

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

**Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus*  
*grandis* e *Eucalyptus globulus***

**Orientadora:** Dra Eliane Ferreira Noronha  
**Co-orientador:** Dr Octávio Luiz Franco

Brasília  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

**Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia

**Orientadora:** Dra Eliane Ferreira Noronha

**Co-orientador:** Dr Octávio Luiz Franco

Brasília  
2007

P436p Pereira, Jackeline Leite.  
Proteoma comparativo de xilema de eucalyptus grandis e eucalyptus  
globulus / Jackeline Leite Pereira. – 2007.  
180 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2007.  
Orientação: Eliane Ferreira Noronha.

1. Eucalipto. 2. Celulose. 3. Madeira. 4. Biotecnologia. I. Noronha,  
Eliane Ferreira, orient. II. Título.

CDU 582.883.4:575

## **Termo de aprovação**

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 02 de outubro de 2007, pela banca examinadora constituída por:

---

Dr. Jaime Paba  
Universidade Federal do Paraná  
Examinador Externo

---

Dr Dario Grattapaglia  
Universidade Católica de Brasília  
Examinador interno

---

Dr Octavio franco  
Universidade Católica de Brasília  
Co-orientador

---

Dra. Eliane Noronha  
Universidade Católica de Brasília  
Orientadora

*Dedico a minha família, em especial aos meus pais,  
por tudo que representam para mim  
e pelo exemplo de honra e disciplina;*

*Dedico ao meu tão querido Carlos Eduardo,  
pela paciência, bondade, respeito e ajuda;*

*À família Pavin, por todos os momentos de apoio;*

*Aos meus três lindos sobrinhos, Gabriella, Victor e Bruna,  
como incentivo ao crescimento pessoal e profissional.*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e grande exemplo de vida;

Aos meus irmãos pelo apoio;

Ao Carlos Eduardo Pavin, por tudo o que é e o que representa;

A Dra Eliane F. Noronha, amiga, exímia orientadora e companheiras pelas dicas nem sempre seguidas, pela paciência e apoio nestes anos de cooperação;

Ao Dr Octavio Franco, pela excelente co-orientação, apoio, broncas e belas gargalhadas;

Ao Dr Dario Grattapaglia, pelo financiamento e apoio;

Ao Dr Georgios Pappas, pelas valiosas dicas e auxílio nas análises em bioinformática;

Ao Dr Giancarlo Pasquali, pela acolhida e crucial auxílio na coleta de amostras;

Ao Bauer, por indicar “minhas árvores proteômicas”

Ao Dr Luciano Paulino, pelas análises em espectrometria e sinceridade;

Ao Dr Carlos Bloch, por ceder a infra-estrutura e o equipamento das análises em espectrometria de massa;

Ao CNPq, pelo financiamento;

A grande amiga Vanessa pela ajuda constante e essencial, bem como pelas risadas marcantes;

Às amigas Kelly, Betty e Andrea, pela amizade, apoio e pelos grandes aprendizados;

Aos amigos Erivaldo, Krishna, André, Thaina, Luciana Soares, Sandra, Simone, Michele, Fernada, Luiz e Miriam, pela companhia, auxílio e momentos de descontração;

A Suely Pavin, Elisa Pavin e Antônio José Pavin pelos grandes momentos e pela acolhida;

Aos demais membros do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímica – CAPB;

Ao Fábio Teles, por evitar que eu arrancasse todos os meus fios de cabelo;

A todos que contribuíram de alguma forma na execução do trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentual de unidades siringil, guaiacil e hidroxifenil na madeira de *E. grandis* e *E. globulus*. Em branco, percentual de siringil, em cinza, guaiacil e em preto, hidroxifenil. Adaptado de Neto *et al.*, 2005-----21
- Figura 2.** Estrutura representativa das paredes celulares primária e secundária de uma célula vegetal mostrando os principais componentes estruturais. Adaptada de Somerville *et al.*, (2004)-----23
- Figura 3.** Estrutura da molécula da celulose formada a partir de ligações entre monômeros de glicose. Modificado de Alberts *et al.*, 2002-----24
- Figura 4.** Constituintes da lignina. Fonte: Boerjan *et al.*, 2003-----24
- Figura 5.** Estrutura da lignina proposta por Adler (1977)-----25
- Figura 6.** Via biossintética proposta para a formação dos monolignóis guaiacil, siringil e hidroxifenil. As interrogações representam os passos enzimáticos ainda não elucidados. Modificado de Morreel *et al.*, 2004-----27
- Figura 7:** Reação catalisada pela enzima 4-coumarato CoA ligase. Modificado de Dean, 2005-----29
- Figura 8.** Reações catalisadas pelas enzimas F5H (Cald5H) e COMT (Ald-OMT), envolvendo a hidroxilação do aldeído coniferil e metilação de 5 hidroxiferulato (Modificado de Li *et al.*, 2000)-----31
- Figura 9.** Reações catalisadas pela CCoAOMT, tendo como substratos os tioésteres cafeoil e 5-hidroxiferuloil CoA, A seta pontilhada enfatiza a possível seletividade de substrato. SAM (S-adenosil L-metionina) é o doador do grupo metil em ambos os casos (MLFigura 5 modificado de Ferrer *et al.*, 2005)-----31

- Figura 10.** CCR catalisa a conversão de vários ésteres cinamoil CoA a seus respectivos coniferaldeídos para a formação dos monômeros de lignina (extraído e modificado de Li *et al.*, 2005)-----33
- Figura 11.** Esquema mostrando o funcionamento de um espectrômetro de massa para análise de proteínas-----38
- Figura 12.** Fluxograma das estratégias de execução das análises de proteínas do xilema e folha de *C. citriodora* aplicadas em xilema de *E. grandis* e *E. globulus*-----52
- Figura 13.** Coleta de xilema secundário de *E. grandis* e *E. globulus* na unidade do Guaíba da empresa Aracruz celulose-----45
- Figura 14.** Análise em 2DE das extrações de *C. citriodora* mostrando suas respectivas imagens em 3DE feitas no software Bionumerics. (A) Ccf 1 e (B) Ccx1. Os números indicam as proteínas identificadas por espectrometria de massa referentes à tabela 2. As imagens em vista tridimensional mostram a intensidade dos “spots” mais evidentes e em escala de mm-----55
- Figura 15.** Sobreposição das réplicas técnicas dos géis 2DE de amostras de xilema e folha de *C. citriodora* e suas respectivas linhas de regressão. (A) Ccx1 e Ccx 2 e (B) Ccf 1 e Ccf 3. Em azul, o gel de referência para as amostras de nº 1. Em laranja, o gel a ser comparado. Os sinais de + em verde demonstram os “spots” utilizados como referência (“landmarks”) nas análises feitas no software Bionumerics. O  $R^2$  nas linhas de regressão indica o índice de correlação entre as 3 réplicas técnicas, e os números correspondentes ao eixo Y de cada gráfico indica o volume dos “spots”-----56
- Figura 16.** Géis bidimensionais para as amostras Egl 1 (A) e Egl 1(B), mostrando suas respectivas imagens em 3D feitas no software Bionumerics. Os números indicam as proteínas identificadas mostradas na tabela 2. As imagens em visualização tridimensional mostram a intensidade dos “spots” mais evidentes e em escala de mm-----57
- Figura 17.** Sobreposição das réplicas técnicas de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* e suas respectivas linhas de regressão. (A) Eg 1 x Eg 2 e (B) Egl 1 x Egl 3. Em azul, o

gel de referência para as amostras de nº 1. Em laranja, o gel a ser comparado. Os sinais de + em verde demonstram os “spots” utilizados como referência nas análises feitas no software Bionumerics. O  $R^2$  nas linhas de regressão indicam o índice de correlação entre as 3 réplicas técnicas, e os números correspondentes ao eixo Y de cada gráfico indica o volume dos “spots”-----58

**Figura 18.** Sobreposição entre as imagens dos géis 2DE de *E. grandis* x *E. globulus* das réplicas Eg 1 e Egl 1 **(a)** Numeração dos “spots” em comum na figura de sobreposição; **(b)** comparação dos níveis de expressão, com base no volume dos “spots” em comum entre Eg 1 e Egl 1 **(c)** linha de regressão e coeficiente de correlação entre as réplicas das extrações a partir do volume dos “spots”-----60

**Figura 19.** Proteínas em comum entre *E. grandis* e *E. globulus* e seu padrão de expressão diferencial mostrado pelo tamanho dos “spots”-----62

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Valores de pI e massa molecular de enzimas da via de lignificação em diferentes espécies de plantas-----49

**Tabela 2.** Proteínas de *Eucalyptus* spp identificadas por análise em espectrometria de massa --  
-----64

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACIONES

%	<i>Porcentagem</i>
μl	<i>Microlitros</i>
4- CL	<i>4- coumarato CoA ligase</i>
AMP	<i>Adenosina Monofosfato</i>
ATP	<i>Adenosina Trifosfato</i>
C. citriodora	<i>Corymbia citriodora</i>
C5	<i>Carbono 5</i>
CAD	<i>Cinamil álcool desidrogenase</i>
Ccf	<i>Corymbia citriodora folha</i>
CCF	<i>Elemental Chlorine Free</i>
CCoaOMT	<i>Cafeoil CoA - metiltransferase</i>
Ccx	<i>Corymbia citriodora xilema</i>
cm	<i>Centímetros</i>
CoA	<i>Coenzima A</i>
COMT	<i>Ácido cafeico metiltransferase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
E. globulus	<i>Eucalyptus globulus</i>
E. grandis	<i>Eucalyptus grandis</i>
EC	<i>Enzyme Comission</i>
Egl	<i>Eucalyptus globulus xilema</i>
Egx	<i>Eucalyptus grandis xilema</i>
F5H	<i>Ferulato-5-hidroxilase</i>
g	<i>Gramas</i>
h	<i>Hora (s)</i>
M	<i>Molar</i>
m <sup>2</sup>	<i>Metros quadrados</i>
m <sup>3</sup>	<i>Metros cúbicos</i>
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization- Time Of Flight</i>
min	<i>Minutos</i>
mL	<i>Mililitros</i>
mm	<i>Milímetros</i>

mM	<i>Milimolar</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
°C	<i>Graus Celsius</i>
SAM	<i>S-adenosil L-metionina</i>
TCF	<i>Totally Chlorine Free</i>
x g	<i>Força em “g” equivalente à aceleração da gravidade na superfície da Terra</i>

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1 - O PLANTIO DE EUCALIPTO NO BRASIL</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2 - COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL</b> .....	<b>21</b>
1.2.1 - LIGNINA: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE.....	23
<b>1.3 – A PRODUÇÃO DE PAPEL E A LIGNINA</b> .....	<b>25</b>
<b>1.4 - ENZIMAS DA VIA DE LIGNIFICAÇÃO E A QUALIDADE DA MADEIRA</b> .....	<b>27</b>
4- COUMARATO CoA LIGASE (4CL).....	27
ÁCIDO CAFEICO METILTRANSFERASE (COMT).....	29
FERULATO-5-HIDROXILASE (F5H).....	29
CAFEOIL CoA - METILTRANSFERASE (CCoAOMT) .....	30
CINAMOIL CoA REDUTASE (CCR).....	31
CINAMIL ÁLCOOL DESIDROGENASE (CAD).....	33
<b>1.5 - BIOTECNOLOGIA E A PRODUÇÃO DE PAPEL</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6 - PROTEÔMICA VEGETAL</b> .....	<b>35</b>
<b>1.7 - ESPECTROMETRIA DE MASSA</b> .....	<b>36</b>
<b>1.8 – GENOLYPTUS E PROTEOMA</b> .....	<b>38</b>
<b>2 – HIPÓTESE</b> .....	<b>40</b>
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 - OBJETIVO GERAL:</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 - COLETA DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2 - EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3 - EXTRAÇÃO ÁCIDA (TCA/ACETONA)</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4 - EXTRAÇÃO FENÓLICA</b> .....	<b>45</b>
<b>4.5 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)</b> .....	<b>46</b>

<b>4.6 - ANÁLISE DAS IMAGENS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.7 - DETECÇÃO DOS “SPOTS” E IDENTIFICAÇÕES FEITAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8 - PREPARAÇÃO DOS “SPOTS” PARA AS ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA .....</b>	<b>48</b>
<b>4.9 - ESPECTROMETRIA DE MASSA.....</b>	<b>49</b>
4.9.1 - ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS E MAPAS PEPTÍDICOS.....	50
<b>5.1 – COLETA DO MATERIAL E ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 – ANÁLISES INTRA-ESPECÍFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 – ANÁLISES INTER-ESPECÍFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>5.4 - C. CITRIODORA.....</b>	<b>60</b>
<b>5.5 – PROTEÍNAS EM COMUM ENTRE E. GRANDIS E E. GLOBULUS .....</b>	<b>60</b>
<b>5.6 - PROTEÍNAS DIFERENCIAIS ENTRE E. GRANDIS E E. GLOBULUS.....</b>	<b>61</b>
<b>5.7 - ANÁLISES NO BANCO DE DAOS DE ESTS DO GENOLYPTUS.....</b>	<b>62</b>
<b>5.8 – ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS COM O BANCO DE DADOS DO PROJETO GENOLYPTUS ....</b>	<b>68</b>
<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6.1 – EXTRAÇÃO PROTÉICA DE TECIDOS VEGETAIS.....</b>	<b>70</b>
<b>6.2 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E IDENTIFICAÇÃO DE “SPOTS” .....</b>	<b>70</b>
<b>6.3 - ANÁLISE DAS IMAGENS .....</b>	<b>72</b>
<b>6.4 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO .....</b>	<b>73</b>
METALOPEPTIDASES, PROTEÍNAS DE DEFESA E PROTEÍNAS DE RESPOSTA A ESTRESSE .....	73
PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO.....	74
PROTEÍNAS ESTRUTURASIS .....	75
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS .....	76
OUTRAS PROTEÍNAS .....	76
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DE LIGNIFICAÇÃO .....	76
<b>7 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8 – PERSPECTIVAS.....</b>	<b>83</b>
<b>10 – ANEXOS.....</b>	<b>95</b>
<b>ARTIGO: PRODUCTION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF INSECTICIDAL ENZYMES FROM ASPERGILLUS FUMIGATUS TOWARD CALLOSOBRUCHUS MACULATES...95</b>	
<b>ARTIGO: NOVEL INSIGHTS INTO USE OF FUNGAL HYDROLYTIC ENZYMES .....</b>	<b>96</b>
<b>ARTIGO: XANTHOMONAS GARDNERI EXOENZYMATIC ACTIVITY TOWARD PLANT TISSUE97</b>	
<b>ARTIGO: PRODUCTION IN VIVO PROTEOME ANALYSIS OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS IN THE INTERACTION WITH THE HOST PLANT BRASSICA OLERACEA .....</b>	<b>98</b>
<b>ARTIGO: COMPARISON OF PLANT PROTEOMIC PATTERNS IN ROOT-NEMATODE INTERACTIONS .....</b>	<b>99</b>

## ABSTRACT

Lignin content and quality, related to the G/S ratio, are the main barriers to the wood pulp production. The role of monolignol biosynthesis genes encoding these traits has been described, like 4Cl, CAD, CCoAOMT, COMT, F5H, PAL and CAld5H genes. Proteomics studies can be used to the study of wood genesis and have been described in the literature. In the present work, proteomic analysis were be done aimed the identification of proteins related to the wood quality in Eucaliptus. For this purpose, proteomic analysis of *C. citriodora*, *E. grandis* *E. globulus* xylem and leaves were being done using 2DE gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF techniques. Images of 2DE gels were analyzed using the Bionumerics software and revealed correlation between technical replicates with correlation coefficient values of 0.88, 0.99, 0.98 and 0.98 to *C. citriodora* leaves replicates, *C. citriodora* xylem replicates, *E. grandis* xylem replicates and *E. globulus* xylem replicates, respectively. Three-dimensional images was also been generated showing spots' volumes and intensities to each bidimensional gel. The protein maps of *E. grandis* and *E. globulus* was quite different and after images superposition a correlation coefficient of 0.32 was obtained. Spectrometric analyses lead to the identification of a 20 proteins of *C. citriodora*, 18 of *Eucalyptus globulus* and 22 of *Eucalyptus grandis* most of these were classified as structural proteins, defense and resistance proteins, metabolism proteins (nitrogen and carbon metabolism), phenylpropanoid pathway enzymes, putative and undefined proteins. To phenylpropanoid pathway enzymes were identified one CAD and 4CL from *C. citriodora* xylem, one CAD, two CCoAOMT and one 4CL from *E. grandis* and *E. globulus* xylem. The spots volumes corresponding to CCoAOMT and 4CL from *E. grandis* were different from that obtained to *E. globulus*, showing a probable differential protein expression patern. Thus, comparative proteome approach provides an important tool to the identification of critical proteins related to wood chemical traits and differential protein pattern expression.

## RESUMO

A quantidade e a qualidade da lignina, relacionada ao padrão dos molignóis G/S, são as maiores barreiras à produção de polpa de celulose. O papel dos genes envolvidos na biossíntese de monolignóis, como 4cl, cad, ccoaomt, comt, cald5h e pal têm sido descritos na literatura. Estudos proteômicos podem ser utilizados para o estudo da gênese da madeira e também tem sido descritos na literatura. Neste trabalho, foram realizadas análises proteômicas de xilema e folha de *Corymbia citriodora* e xilema de duas espécies de eucalipto, utilizando-se eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF), visando a identificação de proteínas relacionadas à qualidade da madeira. Os mapas protéicos gerados foram analisados utilizando o programa Bionumerics (Applied-maths), sendo 3 réplicas para cada uma das espécies e tecidos estudados. Após as análises das imagens, foram obtidos os coeficientes de correlação dos volumes relativos dos “spots” entre as réplicas de cada tecido e espécie com os seguintes valores: 0,88; 0,99; 0,98 e 0,98 para folha e xilema de *C. citriodora*, xilema de *E. grandis* e *E. globulus* respectivamente. Os mapas protéicos de *E. grandis* e *E. globulus*, quando sobrepostos, apresentaram um índice de correlação de 0,32, demonstrando diferenças no padrão de expressão de proteínas entre estas duas espécies. As análises espectrométricas levaram à identificação de 20 proteínas de xilema e folha de *C. citriodora*, 27 de xilema de *E. globulus* e 18 de xilema de *E. grandis*. Estas proteínas foram agrupadas, de acordo com sua função, nas seguintes classes: proteínas estruturais, proteínas de defesa e resistência, proteínas do metabolismo (nitrogênio e carbono), enzimas da via de síntese de fenilpropanóides, e as proteínas não identificadas. Foram identificadas uma Cianmil álcool desidrogenase, 2 isoformas de Cafeoil CoA O-metiltransferase e uma 4 Coumarato CoA ligase em xilema de *E. grandis* e *E. globulus*. Estas proteínas apresentaram um padrão diferencial de expressão, quando analisados os volumes relativos entre os seus “spots” correspondentes nas duas espécies de eucalipto. Através da proteômica comparativa, foi possível analisar os padrões de expressão diferencial destas enzimas entre duas espécies de eucalipto com importância econômica na produção de papel e celulose, mas com características contrastantes em termos de lignina. Bem como identificar proteínas relacionadas à composição química e qualidade da madeira, bem como definir seus padrões de expressão.

