.2 Elongação

O processo de elongação celular que ocorre durante a xilogênese tem despertado o interesse de pesquisadores e da indústria de papel e celulose uma vez que através deste é definido o tamanho das células do xilema, incluindo as fibras. Uma fibra de madeira de *E. grandis* em fase juvenil de desenvolvimento tem a metade do comprimento de uma fibra produzida por uma árvore adulta (TOMAZELLO FILHO, 1985).

A elongação ocorre na parede primária das células através de enzimas de modificação que "remodelam" a rede de polissacarídeos e proteínas que a compõem, permitindo assim, a inclusão de novos componentes. A reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto é, provavelmente, mediada por proteínas ligadas às actinas. Este processo, que pode levar alguns minutos ou horas, depende do estímulo e do tecido envolvido (BARRERO et al., 2002). Ranachandran et al. (2000) observaram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* com baixa expressão da proteína actina-associada *Profilin* apresentavam tamanhos reduzidos quando comparadas aos controles selvagens. Ji et al. (2003) observaram que esta proteína era ativada durante a elongação das fibras de algodão. Apesar de várias destas proteínas já serem conhecidas, o mecanismo preciso de regulação do processo de elongação e divisão celular não é totalmente entendido.

A *Adenylyl cyclase associated protein* (CAP), encontrada na região cambial de árvores adultas de eucalipto, foi clonada a partir do cDNA de *Gossypium hirsitum* (KAWAI et al, 1998) e utilizada para a superexpressão de um gene ortólogo de *Arabidopsis* (BARRERO et al., 2002). A superexpressão da *Adenilil CAP* em plantas transgênicas de *Arabidopsis* causou alterações morfológicas associadas ao decréscimo do número e tamanho de células das folhas. O resultado foi confirmado com a análise de células de tabaco em cultura de suspensão, no qual a superprodução da *Adenilil CAP* foi correlacionada à perda de filamentos de actina, que resultou na interrupção da divisão celular (BARRERO et al., 2002). Esses resultados e a presença desta proteína na região cambial de eucalipto sugerem que esta enzima desempenha uma função essencial na regulação dos filamentos de actina e, conseqüentemente, na elongação das células do xilema.

### 4.5.3 Biossíntese da parede celular

A síntese dos polissacarídeos que compõem a parede celular primária e secundária é realizada a partir do precursor comum UDP-D-glicose, o qual pode ser convertido para a síntese de hemiceluloses e pectinas ou celulose. Hemiceluloses e pectinas representam cerca de 65% da parede primária e 26-36% da parede secundária (MELLEROWICZ et al., 2001) e a síntese de seus polissacarídeos é resultante de uma série de reações de desidrogenação, descarboxilação e epimerização que utilizam nucleosídeos 5'-açúcar-difosfato (NDPs) a partir de UDP-D-glicose (REITER e VANZIN, 2001).

A biossíntese de hemiceluloses e pectinas em plantas superiores é principalmente regulada pela enzima *UDP-glucose desidrogenase* (UGDH), através da oxidação do UDP-D-glicose em UDP-D-glucuronato (AMINO et al., 1985; GIBEAUT, 2000), este último, importante precursor para a síntese de muitos NDPs como o UDP-D-xilose, UDP-D-galacturonato e UDP-D-arabinose (Figura 16).

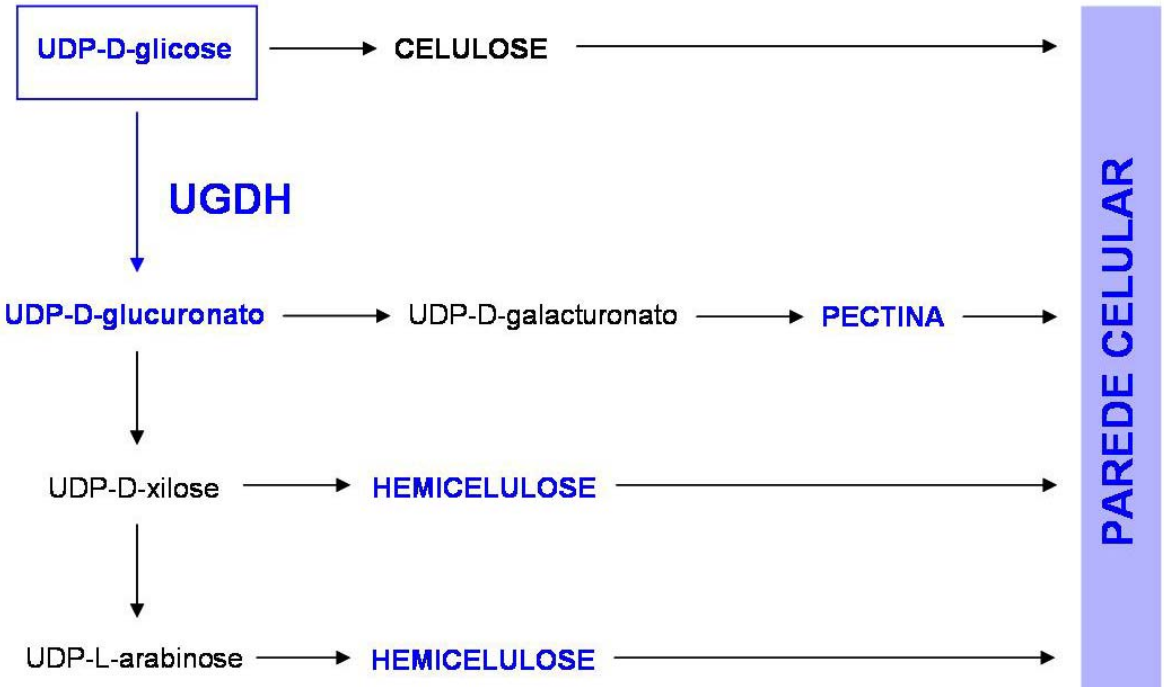


Figura 16 - Biossíntese de hemiceluloses e pectina a partir da conversão do UDP-D-glicose em UDP-D-glucuronato pela UGDH

As paredes celulares de *Arabidopsis thaliana* contêm grandes proporções de pectinas e hemiceluloses derivadas de UDP-D-glucuronato (ZABLACKIS et al., 1995). Analisando a família de genes da UGDH nesta espécie, Klinghammer e Tenhaken (2007) demonstraram a existência de quatro isoformas, assim como as propriedades bioquímicas de cada uma delas. Esses resultados revelam uma grande afinidade entre a enzima e o substrato UDP-D-glicose, sugerindo a sua importância na regulação do fluxo de carbono para a produção dos carboidratos da parede celular.

Gahan et al. (1997) e Johansson et al. (2002) observaram uma alta correlação entre a atividade da enzima UGDH com o desenvolvimento das células do xilema do meristema cambial de árvores. Em *Populus*, entre as três isoformas da UGDH presentes, somente uma é ativada durante a formação da parede celular secundária (HERTZBERG et al., 2001; JOHANSSON et al., 2002).

No presente trabalho, quatro *spots* apresentaram similaridade com a UGDH indicando uma possível existência de 4 isoformas da proteína (Figura 17). Dessa forma, o resultado encontrado sugere que a enzima UGDH exerce um papel fundamental na formação e qualidade da madeira de eucalipto (LABATE et al., 2008).

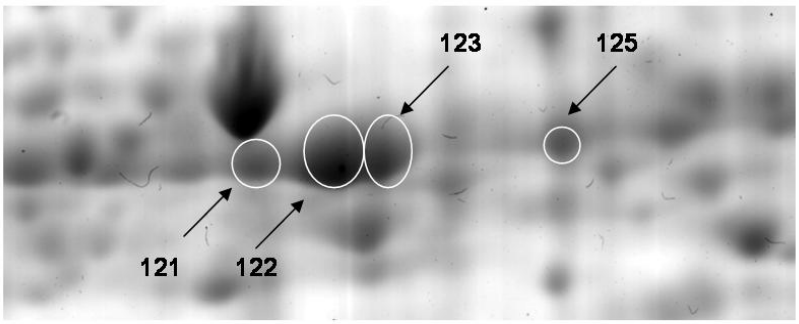


Figura 17 - Imagem ampliada do gel bidimensional da região cambial de árvores de eucalipto com 22 anos. Spots 121, 122, 123 e 125 referentes à proteína UGDH

Uma *glycine-rich protein* foi identificada na região cambial de árvores adultas de eucalipto. Zhang et al. (2003), utilizando a análise de microarranjo de cDNA de *Pinus*, listaram vários genes candidatos que possivelmente participariam da formação da parede celular durante a diferenciação do xilema secundário. Neste trabalho, seis proteínas parede celular-associadas, incluindo três arabinogalactanas (AGP) foram

identificadas e, dentre as AGPs, duas proteínas foram relacionadas ao grupo das *glycine-rich protein*. As AGP representam 40% das proteínas da parede celular de *Pinus* (GION et al., 2005). Loopstra e Sederoff (1995) observaram que algumas AGPs são preferencialmente expressas durante a diferenciação do xilema, sugerindo que estas proteínas participam no processo de formação do sistema vascular.

Na análise do transcritoma da região cambial de árvores juvenis de *E. grandis* a segunda *tag* mais expressa representa um EST com alta similaridade a uma proteína AGP de *Populus Pop14a9* (CARVALHO et al., 2008; CALDAS, 2007). Yang et al. (2005) analisaram a expressão de 11 AGPs e *AGP-like genes* de *Pinus taeda*, em diferentes tecidos e condições, e mostraram que o padrão de expressão desses genes era variável, sugerindo diferentes funções para cada AGP. A AGP de *Pinus* similar à *Pop14a9* foi altamente e preferencialmente expressa no xilema em diferenciação quando comparada em outros tecidos.

### 4.5.4 Lignificação

As ligninas exercem grande importância no mecanismo de defesa das plantas e conferem resistência à madeira (AYRES e LOIKE, 1990). Aproximadamente 19 a 20% da parede celular de células maduras do xilema de *Populus* correspondem à lignina (MACDOUGALL et al., 1993). Os polímeros fenólicos da lignina são formados a partir da polimerização de três diferentes álcoois hidroxicinamoil ou monolignóis (ρ-coumaril, coniferil e sinapil), os quais dão origem às subunidades do polímero de lignina H, G e S, respectivamente (CALDAS, 2007).

A CCoAOMT, encontrada na região cambial de árvores adultas de eucalipto, é uma enzima chave na produção dos molignóis, metilando Cafeil-CoA que sintetiza Feruloil-CoA, precursor do polímero G. A importância dessa rota, catalizada pela CCoAOMT, foi demonstrada através da repressão dessa enzima em plantas transgênicas de tabaco e *Populus sp*, que apresentaram alterações na relação S/G de lignina, o que resultou em uma significativa redução do seu conteúdo total (ZHONG et al., 1998; ZHONG et al., 2000). A proteína CCoAOMT foi identificada como uma das mais abundantes durante a diferenciação do xilema em *Populus* (MIJNSBRUGGE et al.,

2000), e na região cambial de eucalipto, o gene desta enzima foi o de maior expressão dentre todos na via de biossíntese de lignina (CARVALHO et al., 2008) (Figura 18).