# **1 - INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - O plantio de eucalipto no Brasil

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália e pertence à família Myrtaceae, subgênero *Symphyomyrphus*, possuindo mais de 700 espécies, 24 subespécies e uma grande diversidade de híbridos naturais (POKE *et al.*, 2005). Espécies deste gênero foram trazidas para o Brasil por imigrantes em meados do século XIX para utilização como matéria-prima na fabricação de dormentes de linhas de trem. As espécies introduzidas no Brasil apresentaram um rápido crescimento, adquirindo mais biomassa em menos tempo em relação às espécies nativas, o que contribuiu entre outros fatores para sua aceitação no mercado de madeira nacional e a diversificação de seu uso para outros fins, como por exemplo, na produção de carvão vegetal. Outras adaptações como a elevada produção de sementes, facilidade de propagação vegetativa, crescimento em uma grande variedade de solos e temperaturas, inclusive em solos considerados pobres também foram fatores importantes para a valorização da madeira de eucalipto no mercado brasileiro (PEREIRA *et al.*, 2000).

A madeira de eucalipto possui uma ampla utilização nas indústrias nacionais e internacionais nos mais diversificados setores, como por exemplo, na produção de cápsulas de remédios, tecidos sintéticos, carvão para as siderúrgicas, produção de móveis, acabamentos refinados da construção civil, pisos, postes e mastros para barcos, e como matéria-prima para produção de papel e celulose. Da árvore, também se obtém o óleo essencial utilizado em produtos de limpeza, gêneros alimentícios, perfumes, remédios e mel produzido a partir do pólen de suas flores (SILVA *et al.*, 2005).

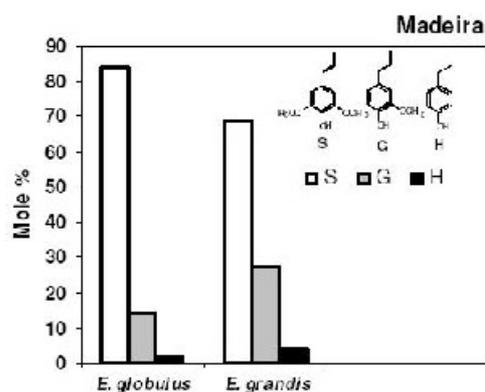
Antes da introdução da cultura de eucalipto no Brasil, as espécies nativas eram utilizadas como matéria-prima para a agricultura e pecuária, o que causou uma devastação de cerca de 46% das matas brasileiras (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2006). A grande necessidade de diminuir a pressão sobre as matas nativas aliada ao esforço de promover o crescimento do setor florestal no país, levou o governo brasileiro a lançar, em 1965, uma política de incentivos fiscais para promover o cultivo de florestas de produção pelo país (Meireles, 2006). Diante disto e do potencial comercial da madeira de eucalipto, seu cultivo no Brasil aumentou, sendo que hoje possui uma grande área plantada, com cerca de 3 milhões de hectares. O Brasil tornou-se em 2003, o sétimo maior produtor mundial de celulose (cerca de 7,4 milhões de toneladas/ano) e o décimo segundo maior produtor de papel

e detém o maior índice médio de produtividade (40m<sup>3</sup> de celulose por hectare/ano) (Meireles, 2006).

Sendo assim, o plantio sustentável de eucalipto bem como suas características adaptativas levou à sua utilização como uma fonte alternativa de madeira, contribuindo desta forma, para o decréscimo da devastação de florestas nativas, preservando diversas outras espécies em regiões tropicais.

Dentre as espécies de eucalipto cultivadas no Brasil, se destaca a espécie *Eucalyptus grandis* que se adapta muito bem a regiões com clima tropical, sendo a espécie com maior área de cultivo no Brasil e a mais estudada na obtenção de híbridos para a clonagem de árvores selecionadas. Além disto, também é a espécie mais utilizada nas indústrias para a produção de celulose e papel por sua grande adaptabilidade e seu rendimento volumétrico superior a de outras espécies cultivadas no Brasil (SILVA *et al.*, 2005). Sua madeira é considerada leve e fácil de trabalhar, além de possuir o dobro de celulose em relação à quantidade de lignina (61,52% para 31%) (TRUGILHO *et al.*, 2003). Porém, a quantidade de lignina com unidades guaiacil é relativamente alta quando comparada com a espécie *Eucalyptus globulus* (Figura 1) (TRUGILHO *et al.*, 2003).

A espécie *Eucalyptus globulus* também é cultivada no Brasil, possuindo uma madeira rígida com o caule longo e fino e com as propriedades mais adequadas para produção de papel e celulose. Como por exemplo, a facilidade de cozimento e branqueamento da polpa, pois o polímero de lignina nesta espécie é composto principalmente por unidades siringil (Figura 1) (NETO *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Percentual de unidades siringil, guaiacil e hidroxifenil na madeira de *E. grandis* e *E. globulus*. Em branco, percentual de siringil, em cinza, guaiacil e em preto, hidroxifenil. Adaptado de Neto *et al.*, 2005.

Outra grande vantagem da utilização da madeira de *E. globulus* para a produção de papel reside na menor quantidade de madeira necessária para obtenção da celulose, 25% a menos de madeira, 3m<sup>3</sup>, para a produção de 1 tonelada de celulose em comparação com a madeira de *E. grandis*. Para *E. grandis* são necessários cerca de 3,90m<sup>3</sup> de madeira para a produção de uma tonelada de celulose (NETO *et al.*, 2005). Além disto, as fibras de celulose obtidas da madeira de *E. globulus* geralmente são mais densas e flexíveis que as de *E. grandis*, favorecendo a remoção de lignina durante o processo de branqueamento da polpa de papel. Desta forma, o custo de produção do papel a partir da madeira de *E. globulus* é menor devido à economia de energia e produtos químicos utilizados neste processo. (NETO *et al.*, 2005).

A espécie *Corymbia citriodora* antes *Eucalyptus citriodora*, também foi introduzida no Brasil, no entanto é pouco utilizada na produção de papel e celulose por possuir madeira densa, pesada e resistência mecânica elevada, além de possuir grande quantidade de lignina guaiacil em sua parede celular (NETO *et al.*, 2005). Sua madeira é usada na fabricação de mobiliário de utilidade geral, cabos de ferramentas, utensílios, assoalhos, embarcações e também na construção civil. Suas folhas são utilizadas para a produção de óleos essenciais e produtos para sauna. O ritmo de crescimento e o rendimento volumétrico são, geralmente, inferiores, quando comparados aos de *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla* (REVISTA MADEIRA, 2003).

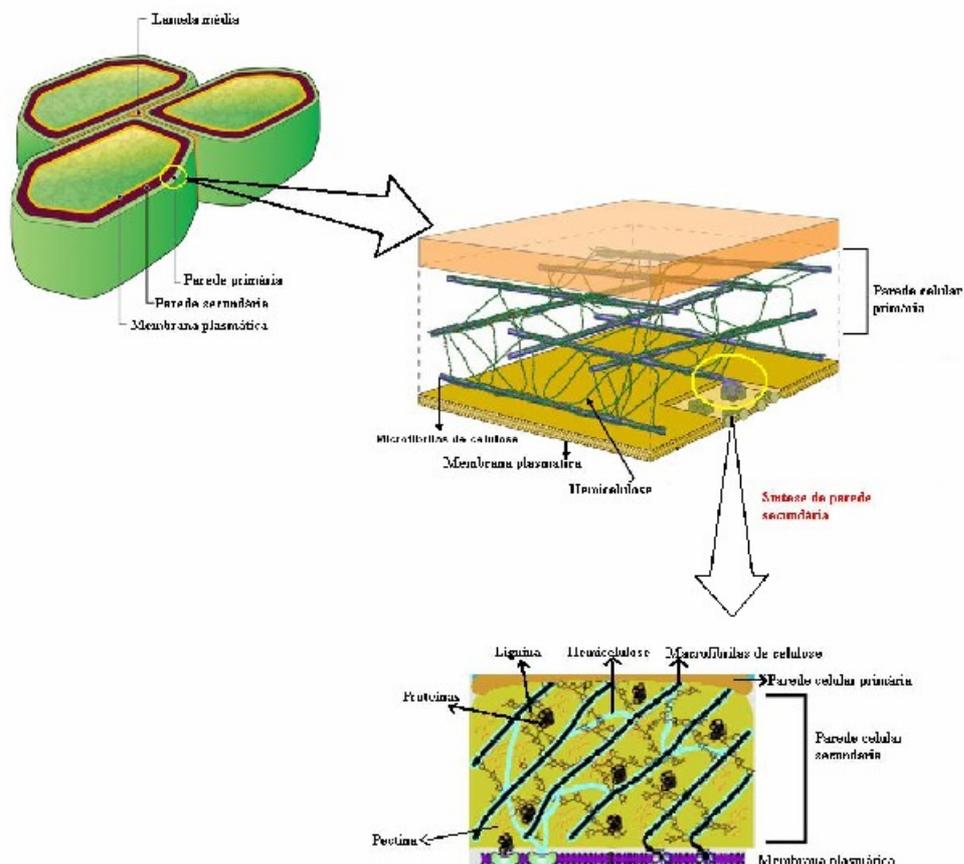
Assim como *E. grandis* e *E. globulus*, outras espécies de eucalipto como *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus robusta*, *Eucalyptus tereticornis* e *Eucalyptus camaldulensis* são cultivadas no Brasil para vários fins, inclusive para produção de papel e celulose (FOELKEL *et al.*, 1975). A madeira de *E. urophylla* é utilizada desde a construção civil até na produção de papel e celulose (FERREIRA, 1979). Possui enorme potencial de crescimento em tempo curto e grande resistência ao ataque de fungos (FOELKEL *et al.*, 1975). Como *E. grandis* e *E. urophylla* são mais adaptadas às condições ambientais do Brasil, clones elite de híbridos destas duas espécies são gerados e utilizados pela indústria de papel e celulose, devido à qualidade da madeira, rápido crescimento e grandes volumes de madeira produzidos (SILVA *et al.*, 2005).

## **1.2 - Composição da parede celular vegetal**

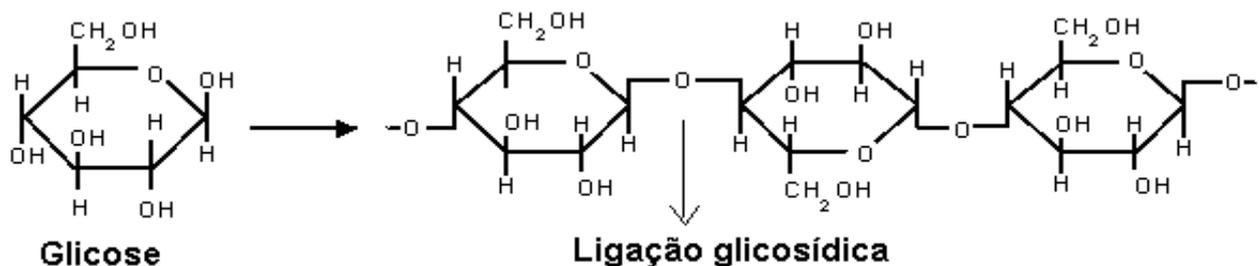
A parede celular dependendo de sua constituição pode ser classificada em parede primária ou secundária. A parede celular primária contém basicamente celulose e

hemiceluloses, enquanto a parede celular secundária presente nas células do tecido vascular, é constituída por lignina, proteínas e compostos pécicos presentes na lamela média (espaço formado entre duas células vegetais adjacentes), além de celulose e hemiceluloses (Figura 2) (SOMERVILLE *et al.*, 2004). As hemiceluloses são polissacarídeos constituídos por monômeros de pentosanas, hexosanas e ácidos urônicos. As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose dando elasticidade e impedindo o contato entre os dois polissacarídeos (SOMERVILLE *et al.*, 2004).

A celulose, o principal componente da parede celular vegetal, é um polissacarídeo constituído por monômeros de glicose unidos através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 formando filamentos lineares (Figura 3). Os filamentos associados formam as micelas que, por sua vez, se unem formando as microfibrilas, estas se organizam em feixes maiores, as macrofibrilas, constituindo o arcabouço da parede celular primária (WILLIAMSON *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Estrutura representativa das paredes celulares primária e secundária de uma célula vegetal mostrando os principais componentes estruturais. Adaptada de Somerville *et al.*, (2004).

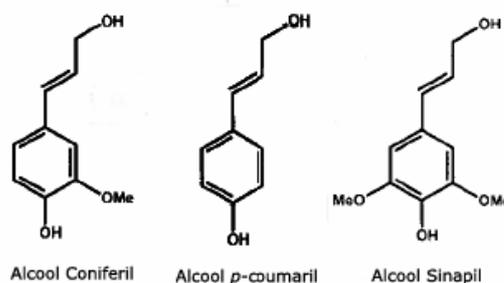


**Figura 3.** Estrutura da molécula da celulose formada a partir de ligações entre monômeros de glicose.

Modificado de Alberts *et al.*, 2002.

### 1.2.1 - Lignina: estrutura e biossíntese

A capacidade de sintetizar lignina foi uma grande adaptação evolutiva para as plantas possibilitando a conquista do ambiente terrestre (BOERJAN *et al.*, 2003). Este composto oferece suporte e sustentação às plantas, auxilia no transporte de solutos no sistema vascular, impede a perda excessiva de água pela transpiração, bem como auxilia na proteção da planta contra o ataque de patógenos. A lignina é composta por álcoois denominados monolignóis ou fenilpropanóides sintetizados na via metabólica dos fenilpropanóides. A biossíntese destes monômeros é iniciada pela desaminação do aminoácido fenilalanina resultando na formação dos álcoois ou fenilpropanóides, *p*-coumaroil, coniferil e sinapil (DIXON *et al.*, 2001; ANTEROLA & LEWIS, 2002), que diferem apenas na metoxilação nos carbonos C3 e C5 do anel aromático (Figura 4).

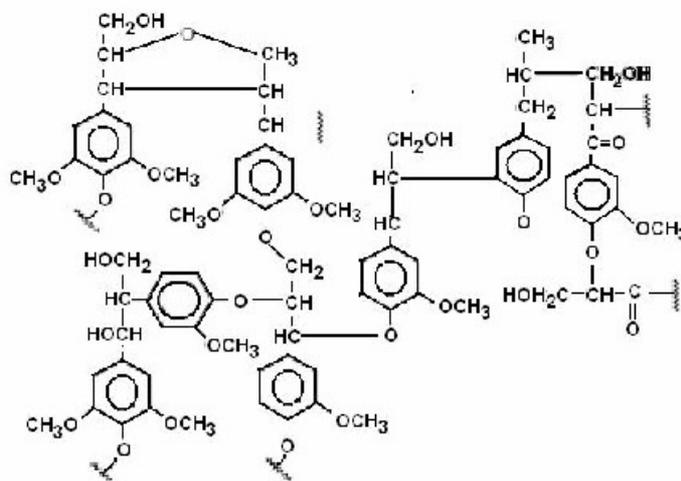


**Figura 4.** Constituintes da lignina. Fonte: Boerjan *et al.*, 2003.

Para a formação do polímero de lignina estes álcoois são ligados através de reações de desidrogenação estabelecendo ligações covalentes carbono-carbono (Figura 5), este processo é denominado lignificação (BOERJAN *et al.*, 2003) e é iniciado pelo transporte dos

monolignóis do citoplasma para a parede celular (SANTANA *et al.*, 2006). Quando incorporados ao polímero de lignina os álcoois  $\rho$ -coumaroil, coniferil e sinapil são denominados unidades  $\rho$ -hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Figura 6).

A complexidade estrutural das ligninas, relação siringil/guaiacil, depende das ligações formadas entre as unidades constitucionais, monolignóis, durante o processo de polimerização (MICIC *et al.*, 2002). A composição do polímero de lignina (constituição por monômeros H, S e/ou G) e a quantidade de lignina depositada na parede celular secundária são influenciadas pelo ambiente, pelo estágio de desenvolvimento da planta, sua espécie, assim como o tipo celular.



**Figura 5.** Estrutura da lignina proposta por Adler (1977).

Em angiospermas a lignina é formada principalmente por unidades G e S, com traços de unidades H, enquanto em monocotiledôneas, a quantidade de unidades H é maior (BOERJAN *et al.*, 2003). As madeiras podem ser classificadas em dois tipos, madeira mole e madeira dura, e esta classificação baseia-se na composição da lignina, reflexo do percentual de siringil e guaiacil. A lignina de madeiras consideradas moles é composta por 90% de unidades siringil e a lignina das madeiras duras é composta de quantidades aproximadamente iguais de siringil e guaiacil. A lignina tem um papel crucial na proteção natural da madeira, pois grandes quantidades de lignina e a presença de lignina guaiacil promovem uma maior proteção natural (DANIEL, 2003), evitando a entrada de patógenos no sistema vascular da planta.

A síntese dos monolignóis é realizada a partir da conversão do ácido chiquímico nos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina que são os precursores dos álcoois  $\rho$ -coumaroil, coniferil e sinapil, sendo que, a tirosina é o precursor primário de lignina em

gramíneas (IIYAMA *et al.*, 1993), enquanto a fenilalanina é o precursor primário da lignina em angiospermas. Os dois aminoácidos para formar os ésteres de ácidos fenilpropanóides que posteriormente serão convertidos aos monômeros de lignina, sofrem sucessivas oxidações e metilações (MICIC *et al.*, 2002) (Figura 6).