A adição de grupos metil em posições específicas dos monolignóis leva a um grande consumo desses grupamentos nas células do xilema durante a lignificação. Para isso, tanto na reação catalisada pela COMT quanto na reação catalisada pela CCoAOMT, a S-adenosilmetionina (SAM) é utilizada como doadora de grupos metil (CANTÓN et al., 2005). Apesar de serem consideradas enzimas do tipo *housekeeping*, envolvidas na síntese de aminoácidos, as proteínas do ciclo do metil vêm sendo encontradas no xilema durante o crescimento secundário em *Populus spp*, *Arabidopsis thaliana* entre outras espécies (STERKY et al., 1998; MIJNSBRUGGE et al., 2000; OH et al., 2003; JUAN et al., 2006). Dessa forma, a *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase* e a *Adenosylhomocysteinase* envolvidas no ciclo de produção da SAM, encontradas neste trabalho, podem estar sendo expressas para garantir as altas taxas de lignificação que são observadas durante o crescimento secundário.

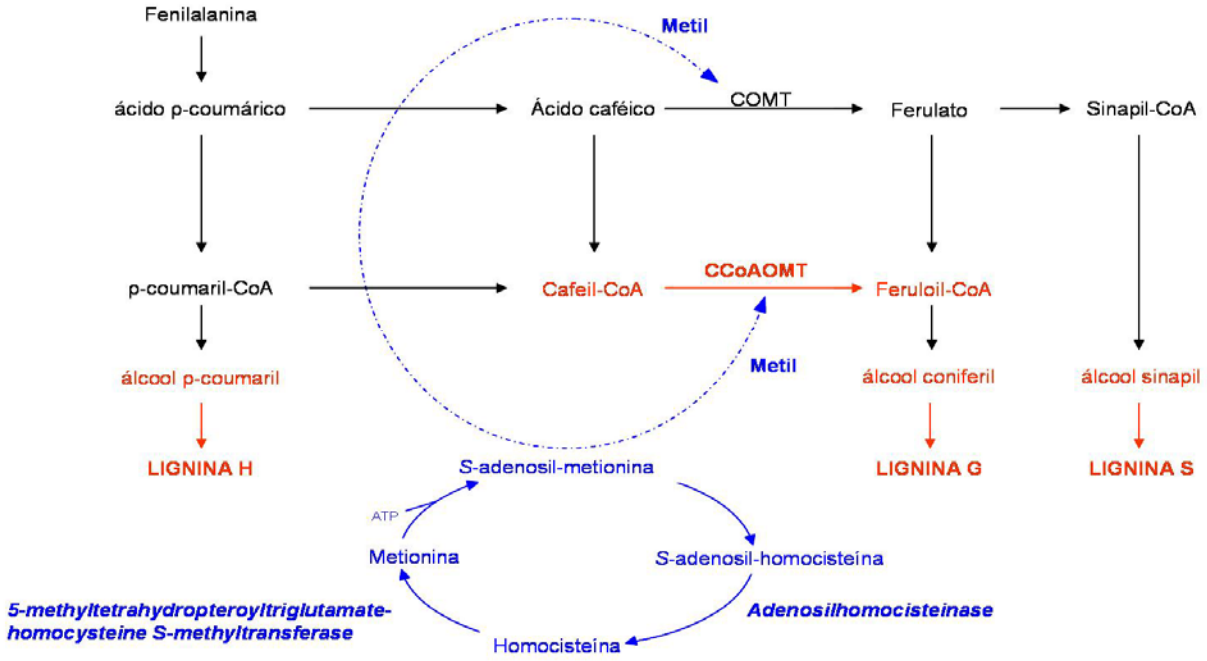


Figura 18 - Via de biossíntese de ligninas. Em vermelho, a metilação do Cafeil-CoA em Feruloil-CoA pela CCoAOMT, e os polímeros de lignina e seus precursores. A rota em azul corresponde ao ciclo de produção do S-adenosilmetionina, principal doador de grupos metil para a via de biossíntese de lignina

### 4.5.5 Morte celular programada

Moreau et al. (2005) estudaram a morte celular programada (PCD) em células de fibras do xilema de *Populus*, e correlacionaram esse a uma série de genes de autólise celular em plantas, muitos também encontrados na análise transcricional da região cambial de eucalipto (CARVALHO et al., 2008). Apesar da identificação de diversos genes relacionados à PCD de fibras do xilema, o mecanismo pelo qual essa ocorre ainda não foi descrito.

Groover e Jones (1999) propuseram um modelo para diferenciação de elementos traqueais e sugeriram que há uma atividade coordenada entre a síntese da parede celular e a PCD. Segundo esse modelo, durante a síntese da parede secundária ocorre também um acúmulo de nucleases, proteases e fosfatases ácidas no vacúolo da célula, que sofre aumento de seu tamanho. Ao mesmo tempo, há a produção de enzimas hidrolíticas como as Serina proteases, o que leva a um aumento da atividade proteolítica na matriz extracelular. Com a degradação da parede celular e conseqüente colapso do vacúolo pelo influxo de $Ca^{2+}$ da matriz para o interior da célula, as proteases acumuladas são liberadas e a célula entra em processo de PCD.

Uma *serine carboxypeptidase* foi identificada na região cambial de eucalipto. A cisteína protease foi a mais expressa em análise de mRNAs transcritos no mesmo tecido (CARVALHO et al., 2008) e a presença de uma proteína *cysteine proteinase inhibitor*, na análise proteômica, sugere uma possível regulação dessas proteínas e conseqüentemente da PCD.

As *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) de plantas pertencem a subfamília de quinases reguladas por sinais extracelulares (LI et al., 2007). Essas proteínas são ativadas em resposta a diversos tipos de estresse como infecção por patógenos, injúrias, déficit hídrico, salinidade, irradiação por UV e espécies reativas de oxigênio (TENA et al., 2001; ZHANG e KLESSIG, 2001). Muitos trabalhos demonstram o involvimento das MAPK com a PCD em plantas (LIGTERINK et al., 1997; YANG et al., 2001; KROJ et al., 2003).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da técnica de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas permitiu a identificação de 99 *spots*, correspondendo a 82 proteínas diferentes. Muitas das proteínas encontradas estão relacionadas à xilogênese em eucalipto, demonstrando a eficiência do tipo de amostragem utilizada no trabalho, o que possibilitou a inferência de futuros pontos de estudo da regulação do processo de formação da madeira.

A presença de vários *spots* que correspondem a uma mesma proteína indica que a expressão de isoformas pode participar nos mecanismos de controle da biossíntese de parede celular e, conseqüentemente, da formação da madeira. A enzima UDP-glicose desidrogenase (UGDH), identificada em quatro *spots*, já havia sido clonada de *Eucalyptus grandis* e a proteína expressa em *E. coli*, em trabalhos anteriores realizados no Laboratório MAX FEFFER de Genética de Plantas. Os resultados obtidos pela clonagem e expressão da UGDH e a identificação das possíveis isoformas no proteoma de árvores adultas foram utilizados para elaboração do *paper* intitulado *Cloning and functional characterization of cDNA encoding Eucalyptus grandis UDP-glucose dehydrogenase*, submetido à *Functional Plant Biology* (LABATE et al., 2008).

Devido à quebra do equipamento, um total de 100 *spots* não pôde, ainda, ser seqüenciado, o que limitou a identificação de outras proteínas. A utilização de técnicas complementares como a separação por cromatografia multidimensional (*shot gun*) será também incorporada de forma a se aprimorar as análises. No futuro, novas identificações da região cambial de árvores juvenis e uma comparação entre os géis bidimensionais dos dois materiais serão conduzidas para um melhor entendimento dos processos de formação e qualidade da madeira de eucalipto.

**REFERÊNCIAS**

ABE, H.; FUNADA, R.; THTANI, J.; FUKAZAWA, K. Changes in tha arrangement of cellulose microfibrils associated with the cessation of cell spansion in tracheids. **Trees**, Berlin, v. 11, p. 328-332, 1997.

AYRES, D. S. AND LOIKE, J. D. (Ed). **Lignans:** chemical, biological and clinical properties (Chemistry and Pharmacology of natural Products). Cambridge:Cambridge University Press, 1990. 422 p.

AMINO, S.; TAKEUCHI, Y.; KOMAMINE A. Changes in enzyme activities involved in formation and interconversion of UDP-sugars during the cell cycle in a synchronous culture of Catharanthus roseus. **Physiologia Plantarum**, cidade, v. 64, p. 111–117, 1985.

ANDRADE, E.N. **O Eucalipto**. 2.ed. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. UFV, Viçosa, 2004.

ASSIS, T.F. Hibridação na Acesita Energética S.A. In: Simpósio sobre Tendências do Desenvolvimento Florestal Brasileiro. **IPEF,** Piracicaba, p. 21-38, 1985.

BARRERO, R.A.; UMEDA, M.; YAMAMURA, S.; UCHIMIYA, H. *Arabidopsis* CAP regutates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division. **The Plant Cell**, v. 14, p. 149-163, 2002.

BRACELPA. **Desempenho do setor em 2006 e projeção para 2007 (revisão agosto 2007)**. Disponível em: <www.bracelpa.com.br> . Acesso em: 23 nov. 2007.

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

BRASIL, M.A.M.; FERREIRA, M. Características das fibras de madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden, aos 3 anos de idade. **IPEF,** Piracicaba, n. 19, p. 80-97, dez. 1979.

BRIGATTI, R.A.; FERREIRA, M.; BEIG, O.; FREITAS, M. Polinização controlada em *Eucalyptus urophylla* - um programa desenvolvido pela Champion Papel e Celulose S.A. **Silvicultura,** São Paulo, v. 8, n. 28, p. 213-215, 1983.

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

BROWNING, B.L. **The Chemistry of Wood.** New York, John Wiley, 1963. p. 689.

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.

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

CANTÓN, F. R; SUÁREZ, M. F.; CÁNOVAS, F. M. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 83, p. 265-278, 2005.

CALDAS, D.G.G. **Análise do transcritoma da região cambial de *Eucalyptus grandis* e a identificação de genes diferencialmente expressos em árvores juvenis e adultas.** 2007.152 p**.** Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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.

CARVALHO, M. C. C. G. ; CALDAS, D.G.G. ; CARNEIRO, R. T. ; MOON, D. H. ; SALVATIERRA, G. R. ; FRANCESCHINI, L. M. ; ANDRADE, A. ; CELEDON, P. A. F. ; ODA, S. ; LABATE, C. A. . SAGE transcript profiling of Eucalyptus grandis juvenile cambial region. **Tree Physiology**, v. 28, in print, 2008.

CATESSON, A.M. Specific characters of vessel primary walls during the early stages of wood differentiation**. Biology of the Cell,** Bethesda, v. 67, p. 221-226, 1989.

CELEDON, P.A.F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K.G.X.; CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.G.; MOON, D.H.; CARNEIRO, R.T.; FRANCASCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2258-2274, 2007.

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, Abr. 2002.

CHAMRAD DC, KOERTING G, GOBOM J, THIELE H, KLIOSE J, MEYER HE, BLUEGGEL M. Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics. **Analitics Bioanalitics Chemistry,** v.376, n.7, p.1014-1022, 2003.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics,** Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.

CORTHALS, G.L.; WASINGER, V.C.; HOCHSTRASSER, D.F.; SANCHEZ, J.C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. **Electrophoresis,** New York, v.21, p.1104-1115, 2000.

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,** New York, v.20, p.1098-1108, 1999.

COZZO, D. **Eucalyptus y eucaliptotecnia**. Buenos Aires: El Atenero Editorial, 1955. 393 p.

CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. **Planta**, Berlin, v. 125, p. 87-90, 1975.

DREW, M.C. Oxygen deficieny and root metabolism: injury and acclimatation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Berkeley, v.48, p.223-250, 1997.