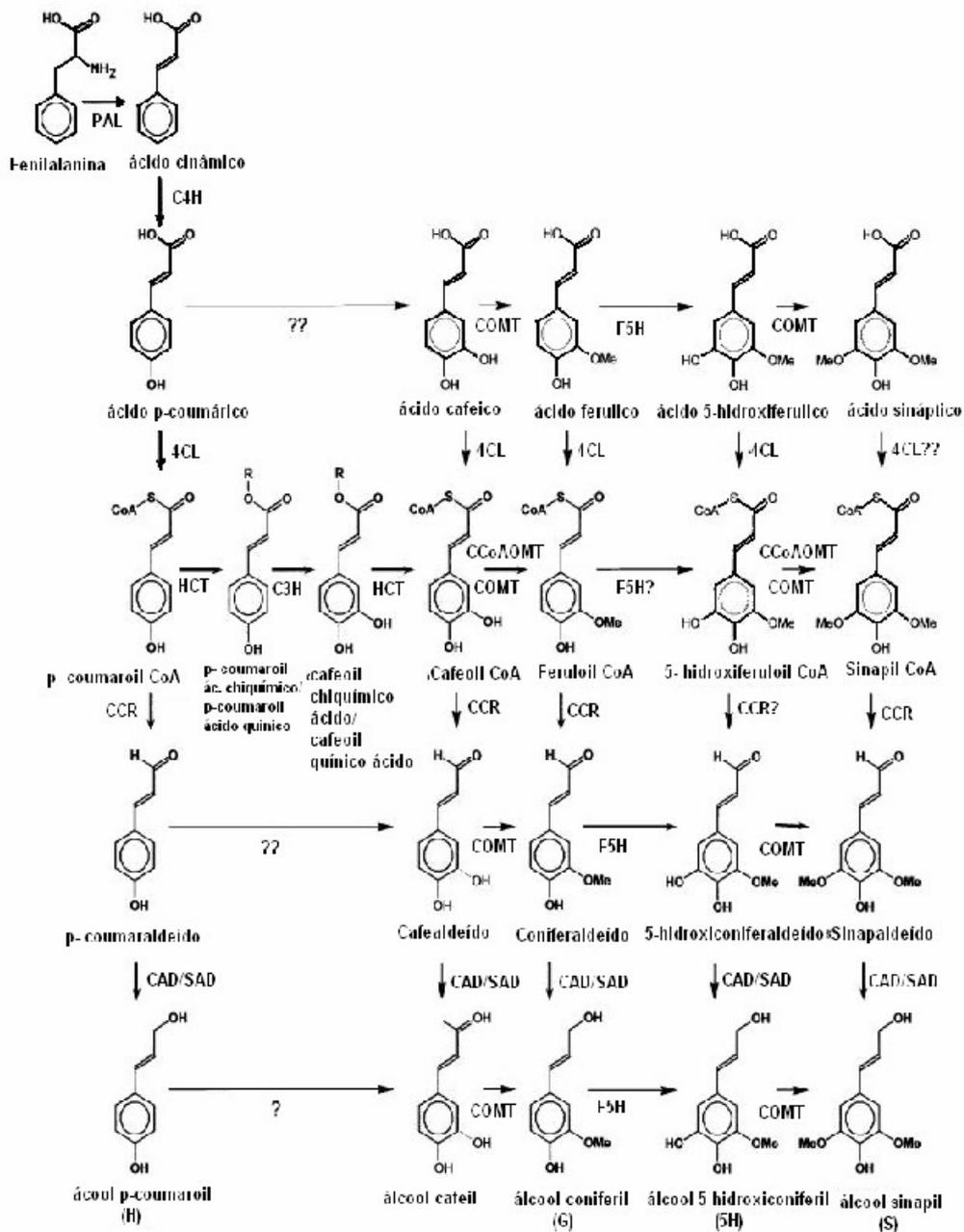
O primeiro passo para a produção de lignina siringil é a conversão de feruloil CoA a coniferaldeído, reação catalisada pela enzima CCR (Cinamoil CoA redutase). Para a biossíntese de álcool coniferil, o coniferaldeído é reduzido pela CAD (Cinamil álcool desidrogenase) (**Figura 6**). A biossíntese de álcool sinapil envolve a hidroxilação do carbono C5 do anel aromático do coniferaldeído pela enzima F5H, seguida pela metilação do grupo hidroxil pela COMT e a subsequente redução pela CAD, levando à produção de álcool sinapil (Figura 6) (LI *et al.*, 2003; BOERJAN *et al.*, 2003), que por sua vez, é utilizado na formação de lignina siringil. Algumas das enzimas da via dos fenilpropanóides têm sido descritas como críticas no controle da composição de lignina nas paredes celulares vegetais, principalmente no percentual relativo de p-Hidroxifenil, guaiacil e siringil (ANTEROLA E LEWIS, 2002).

### 1.3 – A Produção de papel e a lignina

Para se obter a celulose a ser utilizada na produção de papel, a matéria-prima (truncos ou talos herbáceos) deve ser limpa e descascada e depois submetida à trituração mecânica em máquinas de lâminas múltiplas. Em seguida, visando a obtenção de fibras de celulose com alto grau de pureza, o material triturado é submetido ao processo de tratamento químico para a eliminação da lignina e dos demais compostos ligados às fibras de celulose. No Brasil, o processo de produção de polpa química mais difundido é o processo *kraft*, que envolve o cozimento da madeira com uma solução contendo hidróxido e sulfeto de sódio, em temperaturas em torno de 160°C para retirar as fibras de lignina e dos demais compostos associados às fibras de celulose (BRASILEIRO *et al.*, 2001). Posteriormente, o produto é lavado, depurado e submetido ao processo de branqueamento. Os métodos de branqueamento mais utilizados são o CCF (*Elemental Chlorine Free*) e TCF (*Totally Chlorine Free*), que utilizam reagentes à base de cloro (cloro, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio) (BRASILEIRO *et al.*, 2001).

Estes produtos químicos são necessários para se obter a polpa de celulose praticamente pura e conseqüentemente um papel de boa qualidade. No entanto, o uso destes químicos, além de gerar um problema de acúmulo e descarte de rejeitos tóxicos ao meio ambiente, possuem um alto custo. Desta maneira, a redução do uso destes para a retirada de lignina e

branqueamento da polpa de celulose é crucial para minimizar estes problemas pelas indústrias de papel e celulose (BRASILEIRO *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Via biossintética proposta para a formação dos monolignóis guaiacil, siringil e hidroxifenil. As interrogações representam os passos enzimáticos ainda não elucidados. Modificado de Morreel *et al.*, 2004.

O conhecimento da relação siringil/guaiacil (S/G) na estrutura da lignina tem implicações diretas em processos industriais de produção de papel e celulose, pois a relação entre estes álcoois pode favorecer o processo de deslignificação da madeira (polpação), assim

como o branqueamento. A lignina constituída por unidades siringil, por não possuírem o carbono reativo C5 disponível para reação na etapa de polimerização, apresenta estrutura química menos resistente e, conseqüentemente, mais favorável à deslignificação. Já a lignina guaiacil, por possuir o carbono reativo C5 disponível, gera maior número de ligações covalentes na estrutura da lignina, tornando-a mais resistente e menos favorável à deslignificação.

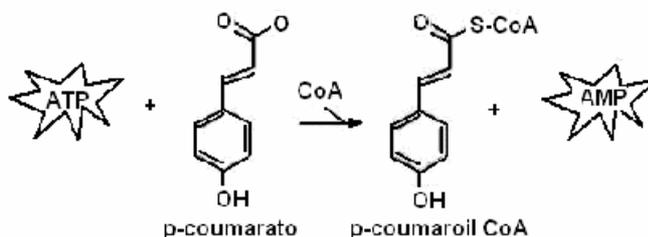
Para as indústrias produtoras de papel, a madeira considerada com qualidade para tal fim, deve possuir grande quantidade de celulose e menor quantidade de lignina guaiacil. A espécie utilizada deve ter grande produtividade florestal na relação tonelada de celulose/hectare e redução no consumo específico da madeira, ou seja, na relação m<sup>3</sup> de madeira por tonelada de celulose ([www.ucb.br/genolyptus](http://www.ucb.br/genolyptus)).

As fibras curtas de celulose das espécies de *Eucalyptus* emergem como uma alternativa às fibras longas, características de *Pinus* spp, que são utilizados para a produção de papel jornal, por exemplo. A parede celular composta por celulose de fibras curtas possui maior número de fibras, um alto grau de opacidade, e são mais fáceis de serem desagregadas da lignina e dos compostos pécticos. Desta forma, facilitam o processo de branqueamento, garantindo a formação homogênea do papel (PEREIRA *et al.*, 2000).

#### 1.4 - Enzimas da via de lignificação e a qualidade da madeira

##### 4- coumarato CoA ligase (4CL)

A enzima 4CL (EC: 6.2.1.12), catalisa a formação de tioésteres CoA dos ácidos hidroxicinâmicos *p*-coumárico, caféico, ferúlico e hidroxiferúlico, em uma reação em dois passos que envolve a hidrólise de uma molécula de ATP (**Figura 7**). Estes tioésteres são substratos para uma série de reações na via de síntese de fenilpropanóides (ALLINA *et al.*, 1998).



**Figura 7.** Reação catalisada pela enzima 4-coumarato CoA ligase. Modificado de Dean, 2005.

Isoformas da enzima 4CL já foram descritas na literatura para diferentes espécies de plantas e vários estudos têm demonstrado que estas isoformas possuem funções fisiológicas distintas. Três isoformas de 4CL denominadas At4CL1, At4CL2 e At4CL3 já foram descritas em *Arabidopsis thaliana*. Estudos de cinética enzimática e filogenia molecular demonstraram que as enzimas At4CL1 (*A. thaliana* 4CL 1) e (*A. thaliana* 4CL 2) At4CL2, parecem estar envolvidas na síntese de lignina, enquanto At4CL3 está envolvida na formação de flavonóides (Ehlting et al., 1999). Assim como para *A. thaliana* isoformas de 4CL também já foram descritas para *Populus tremuloides* que possui duas formas, denominadas Pt 4CL1 e Pt 4CL2. Harding et al., (2002) demonstraram a expressão diferencial destas enzimas em xilema e folha desta espécie e realizaram experimentos de caracterização cinética na presença dos substratos ácido 4-p-coumárico (PA), ácido caféico (CA) e ácido ferúlico (FA). A isoforma Pt 4CL1 altamente expressa no metaxilema e em células em lignificação, na presença dos três substratos (PA), (CA) e (FA), apresentou maior afinidade pelo ácido caféico. Este substrato age como um potente inibidor competitivo da 4CL1 em ensaios enzimáticos contendo os três ácidos como substrato, demonstrando que o produto formado neste caso depende da concentração relativa dos três ácidos potenciais substratos para esta enzima. A Pt 4CL2 é expressa na epiderme e em folhas em expansão e apresenta maior afinidade pelo ácido p-coumárico. Com base em dados de expressão e de especificidade, Harding e colaboradores, (2002) sugeriram que a Pt4CL1 e a Pt4CL2 possuem funções fisiológicas distintas: a primeira direciona fenilpropanóides para a síntese de lignina e a segunda para a síntese de flavonóides. Desta forma, estas enzimas podem estar relacionadas com o fenótipo de teor de lignina diferenciado para cada um destes tecidos.

Trabalhos pioneiros com enzimas da via de síntese de lignina demonstraram a modificação da madeira de *P. tremuloides* com a redução da expressão do gene pt4cl1. A sub-expressão deste gene em *P. tremuloides* leva à redução de lignina em torno de 45% ao mesmo tempo em que proporciona um aumento de 15% nos níveis de celulose (HU et al., 1999). Li e colaboradores (2003) demonstraram que árvores de *P. tremuloides* transformadas com construções antisense de 4cl (gene que codifica a 4CL1) e sense de cald5H (gene que codifica a enzima coniferaldeído 5-hidroxilase ou F5H), apresentam aumento da relação siringil/guaiacil na composição da lignina. Estas construções foram utilizadas na transformação de *P. tremuloides* gerando árvores que expressavam um, ou os dois transgenes. Árvores transgênicas com a construção *antisense* da 4CL apresentaram redução de aproximadamente 40% no conteúdo de lignina e incremento de 14% na quantidade de celulose. Estes resultados sugerem mudanças de grande importância no conteúdo da lignina,

podendo promover a diminuição da utilização de químicos no processo de polpação de árvores com estas características melhoradas, já que, unidades siringil são mais fáceis de serem desagregadas e removidas das fibras de celulose.

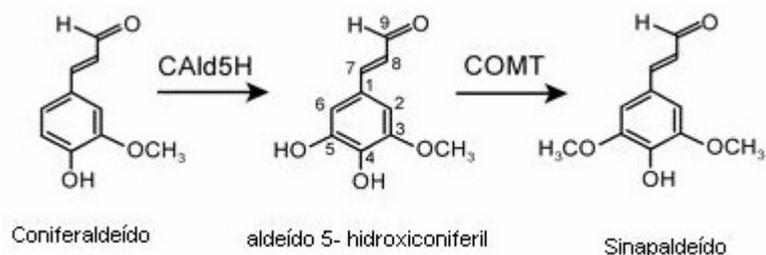
#### ***Ácido cafeico metiltransferase (COMT)***

A enzima COMT (EC 2.1.1.6), alternativamente chamada 5-hidroxiconiferaldeído O-metiltransferase (Ald-OMT), catalisa preferencialmente a metilação de 5-hidroxiconiferaldeído a sinapaldeído na biossíntese de monolignóis, principalmente do monolignol siringil (LI *et al.*, 2003) (Figura 8).

Experimentos visando a sub-expressão (“downregulation”) de COMT em diversas espécies têm sido realizados desde 1994. Em alfafa, NI *et al.*, 1994 observaram que a sub-expressão do gene de COMT, leva à redução dos níveis de lignina siringil, no entanto não se observa modificação nas concentrações de lignina guaiacil. Resultados similares foram encontrados para álamo (*Populus spp*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e milho (*Zea mays*) (revisado por ANTEROLA & LEWIS, 2002; PIQUEMAL *et al.*, 2002). Da mesma forma, essa diminuição do teor de lignina siringil, pode ter alterado a capacidade de regeneração do tecido vascular da planta, enfraquecendo-a e tornando-a mais suscetível ao ataque de patógenos (NI *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999).

#### ***Ferulato-5-hidroxilase (F5H)***

Também chamada coniferaldeído 5-hidroxilase (Cald5H) (E.C. 1.14.13.), catalisa a hidroxilação do ácido ferúlico (FA), coniferaldeído e álcool coniferil levando à biossíntese da lignina siringil a partir do ácido ferúlico (KIM, *et al.*, 2006) (Figura 8). Esta enzima já foi descrita para *A. thaliana*, e o gene identificado foi denominado cyp84 (Chapple *et al.*, 1992). Estudos do efeito da super-expressão deste gene foram examinados na determinação dos componentes siringil e guaiacil em *A. thaliana*. As plantas transgênicas apresentaram decréscimo de lignina guaiacil e aumento de lignina siringil (Meyer *et al.*, 1998).



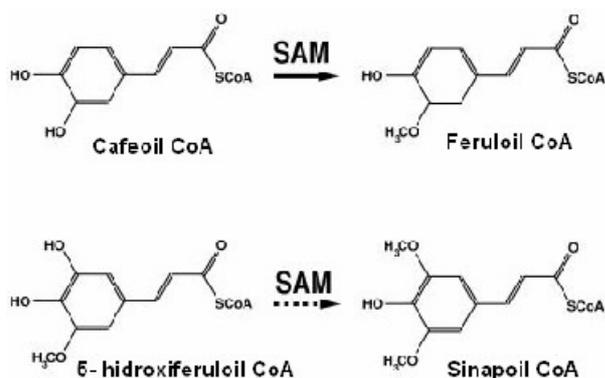
**Figura 8.** Reações catalisadas pelas enzimas F5H (Cald5H) e COMT (Ald-OMT), envolvendo a hidroxilação do aldeído coniferil e metilação de 5 hidroxiferulato (Modificado de Li *et al.*, 2003).

Sendo assim, as enzimas descritas até este item possuem importante papel no controle da quantidade de lignina e a relação siringil/guaiacil na parede celular de células do xilema de *P. tremuloides* e *A. thaliana* (FRANKE *et al.*, 2000).

#### *Cafeoil CoA - metiltransferase (CCoAOMT)*

A enzima CCoAOMT (E.C. 2.1.1.104) pertence a uma classe de enzimas que são denominadas O-metiltransferases (OMT's) e está envolvida na biossíntese de lignina catalisando a metilação de cafeoil CoA a feruloil CoA e de 5- hidroxiferuloil CoA a sinapoil CoA (Figura 9).

Pavarthi e colaboradores, em 2001 realizaram estudos cinéticos *in vitro* demonstrando a maior afinidade da CCoAOMT pelo substrato 5- hidroxiferuloil CoA (Figura 9). No entanto, não foram ainda descritos na literatura fatores que possam levar à maior afinidade por este substrato.



**Figura 9.** Reações catalisadas pela CCoAOMT, tendo como substratos os tioésteres cafeoil e 5-hidroxiferuloil CoA, A seta pontilhada enfatiza a possível seletividade de substrato. SAM (S-adenosil L-metionina) é o doador do grupo metil em ambos os casos (Modificado de Ferrer *et al.*, 2005).

Esta enzima já foi isolada e caracterizada para diferentes plantas, incluindo *Medicago sativa* (alfafa), álamo, *Pinus taeda* (Pinheiro) e tabaco (revisado por ANTEROLA & LEWIS,

2002). Plantas transgênicas de tabaco transformadas com uma construção anti-senso de CCoAOMT, apresentam redução nos níveis dos monolignóis guaiacil e siringil e grande alteração em seu desenvolvimento (Zhong *et al.*, 1998; Pincon *et al.*, 2001). Já em experimentos similares conduzidos para alfafa, CCoAOMT sub-expressa só reduziu os níveis do monolignol guaiacil (Guo *et al.*, 2000). Em estudos do nível de expressão dos genes que codificam tal enzima em *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla*, Santos, 2006 sugere que altos teores de lignina siringil estão relacionados com o aumento do nível de expressão de CCoAOMT. A super-expressão do gene codificante desta enzima leva ao aumento na produção de compostos feruloil que são convertidos em várias etapas a unidades siringil.

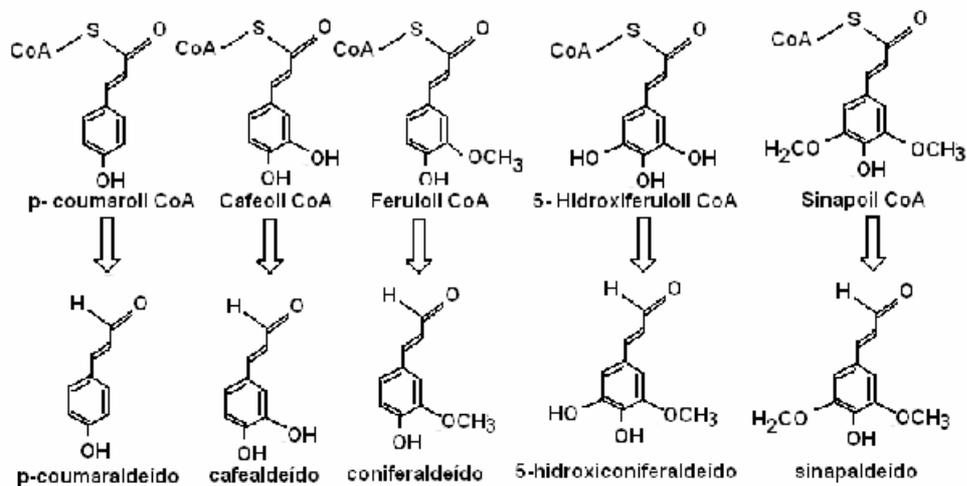
Além da função de biossíntese de monolignóis para a formação de lignina, esta enzima está diretamente relacionada com a função de defesa das plantas. Aumentando a formação de polímeros fenólicos como o siringil e guaiacil, que se associam à parede celular das plantas superiores e possibilitam o reforço das paredes celulares contra o ataque de patógenos.