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

EVANS II, J.W.; SENFT, J.F.; GREEN, D.W. Juvenile wood effect in red alder: analysis of fhysical and mechanical data to delineate juvenile and mature wood zones. **Forests Products Journal,** Madison, v.50, n.7/8, p.75-87, 2000.

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

FENN, J.B.; MANN, M.C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomoelcules. **Sciences**, Washington, v.246, p.64-71, 1989.

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

FERREIRA, S.; HJERNO, K.; LARSEN, M.; WINGSLE, G.; LARSEN, P.; FEY, S.; ROEPSTORFF, P.; PAIS, M.S. Proteome Profiling of *Populus euphratica* Oliv. Upon Heat Stress. **Annals of Botany**, Oxford,v. 98, p. 361-377, 2006.

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

FLADUNG,M.; BOSSINGER, G.; ROEB, G.W.; SALAMINI, F. Correlated alterations in leaf and flower morphology and rate of leaf photosynthesis in a *midribless* (mbl) mutant of *Panicun maximum* Jaq**. Planta,** Berlin, v. 184, p. 356-361, 1991.

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

FUNADA, R. Control of wood structure. In: NICK, P. (Ed.). **Plant Microtubules,** Berlin:Springer-Verlag, 2000. p.51-82.

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

GAHAN, P.B.; MCGARRY, A.; WANG, L.; DORE, T.; CARMIGNAC, D.F. Glucose-6-phosphate and UDP-D-glucose dehydrogenases: possible markers of vascular differentiation. **Phytochemical Analysis**, Baffins Lane Chichester, v. 8, p. 110–114, 1997.

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

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; KLEINER, O.;BROWN, L.R.; DRUKIER, A.K. Perspectives in spicing up proteomics with splicing. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 699-709, 2005.

GOFFNER, D.; JOFFROY, I.; GRIMA-PETTENATI, J.; HALPING, C.; KNIGHT, M.E.; SCHUCH, W.; BOUDET, A.M. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl acohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. **Planta**, Berlin, v. 188, n.1, p. 48-49, Aug. 1992.

GONZALEZ, E.R.; de ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFAVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, n. 1, p. 97-102, 2002.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with imobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis,** New York, v.20, p.712-717, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, J.R. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, Otawa, 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.

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

HELLMANN, H.; ESTELLE, M. Degradation Plant Development: Regulation by Protein. **Science**, Washington, v. 297, p. 793-797, 2002.

HESSE, D.; JAHN, O. **Colloidal Coomassie Staining.** Proteomics Group, Max Planck Institute for Experimental Medicine, 2004. Disponível em:<www.proteomics.em.mpg.de> Acesso em 10 dec. 2007

HERBERT, B.; GALVANI, M.; HAMDAN, M.; OLIVIERI, E.; MACCARTHY, J.; PEDERSEN, S.; RIGHETTI, P.G. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when and how?. **Electrophoresis**, New York, v.22, p.2046-2057, 2001.

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

HIMMELSPACH, R.; NICK, P.; SCHIFER, E.; EHMANN, B. Developmental and light-dependent changes of the cytosolic chaperonin containing TCP-1 (CCT) subunits in maize seedlings, and the localization in coleoptiles. **The Plant Journal**, Oxford, v.12, p.1299-1310, 1997.

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

JI, S.J.; LU, Y.C.; FENG, J.X.; WEI, G.; LI, J.; SHI, Y.H. Fu, Q.; Liu, D.; Luo, J.C.; Zhu, Y.X. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, p. 2534-2543, 2003.

JOHANSSON, H.; STERKY, F.; AMINI, B.; LUNDEBERG, J.; KLECZKOWSKI, L.A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose

dehydrogenase, a key enzyme in hemicellulose/pectin formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1576, p. 53–58, 2002.

JORGE, I; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D., PORRAS, C. JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 222-234, 2005.

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

KAGEYAMA, P.Y. **Variação genética em progenies 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. **Analytical Chemistry**, Washington, v.60, p.2299-2301, 1988.

KAWAI, M.; AOTSUKA, S.; UCHIMIYA, H. Isolation of a cotton CAP gene: a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed dutin fiber elongation. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 39, p. 1380-1383, 1998.

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

KLINGHAMMER, M.; TENHAKEN, R. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls**. Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3609-3621, 2007.

KIMMERER, T.W**.;** STRINGER, M.A**.** Alcohol Dehydrogenase and Ethanol in the Stems of Trees: Evidence for Anaerobic Metabolism in the Vascular Cambium. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 87, n. 3, p. 693-697, July, 1988.

KROJ, T.; RUDD, J.J.; NURNBERGER, T.; GABLER, Y.; LEE, J.; SCHEEL, D. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burstindependent expression of pathogenesis-related genes in parsley. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 2256–2264, 2003.

LABATE, M.T.V.; BERTOLO, A.L.F; NASCIMENTO, D.D.; GUTMANIS, G.; ANDRADE, A.; RODRIGUES, M.J.C.; CAMARGO, E.L.O.; BOARETTO, L.F.; BRAGATTO, J.; CONTI, G.; LABATE, C.A. Cloning and functional characterization of cDNA encoding Eucalyptus grandis UDP-glucose dehydrogenase. **Functional Plant Biology** (Submitted in dec. 2007), 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly fo the head of bacteriophage T4 **Nature**, London,v.277, p.680-685, 1970.

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

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

LI, S.; SAMAJ, J.; E. FRANKLIN-TONG, V.E. A Mitogen-Activated Protein Kinase Signals to Programmed Cell Death Induced by Self-Incompatibility in *Papaver* Pollen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 236-245, 2007.

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**, New York, v.5, p.461-473, 2005.

LIGTERINK, W.; KROJ, T.; NIEDEN, U.; HIRT, H.; SCHEEL, D. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. **Science**, Washington, v. 276, p. 2054–2057, 1997.

LOOPSTRA, C.A.; SEDEROF, R.R. Xylem-specific gene expression in loblolly pine. **Plant Molecular Biology,** New York, v.27, p.277-291, 1995.

MACDOUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R. Plant fibers: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 62, p. 1683-1691, 1993.

MACKNIGHT, R.; DUROUX, M.; LAURIE, R.; DIJKWEL, P.; SIMPSON, G.; DEAN, C. Functional significance of the alternative transcript processing of the Arabidopsis floral promoter FCA. **Plant Cell** Rockville, v. 14, p. 877–888, 2002.

MALLAN, F.A. *Eucalyptus* improvement for lumber production. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE UTILIZAÇÃO DA MADEIRA DE EUCALIPTO PARA SERRARIA, São Paulo, IPEF/IPT, **Anais…**, São Paulo, IPEF/IPT, 05-06 abr., 1995. p. 1-19.

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

MARCUS, J.P.; GREEN, J.L.; GOULTER, K.C.; MANNERS, J.M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **The Plant Journal**, Oxon, v. 19, n.6, p. 699-710, 1999.

MARTINS, F.C.G.; IKEMORI, Y.K. Produção de híbridos de eucalipto na Aracruz. In: Reunião sobre Técnicas para Produção de Híbridos, Anais**. IPEF**, Piracicaba, p. 48-60, 1987.

MATHESIUS, U.; KEIJZERS, G.; NATERA, S.H.A.; WINMAN, 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**, Berlin, v. 1, p. 1424–1440, 2001.

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

MEGRAW, R.A. **Wood Quality Factors in Loblolly Pine**: the influence of tree age, position in tree, and cultural practice on wood specific gravity, fiber length, and fibril angle. TAPPI Press, Atlanta, GA, 1985. 89 p.

MEIRELES, K.G.X. **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa.** 2006. 117p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

MENK, A.L. de M.; ODA, S.; VENKOVSKY, 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.; MEYERMANS, H.; VAN MONTAGU, M.; BAUW, G.; BOERJAN, W. Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. **Planta**, Berlin, v. 210, n. 4, p. 589-598, 2000.

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

MOREAU, C.; AKSENOV, N.; LORENZO, M. G.; SEGERMAN, B.; FUNK, C.; NILSSON, P.; JANSSON, S.; TUOMINEN, H. A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of *Populus* trees. **Genome Biology,** London, v. 6, n. 4, p. 1-14, 2005.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; PARDOWITZ, I.; AROLD, N. ET AL. **Electrophoresis**, v. 11, p.101-117, 1990.

NICK, P.; HEUING, A.; EHMANN, B. Plant chaperonins: a role in microtubule-dependent wall formation? **Protoplasma**, Leipzig, v.211, p.234-244, 2000.

ODA, Y.; HASEZAWA, S. Cytoskeletal organization during xylem cell differentiation. **Journal of Plant Research,** Tokyo, v. 119, p. 167-177, 2006.

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

OH, S.; PARK, S.; HAN, K. Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana.* **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 393, p. 2709-2722, 2003.

OLIVEIRA, J.T.S.; HELLMEISTER, J.C.; TOMAZELLO FILHO, M. Variação do teor de umidade e da densidade básica na madeira de sete espécies de eucalipto. **Revista Árvore,** Viçosa, v. 29, n. 1, p. 115-127, 2005.

PAUL, W.; STEINWEDEL, H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. **Zeitschrift für Naturforschung**, Weisbaden, v.8A, p.448-450, 1953.

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

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.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by serarching sequences databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v.20, n.18, p.6551-6567, 1999.

PERSPECTIVAS do setor florestal brasileiro. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 75, ano 13, ago. 2003. Disponível em: http://www.remade.com.br/revista > Acesso em 17 jun. 2007.

PFANZ, H.; ASCHAN, G.; LANGENFELD-HEYSER, R.; WITTMANN, C.; LOOSE, M. Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis. **Die Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 147-162, 2002.

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

PLOMION, C.; LALANNE, C.; CLAVEROL, S.; MEDDOUR, H.; KOHLER, A.; BOGEAT-TRIBOULOT, M.; BARRE, A.; PROVOST, G.L.; DUMAZET, H.; JACOB, D.; BASTIEN, C.; DREYER, E.; DARUVAR, A.; GUEHL, J.; SCHMITTER, J.; MARTIN, F.; BONNEU, M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of droughtstress responsive proteins. **Proteomics**, Weinheim, v.6,p. 6509–6527, 2006

PLUMPTRE, R.A. ***Pinus caribaea* Vol II Wood properties***.* Trop For Pap 17 Commonw for Inst., Oxford Univ., 1983. 145 p.

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

RAMACHANDRAN, S.; CHRISTENSEN, H.E.M.; ISHIMARU, Y.; DONG, C.H.; WEN, C.M.; CLEARY, A.L.; CHUA, N.H. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance and flowering in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1637–1647, 2000.

REITER, W.; VANZIN, G. F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversions pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 47, p. 95-113, 2001.

REZENDE, G.D.S.P. O eucalipto Aracruz. Disponível em: <http://www.aracruz.com.br/show_press.do?act=stcNews&id=35&lastRoot=10&lang=1> Acesso em 15 dez. 2007.

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

ROBERTS, G. C.; SMITH, C. W. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. **Current Opinion Chemical Biology,** London, v. 6, p. 375–383, 2002.

ROGERS, M.; GRAHAM, J.; TONGE, R.P. Using statistical image models for objective evaluation of *spot* detection in two-dimensional gels. **Proteomics,** New York, v.3, p.879-886, 2003.

RUBINFELD, A.; KEREN-LEHRER, T.; HADAS, G.; SMILANSKY, Z.. Hierarchical analysis of large-scale two-dimensional gel electrophoresis experiments. **Proteomics,** New York, v.3, p.1930-1935, 2003.