#### ***Cinamoil CoA redutase (CCR)***

A enzima CCR (E.C: 1.2.1.44) é NADPH dependente e catalisa a conversão de *p*-coumaroil CoA, feruloil CoA e sinapoil CoA em seus aldeídos correspondentes (PICHON *et al.*, 1998) (**Figura 10**), no primeiro passo específico na síntese dos monômeros de lignina.

A CCR também pode ser encontrada em mais de uma forma nos tecidos vegetais. Em *A. thaliana* e em milho foram descritas duas formas denominadas AtCCR1 e AtCCR2, ZmCCR1 e ZmCCR2, respectivamente (Pichon *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2001). No entanto, foi demonstrado que apenas uma das isoformas encontrada para cada uma das espécies está envolvida na via de lignificação. Através de estudos baseados em homologia de seqüências foram identificadas 8 possíveis CCR em bancos de dados de seqüência de diversas espécies, com similaridade de mais de 40% com AtCCR1.

Entretanto, em eucalipto, álamo, tabaco e pinheiro, foi encontrado somente 1 gene relativo à CCR (ANTEROLA & LEWIS, 2002). Deste fato, pode-se considerar que se isoformas distintas existem especificamente relacionadas à composição da lignina G/S, G, S ou H em diferentes tipos celulares, ou estas são codificadas por genes com baixa homologia, ou os genes são expressos transientemente sendo, portanto, de difícil detecção (ANTEROLA & LEWIS, 2002).



**Figura 10.** CCR catalisa a conversão de vários ésteres cinamoil CoA a seus respectivos coniferaldeídos para a formação dos monômeros de lignina (extraído e modificado de Li *et al.*, 2005).

A sub-expressão do gene da CCR através da estratégia de RNA interferente (RNAi) em *A. thaliana* levou à redução de 50% da quantidade de lignina total, acompanhada pela mudança na composição e estrutura da mesma, com a incorporação de ácido ferúlico na parede celular (GOUJON *et al.*, 2003). Em tabaco e mutantes de *Arabidopsis* irx4 foi observada somente a redução nos níveis de lignina em 50%, porém, houve um aumento significativo da suscetibilidade a stress mecânico (revisado por ANTEROLA & LEWIS, 2002 e BOERJAN *et al.*, 2003).

A CCR também atua com outras enzimas da via de lignificação para a formação de monolignóis. Estudos *in vitro*, demonstraram que para *P. tremuloides* a CCR xilema-específica, possui maior afinidade e especificidade pelo substrato feruloil CoA. A atividade da enzima foi testada na presença dos substratos, p-coumaroil CoA, feruloil CoA, Cafeoil CoA, Sinapil CoA e 5-hidroxifenil CoA, tendo como resultado, maior afinidade pelo substrato feruloil CoA, além de atuar como um inibidor competitivo dos demais ésteres. Através de experimentos de cinética enzimática combinando a ação das enzimas CCoAOMT que catalisa a conversão do substrato cafeoil CoA em Cafealdeído e feruloil CoA, e a CCR, foi detectada a produção de coniferaldeído, sugerindo então que, CCR e CCoAOMT podem atuar em sinergismo (LI *et al.*, 2005). Estudos de Baghdady e colaboradores (2006) reforçam a ação em sinergismo de enzimas da via de síntese de lignina, demonstrando que os genes CAD2 e CCR de *Eucalyptus gunnii*, quando expressos em *A. thaliana* são expressos de maneira coordenada em xilema primário e secundário, por estarem ativos em células em processo de lignificação.

### *Cinamil álcool desidrogenase (CAD)*

A CAD (E.C. 1.1.1.195) catalisa a redução dos aldeídos hidroxicinâmicos  $\rho$ -coumaril, coniferil e sinapil nos respectivos álcoois hidroxicinâmicos, ou monolignóis, os precursores monoméricos da lignina (HAWKINS *et al.*, 1997). Esta enzima já foi purificada de xilemas de diferentes espécies de plantas (HALPIN *et al.*, 1992; OMALLEY *et al.*, 1992), inclusive de xilema de *Eucalyptus*. Para *Eucalyptus* foram encontradas 2 isoformas, denominadas CAD1P e CAD2P (HAWKINS & BOUDET, 1994), sendo o mRNA correspondente altamente expresso (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993).

Em angiospermas, a CAD pode ser encontrada em diferentes isoformas, caracterizadas pelas diferenças na afinidade e especificidade pelos substratos, aldeídos hidroxicinâmicos, a maioria apresentando maior afinidade pelo aldeído sinapil (Wyrambik & Grisebach, 1975). Acredita-se que estas isoformas, como as 4CL, possam atuar tanto na síntese de lignina, quanto na formação de compostos de defesa. A alfafa possui duas isoformas de CAD (MsaCAD1 e MsaCAD2), ambas atuam na biossíntese de lignina (Brill *et al.*, 1999), e possuem 50 e 77% de similaridade de seqüência com uma CAD de eucalipto (pEuCAD2) presente em xilema em desenvolvimento. Comparando as seqüências das CAD descritas para álamo (PtSAD e PtCAD) com a de eucalipto (pEUCAD2), foram observadas identidades de 54 e 80%, respectivamente (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993). Para *A. thaliana* foram identificadas 16 proteínas similares à CAD (revisado por ANTEROLA E LEWIS, 2002), destas, a grande maioria ainda não foi caracterizada quanto às propriedades cinéticas. Estudos envolvendo a sub-expressão da CAD em diferentes espécies de plantas, mostraram efeitos deletérios na lignificação em termos de suprimento dos monômeros siringil e guaiacil e acúmulo dos substratos cinamaldeídos (Cafelaldeído, coniferaldeído, 5-hidroxiconiferaldeído e sinapaldeído) (BAUCHER *et al.*, 1998. ).

Estes estudos demonstram a importância de enzimas da via de síntese de lignina e que a super-expressão ou sub-expressão destas pode interferir na qualidade da madeira, gerando plantas com um teor aumentado de lignina siringil (com fácil remoção no processo de branqueamento). Estes resultados geraram uma diminuição da lignina guaiacil, ou com níveis diminuídos de lignina, bem como propiciaram um aumento dos níveis de celulose, como descrito por LI e colaboradores em 2003.

Enquanto a via de síntese de lignina vem sendo amplamente estudada, a descrição da via de síntese de celulose ainda está em fase inicial. A estratégia para alcançar maior conhecimento sobre genes relacionados a esta e outras vias metabólicas em árvores tem sido o uso de espécies modelos como *Arabidopsis* sp. Sabe-se hoje, que neste gênero, podem ser

encontrados cerca de 10 genes que codificam a celulose sintase, primeira enzima na etapa da síntese de celulose, o *csa*, e ao menos 6 famílias de genes “Cellulase sintase-like” (*csl*), que são relacionados aos *csa*, tanto na formação de parede celular primária, quanto da secundária (KALLURI & JOSHI, 2004). Porém a relação entre o aumento de celulose e a diminuição dos níveis de lignina ainda não foram elucidados, pois apesar da caracterização de genes da via de produção de celulose, ainda não se conhece todas as proteínas envolvidas, assim como os fatores reguladores de sua expressão (STERKY *et al.*, 2004).

### **1.5 - Biotecnologia e a produção de papel**

Várias alternativas têm sido propostas visando a modificação química da madeira para obtenção de madeira adequada ao uso para produção de papel e celulose, sem alterar a resistência da planta ao ataque de patógenos e pragas. A principal ferramenta é o melhoramento florestal, que é de uso muito comum em grande parte das espécies cultivadas no Brasil. Particularmente, na cultura de eucalipto, o melhoramento ganhou tamanha proporção que atualmente, florestas clonais a partir deste melhoramento, constituem grande parte nas indústrias que utilizam a madeira para diversos fins, principalmente na polpa celulósica, carvão e serraria.

O melhoramento de plantas consiste basicamente em modificar seu patrimônio genético, com a finalidade de obter variedades, ou híbridos, capazes de apresentar o maior rendimento possível, com produtos de alta qualidade e capazes de se adaptar às condições de um determinado ambiente, além de exibirem resistência às principais pragas e doenças. Desse modo, a variabilidade genética existente na população de melhoramento é a matéria prima sobre a qual são realizados processos de seleção e recombinação (TONELLO, 2006).

O método clássico de melhoramento de plantas baseia-se no cruzamento entre duas variedades, de maneira a promover uma recombinação de caracteres (hibridação), com a finalidade de aumentar a variabilidade gênica. Nas gerações seguintes, faz-se uma seleção dos indivíduos portadores de caracteres desejáveis. As plantas da progênie com características desejáveis são eleitas ao longo de várias gerações, que por sua vez, são então clonadas.

O completo entendimento das propriedades químicas da madeira, incluindo a via de biossíntese de lignina e celulose em níveis bioquímico e molecular, relacionado ao conhecimento de propriedades físicas da madeira, como a espessura da parede celular, na determinação de quantidade de lignina e o ângulo das fibras de celulose, podem contribuir

para a geração e sucesso de produção de progênies com potencial uso nos mais diversificados setores, principalmente na produção de papel e celulose.

### **1.6 - Proteômica vegetal**

A análise de proteomas ou proteômica de tecidos vegetais aliado à genômica funcional é uma importante ferramenta em estudos de padrão de expressão de proteínas em diferentes condições, assim como, sua caracterização e localização (EPHRITIKHINE *et al.*, 2004). A proteômica estrutural dá-se pela caracterização do proteoma total de um determinado organismo, tecido, organela ou estrutura celular com a identificação do maior número possível de proteínas, enquanto a proteômica comparativa visa a identificação apenas de proteínas diferencialmente expressas.

Estudos pioneiros de análise de proteoma estrutural e comparativo estão sendo feitos visando o entendimento do processo de formação da madeira em árvores de relevância econômica, paralelamente aos esforços de programas de sequenciamento genômico em colaborações inter-institucionais. Um exemplo são os trabalhos desenvolvidos com *Pinus* spp, para a qual foram encontradas cerca de 1039 proteínas de xilema, das quais 67,9% foram identificadas e 16,7% apresentaram homologia com outras proteínas nos bancos de dados disponíveis (GION *et al.*, 2005).

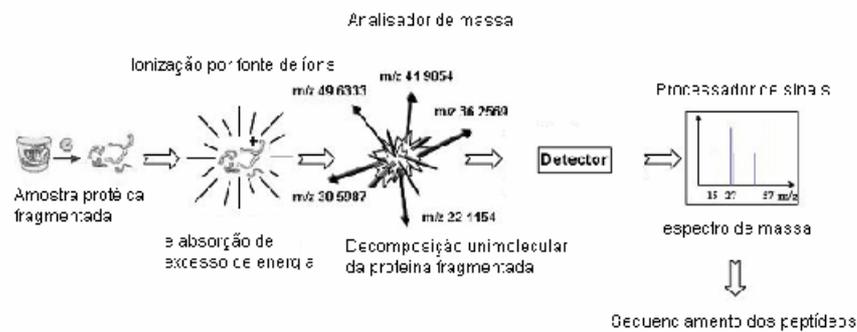
Na proteômica comparativa pode-se também avaliar a resposta de plantas ao ataque de pragas e patógenos, neste caso o conjunto de proteínas expresso em plantas saudáveis é diferente do conjunto de proteínas expresso em plantas na presença das pragas e patógenos (PECK *et al.*, 2001). Poucos estudos de proteômica estão sendo desenvolvidos para plantas superiores, a exemplo dos experimentos desenvolvidos em análise de proteoma de xilemas de árvores, como os realizados para *Pinus pinaster* Ait (PLOMION *et al.*, 2000) e *Eucalyptus* (CELEDON *et al.*, 2007). Através da análise de proteoma em gel bidimensional em plantas que apresentam possíveis mudanças na composição da parede celular por compressão do xilema. A compressão do xilema ocorre quando uma árvore é deslocada da sua posição vertical, sob o efeito de fatores externos, levando à formação de um lenho com estrutura anatômica e composição química bastante distintas. Essa madeira de reação, referida como madeira de compressão, é formada no lado inferior dos troncos inclinados das coníferas, visando a suportar o peso da árvore -tronco e copa -bem como a possibilitar a reorientação gradual do seu crescimento. Plomion e colaboradores (2000) analisaram 137 *spots* sendo que, 19% destes revelaram-se estar relacionados ao crescimento da planta, destacando também,

duas enzimas relacionadas à via de lignificação (CCoAOMT e COMT) superexpressas, levando à parcial caracterização proteômica de uma espécie submetida a *stress* mecânico. Em estudos utilizando madeira de *E. grandis* CELEDON *et al.*, (2007), obtiveram um total de 240 proteínas da região cambial de *E. grandis* em três estágios de crescimento (6 meses; 3 e 6 anos de idade). Para as plantas com 6 meses de idade foram identificadas 3 enzimas envolvidas na via de lignificação COMT, CAD e PAL, incluindo grande padrão de expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, e aminoácidos, enquanto em plantas com 3 anos de idade, foram encontradas duas CCoAOMT, indicando não só a presença de isoformas da enzima no tecido, quanto o padrão diferencial de proteínas em uma mesma espécie em diferentes estágios de crescimento (CELEDON *et al.*, 2007).

A separação de proteínas por eletroforese bidimensional possibilita a construção de mapas estruturais utilizados no estudo de proteínas expressas em diferentes tecidos e organismos, em diferentes condições e estágios, fornecendo informações acerca do crescimento e desenvolvimento da planta, permitindo a caracterização química da mesma. Em uma segunda etapa, estas proteínas devem ser identificadas, e esta identificação é realizada através de análises de espectrometria de massa e de bioinformática (NATERA *et al.*, 2000).

### **1.7 - Espectrometria de massa**

A espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada desde o início do século XX para obter a massa molecular e informações quanto às características estruturais de uma determinada amostra, fornecendo informações sobre a composição elementar, a estrutura e análises quantitativas e qualitativas das amostras (VEGA-BUSTILHOS, 2003). Na espectrometria de massa, uma forma de energia é transferida para a amostra para causar sua ionização (formação de íons livres na fase gasosa). A figura 11 esquematiza o funcionamento de um espectrômetro de massa comum, onde uma proteína fragmentada é ionizada e lançada por uma fonte de íons, o analisador de massas irá detectar a massa pela carga e um processador irá gerar os mapas peptídicos ou PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), ou, dependendo do aparelho, pode-se gerar a seqüências destes peptídeos analisados.



**Figura 11.** Esquema mostrando o funcionamento de um espectrômetro de massa para análise de proteínas.

Na identificação das proteínas, alguns programas (mencionados adiante), interpretam os dados da fragmentação dos espectros e convertem esta informação em massas de peptídeos e/ou seqüências de aminoácidos, dependendo dos recursos do equipamento (SHEVCHENKO *et al.*, 2001). Os projetos de sequenciamento de genomas ou de geração de bancos de ESTs (*Expressed Sequences Tags*) depositados em bancos de dados públicos ou privados geram, cada vez mais, dados para a identificação dos resultados obtidos pela espectrometria de massa. Esta análise é realizada através de programas que geram digestões teóricas das seqüências depositadas nos bancos de dados simulando a ação de uma protease específica, geralmente tripsina, gerando um mapa, denominado mapa peptídico. Os mapas gerados para a fragmentação de cada proteína de cada genoma são comparados aos mapas peptídicos obtidos por espectrometria. Os resultados desta comparação são apresentados através da área de cobertura da seqüência da proteína depositada no banco pela massa calculada dos aminoácidos presentes no peptídeo, e do “score” que determinarão a similaridade da “possível” proteína.

Um dos programas mais utilizados para tais análises é o MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), porém seu caráter comercial limita as informações disponíveis sobre as seqüências em seu pacote gratuito. Da mesma forma, o MASCOT e outros programas como o SEQUEST ([www.sequest.net](http://www.sequest.net)), analisam dados provindos de MS/MS, ou seja, sequenciamento de fragmentos de peptídeos, pois comparam agora a partir de um fragmento da seqüência proteica.

Todavia, é importante ressaltar que a proteômica têm sido eficiente na detecção de proteínas envolvidas na expressão gênica, e esta pode ser útil na detecção de proteínas envolvidas diretamente na síntese de lignina e celulose, bem como no controle destes

processos. Porém, um banco de dados específico para seqüências codificantes das proteínas de interesse da espécie analisada, é requerido para resultados mais acurados.

### **1.8 – Genolyptus e proteoma**

Os estudos de proteomas totais ou comparativos têm sido descritos como importantes ferramentas na identificação de proteínas cruciais na biologia e mecanismos de adaptação de diferentes espécies de plantas. Além disto, esta abordagem pode ser utilizada na validação de dados de seqüenciamento gerados pelos projetos genoma. O projeto de genoma do eucalipto, o Genolyptus, foi iniciado em 2001, visando o seqüenciamento de genes expressos no xilema e folha de diferentes espécies de eucalipto.

Na fase inicial deste projeto, foi obtido um grande número de “ESTs” (*Expressed sequence tags*), ou seqüências parciais de genes expressos, caracterizando-o como importante na geração de dados. Neste momento o projeto está na fase pós-genômica de validação de função destes genes e também de estudos mais aprofundados de expressão diferencial de genes em espécies de eucalipto com diferentes teores de lignina e celulose, ou seja, com características diferenciadas no que diz respeito à qualidade da madeira.

Neste trabalho, propõe-se um projeto complementar ao projeto central de genoma do eucalipto, Genolyptus, buscando utilizar e comparar os conhecimentos gerados neste projeto no entendimento da biologia da síntese de madeira em *E. grandis* e *E. globulus* e *C. citriodora*, com dados de análises proteômicas de xilema. Tendo como objetivo principal o estudo da gênese da madeira em eucalipto. A análise de proteomas de espécies de *Eucalyptus* com fenótipos contrastantes no que se refere à qualidade da madeira poderá levar à identificação de proteínas diferencialmente expressas e conseqüentemente uma maior compreensão da via de lignificação e síntese de celulose. Os dados gerados a partir de análises proteômicas poderão fornecer grande informação acerca do processo de síntese de madeira em *Eucalyptus* spp, permitindo o uso de técnicas já estabelecidas para a identificação de genes envolvidos no controle genético da qualidade da madeira. Esta informação prontamente disponibilizada às empresas produtoras de polpa de papel e celulose a partir da madeira de eucalipto poderá ser utilizada em futuros esforços na modificação das propriedades da madeira para uso industrial ou outras características, diminuindo, ou até mesmo eliminando o uso de produtos químicos na produção de papel, que são prejudiciais ao meio ambiente e diminuindo o custo da produção para empresas e finalmente, para o consumidor.