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

RUSSEL, S.A.; OLD, W.; RESING, K.A.; HUNTER, L. Proteomic informatics. **International Review of Neurobiology**, San Diego, v.61, p. 127-157, 2004.

SAGI, G.; KATZ, A.; GUENOUNE-GELBART, D.; EPEL, B.L. Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the golgi apparatus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1788-1800, 2005.

SAITO, K.; YAMAZAKI, M. Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. **New Phytologist**, Oxon, v. 155, p. 9-23, 2002.

SARAVAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic anlysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics,** New York, v.4, p.2522-2532, 2004.

SHYMOYAMA, V.R. **Variações da densidade básica e características anatômicas e químicas da madeira em *Eucalyptus* spp.** 1990. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA – SBS. **Re: Área plantada com eucalipto**. Diretoria SBS. <www.sbs.org.br>. Acesso em: 18 mar. 2006.

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.; UHLÉN, M.; SUNDBERG, B.; LUNDERBERG, J. Gene discovery in the wood-form*ing* tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 1330-1335, 1998.

STERNLICHT, H.; FARR, G.W.; STERNLICHT, M.L.; DRISCOLL, J.K.; WILLISON, K.; YAFFE, M.B. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** Washington, v.90, n.20, p.9422-9426, Oct,1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. I:____. **Fisiologia Vegetal,** Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W.L.; SHEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 392–400, 2001.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L.F.; TAKABE, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: JUNG, H.G. (Ed.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility,** ASA-CSSA-SSSA, Madison, 1993. p. 247-270p.

TOMASELLI, I. El Sector Forestal Brasileño en el 2020. In: _____. **Informe Nacional Brasil**: Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina. Rome: FAO – MMA Brasil, 2004. cap. 5. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 06 jun. 2007.

TOMAZELLO FILHO, M. Variação radial da densidade básica e da estrutura anatômica da madeira do *Eucalyptus saligna* e *E. grandis.* **IPEF**, Piracicaba, n. 29, p. 37-45, 1985.

TRUGILHO, P.F.; LIMA, J.T.; MENDES, L.M.. Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de Eucalyptus saligna. **CERNE,** Lavras, v. 2, n. 1, p. 1-152. 1996.

TWYMAN, R.M. **Principles of Proteomics**. Advanced Text, UK, 2004. 241 p.

UGGLA, C.; MORITZ, T.; SANDBERG, G.; SUNDBERG, B. Auxin as a positional signal in pattern formation in plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v.93, p. 9282-9286, 1996.

VALVERDE, R.S.; NEIVA, S.A.; SOARES, N.S. Biotecnologia e competitividade das plantações florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Universiadade Federal de Viçosa, 2007, cap.17, p. 363-374.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIANS, K.L. Progresswith 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.

WILEY, W.C.; MACLAREN. I.H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. **The Review of Scientific Instruments**, New York, v.26, p.1150, 1995.

WOLUCKA, B.A.; MONTAGU, M.V. GDP-Mannose 3,5-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the *de Novo* Biosynthesis of Vitamin C in Plants. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 47483–47490, 2003.

WOO, H.H.; HAWES, M.C. Cloning of genes whose expression is correlated with mitosis and localized in dividing cells in root caps of Pisum sativum L. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 35, p. 1045–1051, 1997.

YANG, K.Y.; LIU, Y.D.; ZHANG, S.Q. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 741–746, 2001.

YANG, S-H.; WANG, H.; SATHYAN, P; STASOLLA, C.; LOOPSTRA, C.A. Real-time RT-PCR of lobolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan-protein and arabinogalactan-protein-like genes. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 124, p. 91—106, 2005.

YATES, J.R. 3rd; ENG, J.R.; MCCORMACK, A.L.; SCHIELTZ, D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. **Analytical Chemistry**, Washington, v.67, n.2, p.1426-1436, 1995.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLERZ, B.; DARVILL, A.C.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 1129-1138, 1995.

ZHANG, S.Q.; KLESSIG, D.F. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends Plant Science**, London, v. 6, p. 520–527, 2001.

ZHANG, Y.; BROWN, G.; WHETTEN, R.; LOOPSTRA, C.A.; NEALE, D.; KIELISZEWSKI, M.J.; SEDEROFF, R.R. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. **Plant Molecular Biology**, 3311 Gz Dordrecht, v. 52, p. 91–102, 2003

ZOBEL, B.J.; VAN BUIJTENEN, J.P. **Wood variation:** its causes and control. New York: Springer-Verlag, 1989.363p.

ZHONG, R.; MORRISON III, W.H.; HIMMELSBACH, D.S.; POOLE II, F.L.; YE, Z. Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 563-577, 2000.

ZHONG, R.; MORRISON III, W.H.; NEGREL, J.; YE, Z. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 2033-2045, 1998.

# ANEXOS

**ANEXO A – Protocolo de extração de proteínas**

a) Macerar 2g da amostra em nitrogênio líquido;

b) Transferir a amostra para tubos contendo 20 mL de tampão de extração com 1 g de PVPP, agitar, transferir para o gelo e deixar homogeneizando no agitador, por 30 min;

c) Acrescentar 20mL de Fenol, agitar, transferir para gelo e deixar homogeneizando no agitador, por 30 min;

d) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C;

e) Transferir o sobrenadante para tubos contendo 20 mL de tampão de extração com 1 g de PVPP;

f) Completar o volume com Fenol, agitar, transferir para gelo e deixar homogeneizando no agitador, por 1 h;

g) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C;

h) Transferir sobrenadante para tubos contendo 20 mL de tampão de extração sem PVPP;

i) Completar o volume com Fenol, agitar, transferir para gelo e deixar homogeneizando, por 1 h;

j) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C;

k) Transferir sobrenadante dividindo-se o volume em dois tubos;

l) Acrescentar 5 volumes de acetato de amônio 0,1M gelado;

m) Deixar precipitando *overnight* em freezer -20°C;

n) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C e descartar o sobrenadante;

o) Lavar o precipitado com 40 mL de acetato de amônio 0,1 M gelado e deixar precipitando a -20°C, por 1 h;

p) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C e descartar o sobrenadante;

q) Lavar o precipitado com 40 mL de acetato de amônio 0,1 M gelado e deixar precipitando a -20°C, por 1 h;

r) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C e descartar o sobrenadante;

s) Lavar o pellet com 40ml de metanol 100% gelado, deixar precipitando a -20°C, por 1 hora;

t) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C e descartar o sobrenadante;

u) Lavar o pellet com 40ml de acetona 100% gelada, deixar precipitando a -20°C, por 1 hora;

v) Centrifugar a (10.000 *g*), por 30min, a 4°C e descartar o sobrenadante;

x) Deixar os tubos abertos no dessecador, na câmara fria, para secagem do precipitado.

**ANEXO B – Tampão de extração**

| | |
|---|---|
| Tris HCl pH 7,5 | 0,5 M |
| Sacarose | 0,7 M |
| KCl | 0,1 M |
| EDTA | 50 mM |
| PMSF | 2 mM |
| B-mercaptoetanol | 2% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO C – Tampão de solubilização**

| | |
|---|---|
| Uréia | 7 M |
| Triton-X 100 | 0,4% |
| DTT | 50 mM |
| TCEP | 2 mM |
| CHAPS | 4% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO D – Reagente do *kit Biorad Protein Assay* (BioRad)**

| | |
|---|---|
| Reagente *kit* | 1 X |
| Agua Milli-Q | 4 X |

Filtrar em papel de filtro

**ANEXO E – Tampão de Desnaturação**

| | |
|---|---|
| Tris-HCl pH 6,8 | 0,5 M |
| Glycerol | 10% |
| SDS | 10% |
| β-mercaptoetanol | 5% |
| Azul de Bromofenol | 1% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO F – Tampões Laemmli**

| | |
|---|---|
| Tris | 25 mM |
| Glicina | 192mM |
| SDS | 0,1% (apenas para superior) |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO G - Solução fixadora**

| | |
|---|---|
| Etanol | 40% |
| Ácido acético | 10% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO H - Solução de coloração**

a) Solução estoque do corante

| | |
|---|---|
| Comassie G250 | 0,1% |
| Ácido fosfórico | 2% |
| Sulfato de Amônio | 10% |

Preparado em água Milli-Q

b) Solução para coloração

| | |
|---|---|
| Solução estoque do corante | 80% |
| Metanol | 20% |

**ANEXO I – Tampão de focalização 3–10**

| | |
|---|---|
| Uréia | 7 M |
| Triton-X 100 | 0,4% |
| DTT | 50 mM |
| TCEP | 2 mM |
| CHAPS | 4% |
| anfólitos (IPG buffer, Amersham Biosciences) | |
| pH3-10 | 0,75% |
| pH 4-7 | 0,25% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO J – Tampão de focalização 4–7**

| | |
|---|---|
| Uréia | 7 M |
| Triton-X 100 | 0,4% |
| DTT | 50 mM |
| TCEP | 2 mM |
| CHAPS | 4% |
| anfólitos (IPG buffer, Amersham Biosciences) | |
| pH 4-7 | 0,75% |
| pH 3-10 | 0,25% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO K – Solução de equilíbrio**

| | |
|---|---|
| Tris-HCl pH 6,8 | 50 mM |
| Uréia | 6 mM |
| Glicerol | 30% |
| SDS | 2% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO L – Protocolo de digestão de proteínas**

a) Cortar os *spots* em segmentos de aproximadamente 1mm$^3$, transferir para tubos Eppendoff;

b) Lavar os segmentos com solução de descoloração, completa remoção do corante;

c) Retirar a solução e desidratar os segmentos com 100% ACN;

d) Reidratar os fragmentos de gel com solução de DTT, mantendo-os a 55°C, por 40 min;

e) Adicionar solução de IAA, matendo-os no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min;

f) Remover as soluções

g) Lavar os fragmentos com solução 25mM de Bicarbonato de Amônio;

h) Desidratar os segmentos com 100% ACN, deixando o solvente evaporar;

i) Após a secagem dos fragmentos, reidratá-los com 15 µl de solução de tripsina;

j) Cobrir o volume dos segmentos dos *spots* com solução 25mM de Bicarbonato de Amônio;

k) Manter os tubos a 37°C por no máximo 14 horas;

l) Inativar a ação da tripsina com a adição de 15 µl de solução bloqueadora;

m) Retirar a solução e armazená-la em um novo tubo;

n) Lavar duas vezes os fragmentos com solução de eluição I, mantendo-os sob sonicação por 20 min em banho-maria a 45ºC. A cada lavagem, retirar a solução e armazená-la no novo tubo correspondente ao *spot*;

o) Repetir o passo anterior utilizando a solução de eluição II;

p) Desidratar os segmentos com 100% ACN, retirar a solução e armazená-la no tubo novo, correspondente ao *spot*;

q) Reduzir o volume (para 15 µL) das soluções recuperadas em concentrador a vácuo;

r) Ressuspender os peptídeos em ácido fórmico 1%.

**ANEXO M - Solução de descoloração**

| | |
|---|---|
| ACN | 50% |
| Bicarbonato de Amônio | 25 Mm |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO N - Solução bloqueadora**

| | |
|---|---|
| ACN | 50% |
| Ácido Fórmico | 5% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO O - Solução de eluição I**

| | |
|---|---|
| Metanol | 60% |
| Ácido Fórmico | 1% |

Preparado em água Milli-Q

**ANEXO P - Solução de eluição II**

| | |
|---|---|
| ACN | 50% |
| Ácido Fórmico | 1% |

Preparado em água Milli-Q