## **2 - HIPÓTESE**

## 2 – HIPÓTESE

As diferenças fenotípicas entre *E. grandis* e *E. globulus* no que se refere à qualidade da madeira podem ser atribuídas em parte a uma diferença no padrão de expressão de proteínas no xilema. Esta diferença pode contribuir para as características específicas de cada uma das espécies como, por exemplo, o teor/composição da lignina e conteúdo/características das fibras de celulose. Estas diferenças podem estar relacionadas com o nível de expressão dos genes de proteínas reguladoras e de enzimas das vias de síntese de lignina e celulose.

## **3 - OBJETIVOS**

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral:**

O objetivo geral deste trabalho analisar proteoma comparativo de xilema de *E. grandis* e *E. globulus*, na tentativa de identificar e correlacionar o conjunto de proteínas críticas para a gênese da madeira nestas árvores, ou proteínas diferenciais expressas no tecido, bem como correlacionar seus padrões de expressão. Este entendimento facilitará a identificação de proteínas associadas ao fenótipo de alto e baixo teor de lignina, assim como maior produção de celulose.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Determinar o perfil de expressão de proteínas no xilema de *E. grandis* e *E. globulus* por 2DE-PAGE
- Comparar o padrão de expressão de pontos protéicos (“spots”) em comum entre xilema *E. grandis* e *E. globulus*.
- Identificação dos “spots” correspondentes às proteínas mais expressas e diferenciais entre os diferentes tecidos e espécies de eucalipto.

## ■ - MATERIAL E MÉTODOS

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Coleta das amostras

Amostras de xilema secundário e de folhas de *Corymbia citriodora* foram coletadas de uma árvore no campus da Universidade Católica de Brasília - Asa norte, Campus II. Estas amostras foram utilizadas para estabelecimento e padronização das metodologias de extração, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, descritas abaixo (Figura 12). Uma vez estabelecidas as condições experimentais para a análise do proteoma destes tecidos, amostras de xilema secundário de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus* foram coletadas de árvores com 2 anos de idade. A amostragem foi realizada em árvores na plantação de eucalipto do Parque Florestal da Empresa Aracruz celulose, localizada na unidade do Guaíba - Rio Grande do Sul, em novembro de 2006. As árvores amostradas foram denominadas Eg para *E. grandis*, Egl para *E. globulus* e Ec para *C. citriodora*.

Nas árvores amostradas, foram realizados cortes de 30 x 15 cm no tronco, possibilitando a retirada da casca (Figura 13). Em seguida foi feita a raspagem do xilema exposto, totalizando 3 amostras de xilema. As folhas de *C. citriodora* foram retiradas dos talos para estabelecimento do protocolo padrão. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e triturados em um liquidificador industrial. As amostras Eg, Egl e Ec (Ccx para xilema e Ccf para folha de *C. citriodora*), nomenclatura correspondente às árvores amostradas, pulverizadas foram mantidas a -80°C até a realização da extração de proteínas.



**Figura 13.** Coleta de xilema secundário de *E. grandis* e *E. globulus* na unidade do Guaíba da empresa Aracruz celulose.

## **4.2 - Extração de proteínas**

Dois métodos de extração foram testados para ambos os tecidos, o método TCA/Acetona descrito por Pionneau e colaboradores (1999) e o método de extração fenólica descrito por Wang e colaboradores (2003), com algumas modificações.

### **4.3 - Extração ácida (TCA/Acetona)**

Para a extração utilizando o método TCA/Acetona foram utilizados 5,0 g de xilema e folhas pulverizados como descrito no item coleta de amostras. O material foi distribuído em 20 tubos de 2 mL (0.25g para cada tubo), ressuspendido com 1.5 mL da solução TCA/acetona (10:90) e incubado por 1 hora a -20°C para a precipitação das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.700 g a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2 vezes com solução de 2-β-mercaptoetanol a 0,07% (p/v) em acetona e centrifugados nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi seco no concentrador a vácuo (Microtube, modelo 5301) por 30 min. Em seguida, o precipitado de um dos tubos foi utilizado na quantificação de proteínas extraídas de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

Para a análise em gel bidimensional, 200 µg de proteínas dos precipitados das extrações foram ressuspendidas em 350µl do tampão de re-hidratação (“IEF buffer”), composto por 8M de uréia, 2M de tiouréia, 2% (v/v) de CHAPS 0.5% (m/v) de anfólitos, visando a solubilização das proteínas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.700 g a 4°C por 2 min. Ao sobrenadante coletado foi adicionado azul de bromofenol (0.002% m/v), e esta mistura aplicada em tiras de gradiente de pH “strips” de 13 cm com faixa de pH não linear (4-7). As tiras embebidas com as amostras foram incubadas por 12 horas à temperatura ambiente e posteriormente utilizadas para a análise em gel bidimensional.

### **4.4 - Extração fenólica**

Para o método de extração fenólica também foram utilizados 5 g de xilema e folhas pulverizados. As amostras foram distribuídas em tubos de 2 mL (0.25 g em cada tubo), ressuspendidas em 1,5 mL de acetona gelada, homogeneizadas por 30 s utilizando “vortex” e centrifugadas a 11.700 g a 4°C por 5 minutos. Este procedimento foi repetido e os precipitados resultantes lavados com solução TCA/acetona a 10% (m/v) de 3 a 4 vezes para a

remoção de compostos secundários. Para a remoção do TCA, os precipitados foram lavados com acetona 80% (v/v) gelada, 2 vezes. A cada lavagem, as amostras foram homogeneizadas utilizando o “vortex” e centrifugadas como descrito acima. Após a lavagem, o precipitado de cada tubo foi ressuspensionado com 0,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8.0 100 mM contendo 30% de sacarose (m/v), 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-β-mercaptoetanol e 1% (m/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), homogeneizado por 30 s e sonificado por 20 min. Em seguida, 0.8 mL de fenol (pH 8.0) foi adicionado à mistura, homogeneizado no “vortex” e centrifugado nas condições descritas acima.

A fase fenólica de cada uma das extrações foi coletada e transferida para outro tubo. Às fases fenólicas coletadas foram adicionados 1 mL de solução de acetato de amônio a 0,3 M em metanol. Estas misturas foram incubadas a -80°C para a precipitação de proteínas, após 2 horas as misturas foram centrifugadas a 11.700 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com acetona a 80% (v/v). A concentração de proteínas nos precipitados foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Os precipitados obtidos ao final do procedimento foram utilizados como fonte de proteínas, para tanto 200µg de proteínas foram ressuspensionados com 350µL do tampão de re-hidratação, nas mesmas condições descritas para o método de extração ácida. O procedimento de extração fenólica foi realizado em triplicata técnica, ou seja, cada triplicata do gel provinda de uma extração diferente da mesma amostra, totalizando 12 extrações para as árvores amostradas. As extrações foram denominadas Eg 1, Eg 2 e Eg 3 para *E. grandis*; Egl 1, Egl 2, Egl 3 para *E. globulus* e Ccx 1, Ccx 2, Ccx 3; Ccf 1, Ccf 2, Ccf 3 para xilema e folha respectivamente de *C. citriodora*.

#### **4.5 - Eletroforese bidimensional (2-DE)**

Os perfis de proteínas das amostras de xilema extraídas (Eg1, Eg2, Eg3; Egl1, Egl2, Egl3 e Ccx1, Ccx2, Ccx3) e folhas de *C. citriodora* (Ccf1, Ccf2, Ccf3) foram analisados por eletroforese bidimensional. Para as amostras de xilema e folhas de *C. citriodora*, tiras de gradiente de pH (“strips”) de 13 cm com gradiente não linear de pH variando de 3 a 11 (Amersham biosciences cód 17-6003-75) foram embebidas por 14 horas em 350µL de tampão de re-hidratação contendo 200µg de proteínas extraídas para cada um dos tecidos.

Para as amostras de xilema de *E. grandis* e *E. globulus*, tiras de gradiente de pH (“strips”) de 13 cm com gradiente não linear de pH variando de 4 a 7 (Amersham biosciences cód 17-6001-13) foram embebidas por 14 horas em 350µL de tampão de re-hidratação

contendo 200µg de proteínas extraídas do xilema de cada uma das espécies. A corrida da primeira dimensão foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 30 min, 1000 V por 30 min, 3500 V por 01h30min e 3500 V por 05h30min, com limite superior de corrente elétrica de 3mA e potencial de 5W, a 15°C totalizando 8 horas de corrida, seguindo instruções do fabricante (Amershan biosciences). Após a focalização isoeletrica, as “strips” foram estocadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

Para a segunda dimensão, as os géis de 1ª dimensão foram incubadas em tampão de equilíbrio Tris-HCl 50mM pH 8.8 contendo 6M de uréia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de SDS, 0,002% (p/v) de azul de bromofenol e 2,5% (p/v) de iodoacetamida ou 1% (p/v) de Ditiotreitól (DTT). Após 15 minutos de incubação para cada solução, as “strips” foram colocadas na parte superior da cuba de eletroforese em contato com o gel de poliacríalmida a 12% (18 x 16 x 0,1 cm). O sistema foi vedado com solução selante contendo 0,25 M de Tris-base, 1,92M de glicina, 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5% (p/v) de agarose e 0,002% (p/v) de azul de bromofenol. A corrida eletroforética sob refrigeração a 20°C, foi realizada a voltagem constante de 250 volts por 4 horas. Os géis foram corados com nitrato de prata como descrito por Blum *et al.*, (1987).

No total foram realizados 12 géis bidimensionais correspondentes às 12 extrações (triplicatas técnicas).

#### **4.6 - Análise das imagens**

A digitalização das imagens dos géis foi feita utilizando um “scanner” (“hp scanjet” 8290) com alta resolução. As imagens digitalizadas foram salvas em modo Tiff e analisadas no software Bionumerics v. 4.5 (Applied-maths).

Tanto os géis de xilema e de folha de *C. citriodora* (pH 3- 11), quanto os géis de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* (pH 4-7) foram realizados em triplicata, cada um utilizando uma réplica técnica da extração.

A busca nos géis bidimensionais por pontos que representam as proteínas e são denominados de “spots” foi feita de modo automático com os seguintes parâmetros: 25 pixels para “estimated spot size”, 3 pixels para “minimum spot size” e 75% para “spot contrast enhancement”. Após a detecção automática, foram realizadas detecções manuais de “spots” quando estes não foram reconhecidos pelo programa ou deleções quando o programa reconhecia erroneamente manchas ou bolhas como “spots”. Em seguida, os géis foram sobrepostos para verificar a reprodutibilidade das extrações, onde e os “spots” são encaixados

de modo que fiquem alinhados ao seu respectivo no segundo gel. Linhas de regressão baseadas no volume relativo dos “spots”, foram geradas com  $p < 0.020$  para avaliar a acurácia da sobreposição, indicando também aqueles “spots” mais discrepantes, chamados “outliers”. Esta sobreposição de imagens se dá pela determinação dos pontos de referência, que são os “spots” em comum, mais intensos de cada amostra. Foram feitos cálculos de resíduo considerando  $p < 0.0001$  para a determinação dos “outliers” nas amostragens intra-específicas. O mesmo foi feito interespecificamente, entre *E. grandis* e *E. globulus*, para a determinação das proteínas diferenciais e em comum. Para a determinação das massas moleculares e pontos isoelétricos foram utilizados marcadores de massa molecular (Sigma-Aldrich MW: 12,000-70,000) e ponto Isoelétrico (Amershan biosciences pI: 3-11 não linear).

Os “spots” com volumes acima de 100.000, em comum e diferenciais em géis de *E. grandis* e *E. globulus*, e os mais intensos em géis de folha e xilema de *C. citriodora*, foram recortados dos géis e armazenados em tubos de 1.5mL para serem descorados, digeridos com tripsina e utilizados nas análises espectrométricas.

#### **4.7 - Detecção dos “spots” e identificações feitas por espectrometria de massa**

A seleção dos “spots” a serem analisados por espectrometria de massa foi feita em função dos valores de intensidade dos “spots”, pI e massa molecular. Sendo selecionados os “spots” com maior ou menor valores de intensidade e que apresentaram valores de pI e massa molecular correspondentes aos de enzimas da via de lignificação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores de pI e massa molecular de enzimas da via de lignificação em diferentes espécies de plantas.

<b>Proteína</b>	<b>Organismo</b>	<b>MM (kDa)</b>	<b>PI</b>
CCoAOMT	<i>Eucalyptus gunnii</i>	29.91	5.01
CCoAOMT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13.92	5.53
CCoAOMT	<i>Pinus taeda</i>	29.14	5.44
CAD	<i>Eucalyptus globulus</i>	38.8	5.66
CAD	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.09	5.33
CAD	<i>Pinus taeda</i>	25.73	6.5
4CL	<i>Eucalyptus calmadulensis</i>	59.36	5.35
4CL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	53.11	4.96

#### **4.8 - Preparação dos “spots” para as análises de espectrometria de massa**

Para as análises de espectrometria de massa as proteínas de interesse foram descorados, digeridos com tripsina e os peptídeos resultantes purificados. Inicialmente, os “spots” selecionados foram descorados de acordo com Baghdady, *et al.* (2006). Para tanto os “spots” de interesse recortados dos géis foram transferidos para tubos de 1.5 mL e lavados três vezes com 1mL de água destilada, deionizada estéril. Em seguida, foram adicionados a cada tubo, 200µl de tiosulfato de sódio 100 mM e 200µl de ferrocianeto de potássio 30 mM, esta mistura foi incubada à temperatura ambiente. Após 20 min. os “spots” foram novamente lavados três vezes com água destilada/deionizada estéril e finalmente lavados três vezes com 200 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM em 50% (v/v) de acetonitrila.

As proteínas dos “spots” selecionados foram digeridas com tripsina (Trypsin Gold - Promega sequencing grade, V528A, lote 216994), de acordo com Shevchenko *et al.*, (2001). Para a digestão, os spots de interesse descorados foram lavados três vezes com etanol 50% (v/v), aos tubos contendo o “spots” foram adicionados 300µl de acetonitrila e estes foram secos no concentrador a vácuo por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 50µl de DTT 100mM em solução de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 100mM e incubados a 56°C. Após 1 hora de incubação a solução foi removida e substituída por 50µl de iodoacetamina 55mM em 100mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 45 min em temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, os spots foram lavados 2 vezes com 100µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100mM, desidratados pela adição de 100µl de acetonitrila e secos em um concentrador a vácuo. Em seguida, os spots foram re-hidratados com 50 µl da solução de tripsina (600 ng de tripsina em 50 mM de

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>). Em seguida, o sobrenadante foi substituído pela mesma solução sem tripsina (50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>) e incubados durante 14 horas a 37°C.

Após 14 horas os tubos contendo as proteínas dos “spots” digeridas com tripsina foram incubados em um sonificador por 10min. Em seguida, foram adicionados aos tubos 40µl de água destilada/deionizada estéril e novamente incubados no sonificador. Após 10 min. de incubação adicionou-se 40µl de Acetonitrila/H<sub>2</sub>O/TFA (66:33:0.1; v/v/v) a cada tubo, que foram novamente incubados no sonificador. Passados 15 min, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo limpo, e o mesmo procedimento de lavagem, foi repetido mais uma vez. Por fim, os sobrenadantes resultantes das lavagens, foram reunidos no mesmo tubo para cada amostra e concentrados à vácuo por aproximadamente 1 hora.

#### **4.9 - Espectrometria de massa**

Os peptídeos extraídos de xilema e folha de *C. citriodora* e xilemas de *E. grandis* e *E. globulus* foram analisados utilizando a técnica de espectrometria de massa de acordo com Henzel *et al.*, (1993). As amostras foram preparadas para análise em um espectrômetro do tipo MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionized Time of Flight-Time of Flight) em um Ultraflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

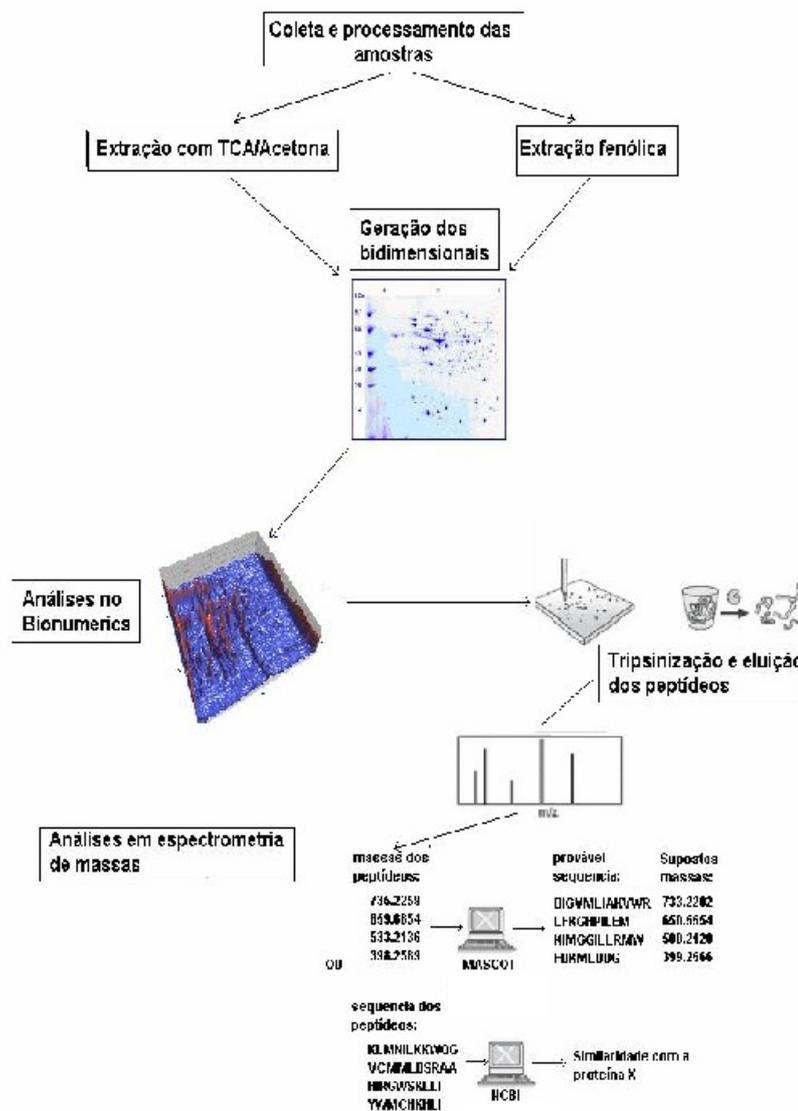
As amostras concentradas foram ressuspensas em 5µl de TFA 1%, e 2µl de cada amostra foram separadas e adicionados 6µl de uma matriz composta por ácido sinapínico (em uma solução dissolvida de acetonitrila/ TFA 0.1%; v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em um vortex e 0,5µl foi aplicado no ultraflex II. As amostras foram secas em temperatura ambiente e o espectrômetro foi operado em modo linear para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina e em modo refletido para re-fragmentação de íons para sequenciamento “de novo”. Os íons das amostras foram submetidos à irradiação automatizada, onde o laser foi operado com potência modulada (baixa para alta), com 200 tiros aleatórios utilizando um método de procura hexagonal. Os espectros resultantes foram analisados manualmente usando ambos os programas Pepseq e FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics programs).

##### **4.9.1 - Análises das seqüências e mapas peptídicos**

Os “spots” de interesse foram submetidos à espectrometria de massa e identificados por “Peptide mass fingerprinting” (PMF) ou por sequenciamento “de novo” (MS/MS). As

massas dos peptídeos, correspondentes aos “spots” de interesse, encontradas por PMF foram comparadas no banco de dados não redundante do NCBI utilizando o software MASCOT (MASCOT v 2.1, Londres. <http://www.matrixscience.com>) assumindo carboximetilação e oxidação da metionina como modificações. Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores “scores” e área de cobertura, verificando-se também a correspondência entre massa molecular e ponto isoelétrico dos “spots” e das proteínas encontradas no banco de dados, para maior acurácia na identificação das proteínas de interesse.

O sequenciamento “de novo” foi manualmente executado utilizando-se os softwares Flex analysis e Pepseq, através da comparação das massas dos aminoácidos e as distâncias entre os picos, gerando as seqüências que por sua vez, foram anotadas. Em seguida, foi feita uma procura no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se a ferramenta Blastp, para se comparar a seqüência do fragmento encontrado com as proteínas do banco. Critérios como a porcentagem em “score”, massas moleculares e espécies à qual pertenciam as proteínas foram levados em conta para evitar interpretações equivocadas. As seqüências dos peptídeos das proteínas envolvidas na via de lignificação identificadas no xilema de *C. citriodora* foram comparadas ao banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) e as seqüências daquelas que se assemelhavam ao fragmento do peptídeo foram anotadas. As seqüências obtidas também foram comparadas ao banco de dados de ESTs do GENOLYPTUS, através do programa SSAHA (Sequence Search and Alignment by Hashing Algorithm) (Ning, *et al.*, 2001).



**Figura 12.** Fluxograma das estratégias de execução das análises de proteínas do xilema e folha de *C. citriodora* aplicadas em xilema de *E. grandis* e *E. globulus*.

## 5– RESULTADOS

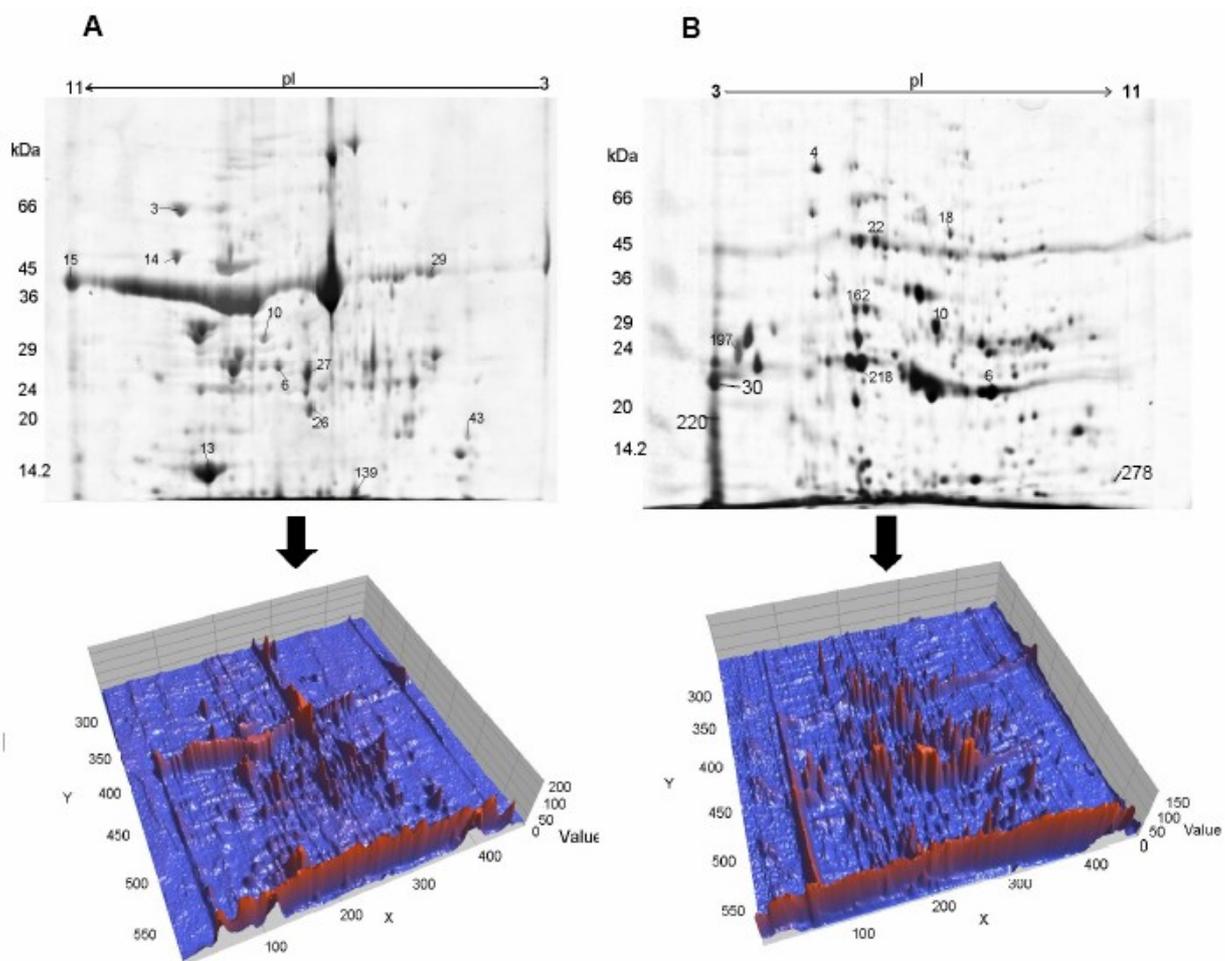
## **5 - RESULTADOS**

### **5.1 – Coleta do material e estabelecimento do método de extração de proteínas**

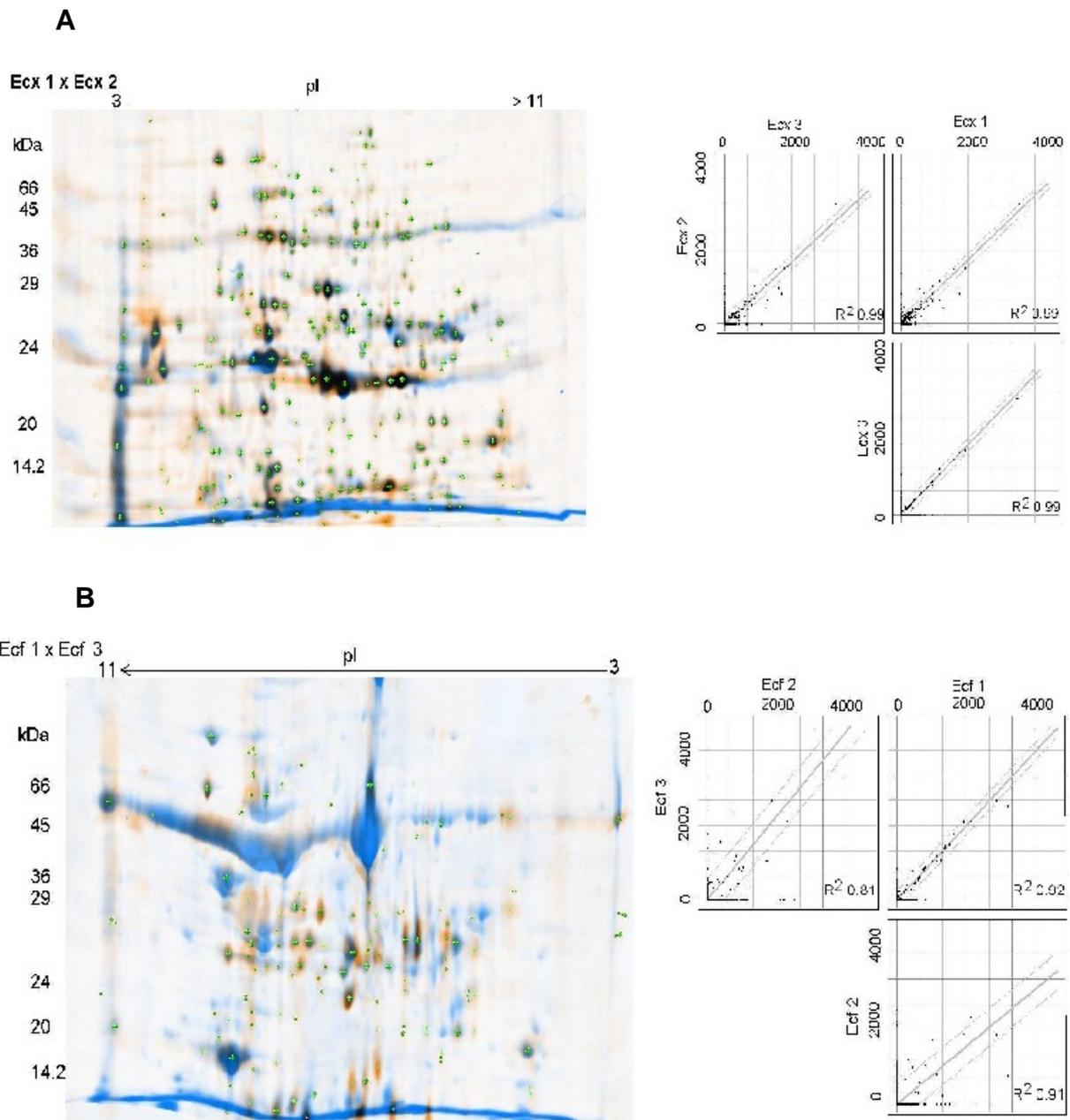
Os géis bidimensionais para as amostras extraídas utilizando-se o método ácido apresentaram uma baixa definição dos “spots”, além de alta concentração de compostos interferentes visualizados pela presença de faixas escuras e manchas após a coloração com nitrato de prata (resultado não mostrado). Para as amostras extraídas com fenol os géis apresentaram uma boa definição com “spots” evidentes e bem definidos, bem como maior número destes e maior reprodutibilidade entre as réplicas técnicas. Além disto, a quantidade de proteínas detectadas para as amostras extraídas com o método de extração fenólica foi aproximadamente 3 vezes maior do que o detectado na extração ácida (TCA/Acetona).

### **5.2 – Análises intra-específicas**

Para os bidimensionais das amostras Ccf e Ccx foram encontrados 392 e 551 “spots”, respectivamente, sendo que o maior número de “spots” foi detectado nas faixas de pH 4 a 7 e massa molecular de 10 a 70 kDa, para ambos os tecidos (Fig 14a e 14b). Para as réplicas de Ccx foi obtido um valor médio dos coeficientes de correlação de 0,99 indicando a reprodutibilidade das extrações (Figura 15a). Já para Ccf o valor médio dos coeficientes de correlação obtido foi 0,88 e a diferença no padrão de “spots” dos géis bidimensionais é facilmente visualizada nas linhas de regressão, principalmente entre Ccf 2 e Ccf 3 (Figura 15b).

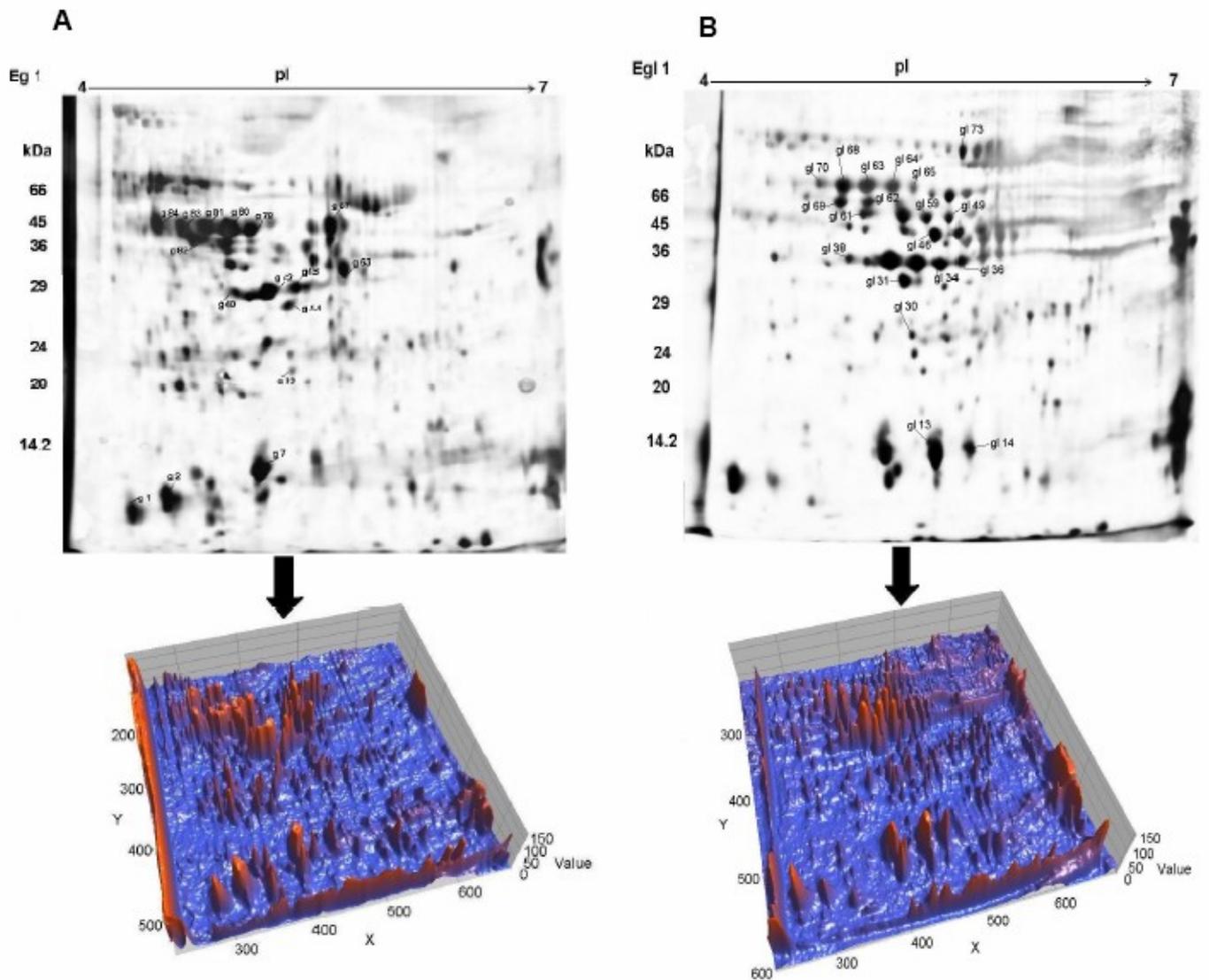


**Figura 14.** Análise em 2DE das extrações de *C. citriodora* mostrando suas respectivas imagens em 3DE feitas no software Bionumerics. **(A)** Ccf 1 e **(B)** Ccx1. Os números indicam as proteínas identificadas por espectrometria de massa referentes à tabela 2. As imagens em vista tridimensional mostram a intensidade dos “spots” mais evidentes e em escala de mm.

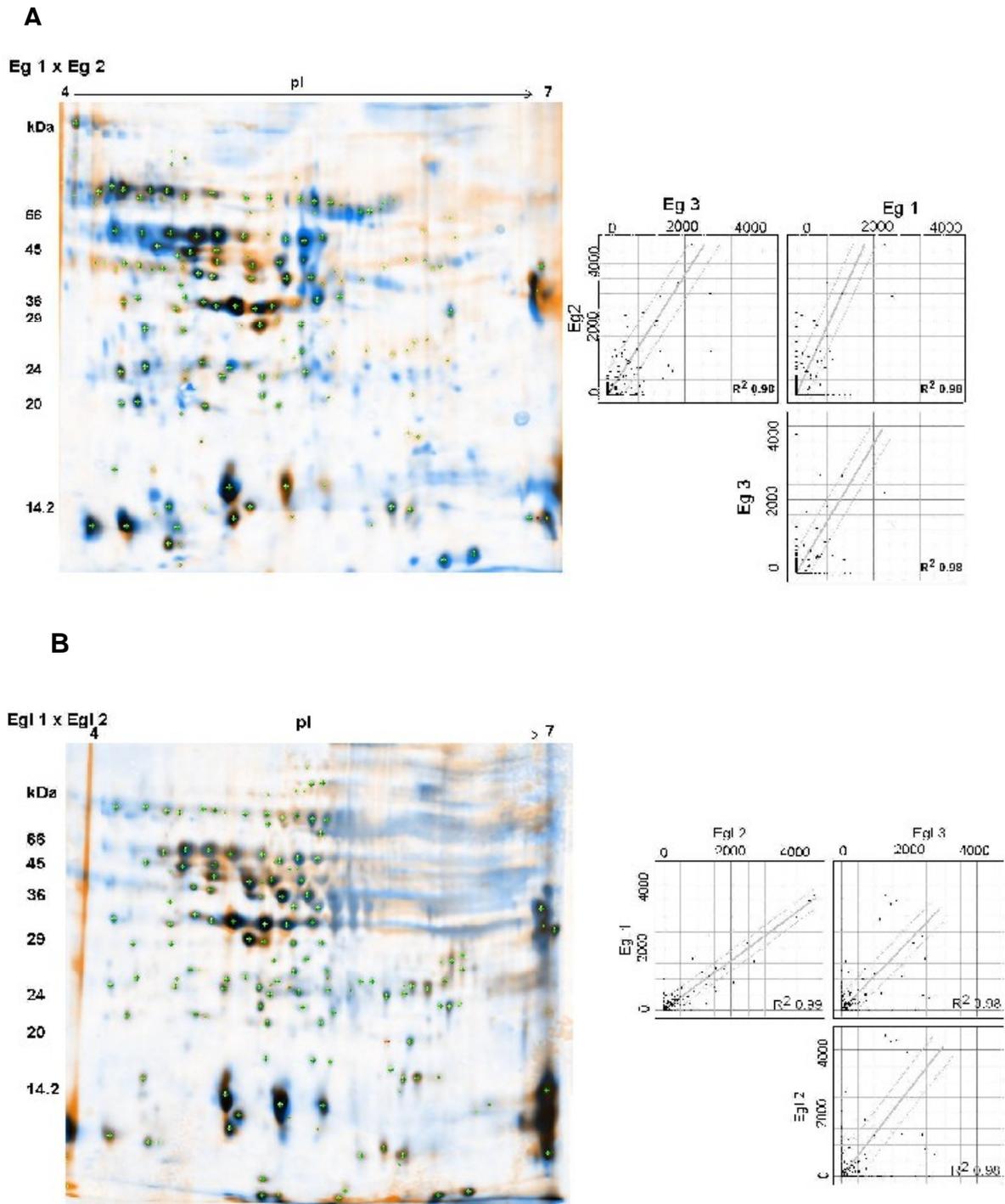


**Figura 15.** Sobreposição das réplicas técnicas dos géis 2DE de amostras de xilema e folha de *C. citriodora* e suas respectivas linhas de regressão. **(A)** Ccx1 e Ccx 2 e **(B)** Ccf 1 e Ccf 3. Em azul, o gel de referência para as amostras de nº 1. Em laranja, o gel a ser comparado. Os sinais de + em verde demonstram os “spots” utilizados como “landmarks” nas análises feitas no software Bionumerics. O R nas linhas de regressão indica o índice de correlação entre as 3 réplicas técnicas, e os números correspondentes ao eixo Y de cada gráfico indica o volume dos “spots”.

Nos géis 2-DE de xilema de *E. grandis* (Eg) e *E. globulus* (Egl) foram encontrados 394 e 313 “spots” para cada uma das repetições, respectivamente (**Fig 16a e 16b**). O valor médio dos coeficientes de correlação foi de 0,98 para ambas as amostras (**Figura 17a e 17b**).



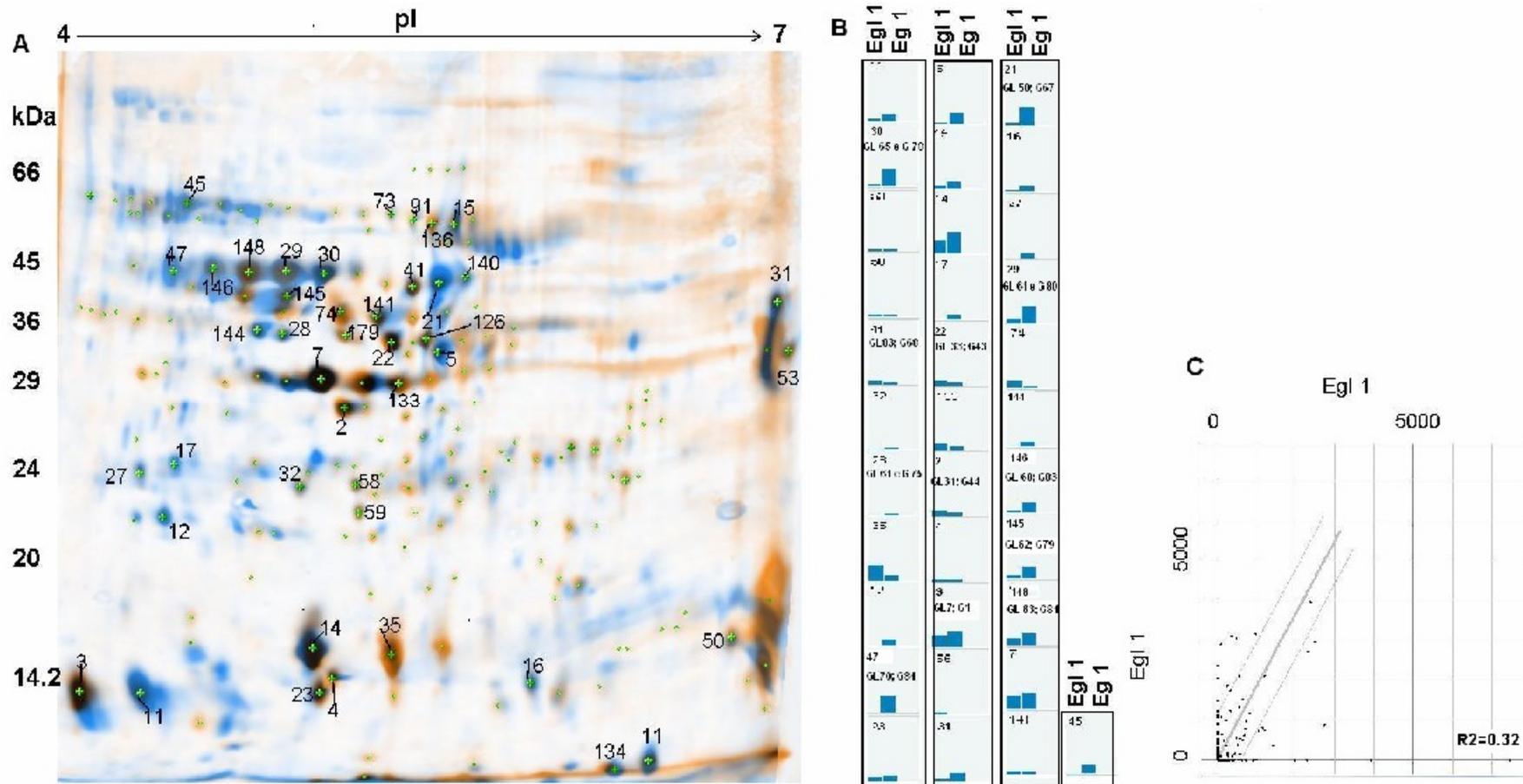
**Figura 16.** Géis bidimensionais para as amostras Eg1 (A) e Egl 1(B), mostrando suas respectivas imagens em 3D feitas no software Bionumerics. Os números indicam as proteínas identificadas mostradas na tabela 2. As imagens em visualização tridimensional mostram a intensidade dos “spots” mais evidentes e em escala de mm.



**Figura 17.** Sobreposição das réplicas técnicas de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* e suas respectivas linhas de regressão. (A) Eg 1 x Eg 2 e (B) Egl 1 x Egl 3. Em azul, o gel de referência para as amostras de nº 1. Em laranja, o gel a ser comparado. Os sinais de + em verde demonstram os “spots” utilizados como “landmarks” nas análises feitas no software Bionumerics. O  $R^2$  nas linhas de regressão indicam o índice de correlação entre as 3 réplicas técnicas, e os números correspondentes ao eixo Y de cada gráfico indica o volume dos “spots”.

### ▣ 5.3 – Análises inter-específicas

Os “spots” detectados para as amostras Eg 1 e Egl 1 foram alinhados e automaticamente numerados nos géis bidimensionais das duas amostras (**Figura 18a**). Foram detectados 34 “spots” em comum entre Eg 1 e Egl 1 e estes foram comparados quanto ao seu volume. A partir desta comparação foram gerados histogramas (**Figura 18b**), que possibilitam a visualização do padrão de expressão diferencial da proteína em comum. As diferenças mais significativas foram observadas para os “spots” de número 9, 14, 21, 29, 31, 35, 45, 74, 145, 146 e 148, que obtiveram variações de 0,6 a 2,5 vezes quando seus volumes foram comparados (**Figura 18b**). O coeficiente de correlação obtido para a regressão entre os valores de volume destas duas amostras foi de 0.32 (**Figura 18c**).



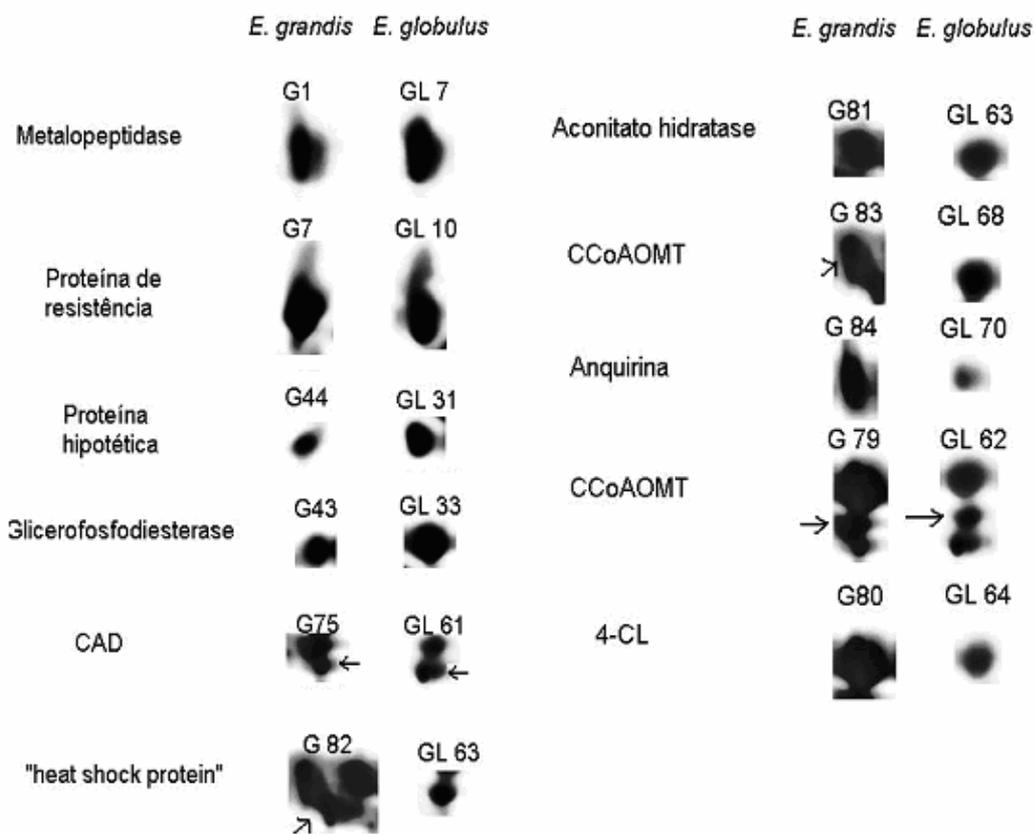
**Figura 18.** Sobreposição entre as imagens dos géis 2DE de *E. grandis* x *E. globulus* das réplicas Eg 1 e Egl 1 (a) Numeração dos “spots” em comum na figura de sobreposição; (b) comparação dos níveis de expressão, com base no volume dos “spots” em comum entre Eg 1 e Egl 1. Os “spots” identificados por espectrometria de massa, em comum nas duas amostras, estão indicados de acordo com sua identificação na tabela 2 (c) linha de regressão e coeficiente de correlação entre as réplicas das extrações a partir do volume dos “spots”.

#### 5.4 - *C. citriodora*

Dos 20 “spots” de *C. citriodora*, 7 foram seqüenciados, como descrito na metodologia, obtendo-se seqüências de aproximadamente 15 aminoácidos, os demais (13) foram identificados por PMF (**Tabela 2**). Para folhas de *C. citriodora*, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo energético (RuBiSCo), estruturais (miosina), proteínas relacionadas à defesa a estresse abiótico (“*heat shock protein*”) e produção de compostos secundários, como os flavonóides (Isoflavona redutase). Uma isoforma de isoflavona redutase relativa a *Vitis vinifera* (uva), foi encontrada no xilema da mesma planta, com a diferença de apenas 1 aminoácido no fragmento identificado. Esta isoforma apresentou valores de ponto isoelétrico e massa molecular distintos dos obtidos para a de folha (Tabela 2). As demais proteínas observadas no xilema de *C. citriodora* tratam-se de proteínas envolvidas na produção de lignina, uma 4CL similar à 4CL 1 de *Populus tomentosa* (álamo), e uma CAD, similar à encontrada em *Aralia cordata* (Carobão) (Tabela 2).

#### 5.5 – Proteínas em comum entre *E. grandis* e *E. globulus*

Os “spots” de interesse destas duas espécies (*E. globulus* e *E. grandis*), como descrito anteriormente, foram selecionados de acordo com a massa molecular e o pI de proteínas já descritas nos bancos de dados a fim de se identificar enzimas relacionadas à via de lignificação. Os “spots” em comum, listados na Tabela 2, são: (GL 7 e G 1) identificado como uma metalopeptidase pertencente à classe das proteases; (GL 70 e G 84) anquirina e (GL 50 e G 67) actina, que se agrupam na classe de proteínas estruturais. As proteínas agrupadas na classe de metabolismo são: (GL33 e G43), glicerofosfodiesterase e (GL 63 e G 81), aconitato hidratase, proteínas de resposta à estresse, denominadas *heat shock protein binding* (GL 69 e G 82), e as proteínas hipotéticas, (GL 31 e G 44). Na classe das proteínas envolvidas na via de lignificação, tem-se 2 isoformas de CCoAOMT (GL 68 e G 83; GL 62 e G79), uma de 4CL (GL 64 e G 80), uma de CAD (GL 61 e G 75) e uma de S-adenosil metionina sintetase (GL 65 e G 78), que sintetiza o doador de grupo metil para a CCoAOMT. Todas estas proteínas, quando comparadas a nível de expressão baseados no volume relativo dos “spots” correspondentes, demonstraram padrões diferenciais de expressão (**Figura 19**).



**Figura 19.** Proteínas em comum entre *E. grandis* e *E. globulus* e seu padrão de expressão diferencial mostrado pelo volume relativo dos “spots”.

### 5.6 - Proteínas diferenciais entre *E. grandis* e *E. globulus*

Das 25 proteínas identificadas em *E. globulus*, 13 são diferentes daquelas encontradas em *E. grandis* (Tabela 2), sendo agrupadas nas seguintes classes: Proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio (glutamina sintetase), transporte de DNA (transposase), transporte de elétrons, (subunidade II da citocromo oxidase), metabolismo de lipídios (lipoxigenase), proteínas de membrana (anquirina), proteínas ligantes a zinco (DC1), biossíntese de terpenos (Germacrene A), e proteínas relacionadas à resistência e defesa das plantas (proteína de resistência, Isoflavona redutase e fenilcoumarana benzílico éter redutase). Foram identificadas também enzimas da via de lignificação, uma CAD, duas CCoAOMT, similares às enzimas correspondentes em *Brassica napus* (couve) e *E. globulus*, respectivamente. Bem como, 1 S-adenosilmetionina sintetase, semelhantes a *Tripanossoma brucei* e as proteínas hipotéticas e não identificadas (Tabela 2).

Para *E. grandis*, das 18 proteínas identificadas, 4 são diferentes das encontradas em *E. globulus* (Tabela 2) e pertencem às classes de: metabolismo de carboidratos (acil CoA desidrogenase, piruvato quinase,) do “splicing” do DNA (maturase), resistência e defesa (CuZn-superóxido dismutase).

### **5.7 - Análises no Banco de dados de ESTs do Genolyptus**

As análises das seqüências no banco de dados do Genolyptus, identificou uma CCoAOMT, 4 isoflavonas redutase, actina e miosina, bem como as proteínas cloroplásticas encontradas em folhas de *C. citriodora*, e àquelas relacionadas ao metabolismo, totalizando 60% de identidade com as seqüências lançadas. Foram utilizados todos os consensos de ESTs do projeto, perfazendo 21432 seqüências após a aglomeração das ESTs.

**Tabela 2.** Proteínas de *Eucalyptus* spp identificadas por análise em espectrometria de massa

*C. citriodora*

Spot n°	Tecido	Método	Acesso da proteína similar	“Score”	Proteína similar	pI e Massa	Sequência	Espécies
27	Folha	MS/MS	Q3KN69	100	isoflavone reductase-like protein 4	6.06 / 24.30	FLPSEFGNDVDR	<i>Vitis vinifera</i>
6	Folha	MS/MS	P25697	78	Phosphoribulokinase, chloroplast precursor	6.67 / 25.42	IVWILHPMFDQR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
13	Folha	MS/MS	Q04127	91	Oxygen-evolving enhancer protein 2-3, chloroplast precursor	8.12 / 14.2	EVEYPGQVLR	<i>Nicotiana tabacum</i>
218	Xilema	MS/MS	Q3KN68	100	isoflavone reductase-like protein 5	7.99 / 31.41	FFPSEFGNDVDR	<i>Vitis vinifera</i>
6	Xilema	MS/MS	Q39160	77	Myosin	5.27 / 26.74	EWIHKKVDSTR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
10	Xilema	MS/MS	P42495	90	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase 1	6.43 / 37.21	GGVHHMGVKLR	<i>Aralia cordata</i>
18	Xilema	MS/MS	Q4JL28	100	4-coumarate:CoA ligase 1	6.14 / 42.53	GYHMTEAGPVR	<i>Populus tomentosa</i>
139	Folha	MS	Q5N8F3	75	Hypothetical protein P0510F09.2	5.10 / 13.04	*	<i>Oryza sativa</i>
26	Folha	MS	Q6L3H8	70	Hypothetical protein	6.02 / 19.58	*	<i>Solanum demissum</i>
10	Folha	MS	Q2QN58	70	Chorismate mutase, chloroplast, putative, expressed	6.97 / 30.68	*	<i>Oryza sativa</i>
43	Folha	MS	Q7XPQ3	90	OSJNBa0053K19.20 protein	3.00 / 17.07	*	<i>Oryza sativa</i>
14	Folha	MS	Q2XX16	82	Phospholipid transfer protein 1	8.81 / 66.00	*	<i>Zea mays</i>

3	Folha	MS	AAF27639	80	Heat shock protein 70	8.74/109.31	*	<i>Arabidopsis thaliana</i>
29	Folha	MS	Q69P75	77	Epstein-Barr virus EBNA-1-like protein	3.50 / 53.60	*	<i>Orysa sativa</i>
15	Folha	MS	Q32552	89	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	11.00/42.24	*	<i>Musa acuminata</i>
197	Xilema	MS	Q9LSM3	70	Hypothetical protein At5g65520/K21L13_2	10.51/32.42	*	<i>Arabidopsis thaliana</i>
4	Xilema	MS	ABA93898	80	Retrotransposon protein, putative, Ty3- gypsy subclass	8.89/66	*	<i>Orysa sativa</i>
162	Xilema	MS	C86285	75	Probable oxidoreductase F9L1.8	8.09/5.13	*	<i>Arabidopsis thaliana</i>
30	Xilema	MS	Q9AY24	76	Ribosomal protein ps4 (Fragment)	11.00/29.78	*	<i>Timmia austriaca</i>
22	Xilema	MS	Q9LUE6	79	UDP-glucose:protein transglucosylase; reversibly glycosylated polypeptide	7.67/41.2	*	<i>Arabidopsis thaliana</i>

---

*E. globulus*

---

GL65	Xilema	MS/MS	AF187820_1	100	S-adenosylmethionine synthetase	7.02/46.53	AGMFGHFGR	<i>Pinus contorta</i>
GL59	Xilema	MS/MS	NP_194368.1	100	DC1 domain-containing protein	4.05/23.64	CTWIYRNHPR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GL30	Xilema	MS/MS	XP_845606	100	S-adenosylmethionine synthetase	3.78/34.01	RCFGHFGR	<i>Trypanosoma brucei TREU927</i>
GL31	Xilema	MS/MS	VITISV_0326 85	100	Putative uncharacterized protein	5.86/16.82	HHIFHH	<i>vitis vinifera</i>
GL70	Xilema	MS/MS	ABS72112.1	87	Ankyrin repeat-rich protein	4.75/46.00	SPSAYGQWEVVQC	<i>Solanum tuberosum/A. thaliana</i>
GL13	Xilema	MS/MS	ABB00227.1	87	disease resistance protein	7.00/14.2	EIVPSWFNR	<i>Arabidopsis thaliana</i>

GL61	Xilema	MS/MS	AAD18000.1	100	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	5.32/42.93	RLVLETSPASGK	<i>Eucalyptus globulus</i>
GL36	Xilema	MS/MS	AF489964_1	100	germacrene A synthase LTC1	5.83/21.83	PEYIRPPK	<i>Lactuca sativa</i>
GL34	Xilema	MS/MS	CAA06707.1	100	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	6.33/19.95	KHPTFAIVR	<i>Populus trichocarpa</i>
GL14	Xilema	MS/MS	CAA53730.1	100	Lipoxygenase loxN2	5.73/57.93	SSDPVQMPY	<i>Pisum sativum</i>
GL38	Xilema	MS/MS	CAA06707.1	100	phenylcoumaran benzylic ether reductase	6.44/21.40	KHPTFALVR	<i>Populus trichocarpa</i>
GL63	Xilema	MS/MS	A3KSZ2-1	88	Aconitate hydratase 2	5.89/52.00	KVFIGGCMGDQITGR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719
GL46	Xilema	MS/MS	AC077693_11	100	putative transposase	4.04/14.16	KEVFSER	<i>Oryza sativa (japonica</i> <i>cultivar-group)</i>
GL64	Xilema	MS/MS	YP_728876.1	100	4 Coumarate CoA Ligase	5.56/40.32	RQVVVMWESK	<i>Ralstonia eutropha H16</i>
GL73	Xilema	MS/MS	BAC10935.1	100	cytochrome oxidase subunit II	5.66/66.00	REIVIPYQR	<i>Semanotus japonicus</i>
GL62	Xilema	MS/MS	ABE41833.1	90	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	4.56/46.00	RYSDFVLELNK	<i>Brassica rapa subsp.</i> <i>pekinensis</i>
GL49	Xilema	MS/MS	ABL95956.1	100	Glutamine synthetase	5.68/40.00	EHIAAYGEITNK	<i>Populus tremula x Populus</i> <i>alba</i>
GL33	Xilema	MS/MS	BAD94535.1	90	Glycerophosphodiesterase-like	5.54/21.00	RGYMAAIDDGAIIDSK	<i>A. thaliana</i>
GL 7	Xilema	MS/MS	NP_192809. 1	100	SPT16 (GLOBAL TRANSCRIPTION FACTOR C); metalloexopeptidase	4.5/12.00	RHCSNVAR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GL63	Xilema	MS/MS	NP_174560.1	85	heat shock protein binding	4.56/52.00	KFVYADQPSEK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GL69	Xilema	MS/MS	EAZ17623.1	100	hypothetical protein OsJ_031832	4.3/52.00	KQNTMHNDVSATVVHK	<i>Oryza sativa</i>

G67	Xilema	MS/MS	AAP73448.1	100	Actin	4.98/44.00	KNYELPDGQVITIQR	<i>Gossypium hirsutum</i>
GL10	Xilema	MS/MS	ABB00220.1	95	disease resistance protein	5.03/31.98	KNVPSWNR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GL68	Xilema	MS/MS	AAT74881.1	100	CCoAOMT	4.33/ 52.00	RGDVVEILAK	<i>Eucalyptus globulus</i>
GL28	Xilema	MS/MS	CAO66540.1	88	<i>unnamed protein product</i>	5.23/24.47	SSHLHQHTIQIGGLYVR	<i>Vitis vinifera</i>

---

*E. grandis*

---

G42	Xilema	MS/MS	AAC3251.1	100	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	5.3/25.00	RFFPSEFGNDVDR	<i>Pinus taeda</i>
G80	Xilema	MS/MS	YP_728876.1	100	4 Coumarato CoA Ligase	4.56/52.00	RTVRQVVVMWESK	<i>Ralstonia eutropha H16</i>
G78	Xilema	MS/MS	NP_353394.1	100	S-adenosylmethionine synthetase	5.00/52.00	RSYGHFGR	<i>Agrobacterium tumefaciens str. C58</i>
G33	Xilema	MS/MS	Q98L31-1	85	Acyl-CoA dehydrogenase	5.69/40.81	KHFPGDIVR	<i>Rhizobium loti (Mesorhizobium loti)</i>
G81	Xilema	MS/MS	A3KSZ2-1	88	Aconitate hydratase 2	5.9/25.00	KVFIGGCMGDQITGR	<i>Pseudomonas aeruginosa C3719</i>
G83	Xilema	MS/MS	AAT74881.1	100	CCoAOMT	4.6/52.00	RGDVVEILAK	<i>Eucalyptus globulus</i>
G7	Xilema	MS/MS	ABB00220.1	100	disease resistance protein	5.03/31.98	KNVPSWFNR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
G2	Xilema	MS/MS	CAC33845.1	88	CuZn-superoxide dismutase	4.46/10.00	KLNITGPPSIVGR	<i>Populus alba x Populus tremula var. glandulosa</i>
G40	Xilema	MS/MS	AF143441_1	100	maturase	5.58/31.98	KDPRIHR	<i>Abies holophylla</i>
G44	Xilema	MS/MS	CAN59892.1	85	hypothetical protein	5.9/17.00	KEYFIQK	<i>Vitis vinifera</i>
G1	Xilema	MS/MS	NP_192809.1	100	SPT16 (GLOBAL TRANSCRIPTION	4.2/8.00	RHCSNVAR	<i>Arabidopsis thaliana</i>

FACTOR C); metalloexopeptidase								
G63	Xilema	MS/MS	NP_187055.1	80	pyruvate kinase, putative	5.64/45.63	KTAMEVNTCVPYWR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
G67	Xilema	MS/MS		100	Actin	5.5/51.00	KNYELPDGQVITIQR	<i>Gossypium hirsutum</i>
G82	Xilema	MS/MS	NP_174560.1	85	heat shock protein binding	4.53/49.95	KFVYADQPSEK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
G79	Xilema	MS/MS	ABE41833.1	90	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	4.56/46.00	RYSDVLELNK	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>
G84	Xilema	MS/MS	ABS72112.1	87	Ankyrin repeat-rich protein	4.4/52.00	SAYGQWEVVQC	<i>Solanum tuberosum/A. thaliana</i>
G43	Xilema	MS/MS	BAD94535.1	90	Glycerophosphodiesterase-like	5.32/32.5	RGYMAAIDDGAIIDSK	<i>A. thaliana</i>
G75	Xilema	MS/MS	AAD18000.1	95	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	4.8/49.53	RLVIETPSASGK	<i>Eucalyptus globulus</i>

---

## 5.8 – Análises das seqüências com o banco de dados do projeto Genolyptus

Algumas seqüências sem similaridade na base de dados, foram consideradas nas análises feitas, considerando-se apenas àquelas encontradas no banco de dados do NCBI, pois estas seqüências sem pareamento podem ocorrer por diversas razões:

- 1- As seqüências podem não estarem representadas nas ESTs, e no caso do GENOLYPTUS, a maioria são seqüências apenas de N-terminal;
- 2- Não necessariamente as ESTs conseguem amostrar todos os mRNAs, principalmente se estes forem pouco abundantes;
- 3- O tamanho diminuto das seqüências de alguns peptídeos pode dificultar nas identificações.

## **6 – DISCUSSÃO**

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 – Extração protéica de tecidos vegetais

Um dos grandes problemas na extração de proteínas vegetais é a interferência de compostos secundários e pigmentação da amostra, uma vez que estes podem se ligar às proteínas dificultando a sua remoção no processo de extração e a análise em gel 2DE. As técnicas mais utilizadas são: extração ácida com TCA/acetona e a extração fenólica, mas há variações quanto à metodologia mais adequada para cada um dos tecidos vegetais (ROSE *et al.*, 2004). Para as amostras de xilema e folha de *C. citriodora* utilizadas neste trabalho, o método mais adequado foi o da extração fenólica. As amostras protéicas extraídas utilizando-se esta metodologia foram submetidas à eletroforese bidimensional e os géis apresentaram “spots” protéicos bem definidos e menor interferência de compostos secundários (Figuras 14 e 16), assim como obtido por Celedon *et al* (2007) para amostras de região cambial de *E. grandis*. A extração fenólica remove compostos secundários, carboidratos e ácidos nucleicos de uma mistura protéica, estes podem interferir na eletroforese bidimensional aparecendo após a coloração com nitrato de prata como manchas (HURKMAN E TANAKA, 1986; WANG *et al.*, 2003; FAUROBERT *et al.*, 2007). Sendo assim, este método foi escolhido para a extração de amostras de xilema de *E. grandis* e *E. globulus*.

### 6.2 – Eletroforese bidimensional e identificação de “spots”

Os géis bidimensionais de amostras de xilema e folha de *C. citriodora* e xilema de *E. grandis* e *E. globulus*, como descrito na metodologia, foram realizados em triplicata. As réplicas de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* apresentaram reprodutibilidade, uma vez que o coeficiente de correlação médio da regressão linear entre o volume dos “spots” foi de 0,98 (Figura 17). A correlação entre as repetições garantem que as diferenças nas análises inter-específicas não sejam atribuídas a limitações da técnica e sim a variações no mapa protéico entre os tecidos analisados. Para xilema de *C. citriodora* os dados foram semelhantes aos obtidos para as duas outras espécies testadas (Figura 15a), já os mapas protéicos de folha foram os menos repetitivos com coeficiente de correlação médio entre os volumes dos “spots” de 0,88 (Figura 15b). Outros estudos de proteoma de folhas são encontrados na literatura, mas não fazem referência à reprodutibilidade. A baixa reprodutibilidade poder ser atribuída em

parte à presença de compostos secundários e pigmentos, assim como à intensa atividade metabólica do tecido.

A correlação entre as réplicas técnicas e a normalização das imagens dos géis bidimensionais, depende de vários fatores experimentais como: a perda de amostra durante a re-hidratação da “strip”, que pode ser causada pela variação do tempo de incubação, pela eficiência de transferência da primeira para a segunda dimensão no 2DE; pela coloração dos géis, concentração de proteínas nas amostras, assim como pela a curva padrão de coloração feita durante a análise da imagem pelo “software” (Berth *et al.*, 2007).

Foram encontrados 551, 394 e 313 “spots” protéicos nos géis bidimensionais de xilemas de *C. citriodora*, *E. grandis* e *E. globulus*, respectivamente. O número de “spots” detectados para xilemas de diferentes espécies varia, no entanto a maior parte dos trabalhos descreve a detecção de 220 a 1200 “spots” por extração (PLOMION *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2006; CELEDON *et al.*, 2007). Em estudos da região cambial de *E. grandis*, Celedon e colaboradores (2007) detectaram 438 “spots” para árvores de 6 meses de idade e 523 e 418 “spots” para plantas de 3 e 6 anos de idade, respectivamente. Para folha o número de “spots” obtidos para *C. citriodora* (392) está próximo dos valores descritos na literatura.

Com relação à identificação do proteoma de folha de *C. citriodora* dos 392 “spots” detectados, 11 foram identificados, 3 por seqüenciamento “de novo”, e 8 por PMF, apresentando “scores” acima de 70% (Tabela 2) . A maioria das proteínas identificadas é de origem cloroplástica e participam do metabolismo de energia da planta. Para o xilema desta mesma espécie, 4 proteínas foram identificadas por seqüenciamento “de novo” e 5 por PMF, onde foram identificadas proteínas de diversas classes, discutidas adiante. Em folhas de mutantes de *V. vinifera* dos 190-436 “spots” protéicos detectados, 9 foram identificados por PMF, e 5 deles, por seqüenciamento “de novo”, destes, cerca de 60% são de origem cloroplástica, como por exemplo a Rubisco e a glutamina sintetase (Sauvage *et al.*, 2007).

Para as amostras de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* foram identificadas 42 proteínas, nas seguintes classes: enzimas da via de lignificação, metalopeptidases, proteínas de defesa e resistência, proteínas de resposta a estresse, proteínas do metabolismo de nitrogênio, do metabolismo de carboidratos, proteínas de cloroplasto, proteínas estruturais, de transporte e proteínas hipotéticas (tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos que visam o entendimento da gênese da madeira. DU e colaboradores, em 2006, estudaram a regeneração do sistema vascular secundário de álamo, obtendo 244 perfis espectrométricos para os “spots” de interesse. Destes, 199 foram classificados e 27 estavam envolvidos na formação da parede celular secundária.

Em estudos de xilema de *E. grandis*, Celedon e colaboradores (2007) analisaram o padrão de proteínas em três estágios de desenvolvimento, revelando proteínas em comum e diferenciais entre estes estágios. Dos “spots” detectados, 240 foram identificados de LC-MS/MS (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas). Sendo identificadas proteínas do metabolismo, processos celulares, metabolismo energético, componentes estruturais, proteínas de transportes, proteínas hipotéticas e de função não definida. **6.3 –**

### **6.3 - Análise das imagens**

Um “software” baseado em análises de imagens é um passo crucial nas interpretações biológicas em experimentos de 2DE. Usualmente, são feitas análises como a detecção automática dos “spots” de uma imagem, a normalização dos géis ou sobreposição, que é feita a partir de um gel padrão determinado pelo operador, ou um gel de uma determinada condição ou espécie, e seu controle ou outra espécie. O passo seguinte a ser analisado é a criação dos padrões de expressão e sua descrição em detalhes, com confirmações estatísticas também feitas pelo software. Devido aos altos níveis de erros indeterminados associados às análises em 2DE, é necessária a determinação de coeficientes de variância ou índices de correlação entre as réplicas de amostras vegetais, principalmente entre tecidos como folha, por conterem grande quantidade de pigmentos, que tornam as análises em 2DE, mais passíveis a resultados não confiáveis (ASIRVATHAM *et al.*, 2002) . Nestas análises, foram calculados índices de correlação, onde menor valor foi das réplicas de folha de *C. citriodora* (Figura 15b), que pode ser justificado pela presença de pigmentação, bem como grande quantidade de compostos interferentes. Para os xilemas analisados, os índices de correlação foram altos, indicando acurácia na extração, já que, foram testadas réplicas técnicas.

Os índices de correlação, bem como as sobreposições intra e inter-específicas, foram analisados de acordo com o volume e a intensidade dos “spots”. O volume refere-se à área que aquele “spot” ocupa em relação ao gel inteiro. A intensidade refere-se ao nível de escala de cinza no gel, de acordo com as curvas de calibração geradas pelo “software”, ou seja, quanto mais escuro o “spot”, mais intenso ele é. Nas análises inter-específicas, pode-se observar um índice baixo de correlação (Figura 18c), mesmo depois de ser mostrado na sobreposição das imagens, certo grau de similaridade entre o perfil protéico de *E. grandis* e *E. globulus*. Este índice de correlação de 0,32, pode ser explicado pelo grau de diferença entre o volume dos “spots” em comum (Figura 18b), que têm um padrão de discrepância que variou de 0,6 a 2,5 vezes e também de acordo com os “spots” diferenciais (Figura 18a).

## 6.4 – Proteínas identificadas e comparação entre os níveis de expressão

### Metalopeptidases, proteínas de defesa e proteínas de resposta a estresse

Metalopeptidases hidrolisam ligações peptídicas de substratos protéicos e dependem da ligação de um metal, geralmente zinco, em seu sítio catalítico para catálise da reação. Estas proteínas também possuem importante papel no enovelamento protéico e remodelamento tecidual, podendo estar presentes em regiões de alta atividade celular, como na região cambial do xilema, ou em regiões que sofreram lesões por ação mecânica ou causada por patógenos e pragas (DELL’AICA *et al.*, 2007). Esta proteína foi identificada a partir do xilema de *E. globulus* e *E. grandis* correspondendo aos “spots” GL 7/G 1, respectivamente (Tabela 2 e figura 18). Em estudos feitos com tomate, os níveis de expressão do gene de uma metalopeptidase aumentam quando a planta é inoculada com patógenos ou sujeitas a estresse hídrico ou mecânico (LIU *et al.*, 2001). Os “spots” GL 7/G 1 não apresentaram diferença nos valores de volume, sugerindo que não existe diferença no nível de expressão desta metalopeptidase entre *E. grandis* e *E. globulus* (Figura 18b). Sugere-se que tal enzima possa estar associada à resposta de lesão tecidual no momento da coleta das amostras.

Outras proteínas associadas à defesa em plantas também foram identificadas a partir do xilema destas duas espécies, como isoflavona redutase / fenilcumarana benzílico-eter redutase, proteína de defesa, e proteína de defesa a patógenos, assim identificadas na base de dados “NCBI” (Tabela 2). Destas, 2 isoformas de isoflavona redutase foram identificadas em *C. citriodora*, sendo uma em xilema e outra em folha. Uma proteína da família das IFRs (“Isoflavones reductases”), a fenilcumarana benzílico-éter-redutase, foi encontrada em xilema de *E. grandis* e *E. globulus*, no entanto, não foram observadas diferenças nos volumes dos “spots” correspondentes a estas espécies (G42/GL34), quando visualizado na sobreposição da Figura 18. Porém, em folha de *C. citriodora*, o “spot” correspondente apresentou valor de volume menor (dado não mostrado). Este resultado está de acordo com dados da literatura que sugerem maior expressão de genes de enzimas envolvidas na síntese de isoflavonóides em tecidos lenhosos, como o xilema. Celedon e colaboradores (2007), encontraram em *E. grandis*, 5 isoformas de isoflavona redutases com níveis de expressão aumentados em árvores de 6 meses, no entanto, a taxa de transcritos diminuiu para árvores com três anos de idade.

A biossíntese de compostos de defesa, de desenvolvimento e para sobrevivência das plantas superiores também está relacionada ao metabolismo secundário, tais como síntese de lignanos e isoflavonóides. As isoflavonas redutases fazem parte destas vias metabólicas e,

portanto, possuem importante papel na longevidade e defesa de plantas a patógenos e pragas (GANG *et al.*, 1999).

Proteínas em resposta a stress abiótico foram agrupadas na classe das HSPs (*Heat shock proteins*) e Chaperonas (WANG *et al.*, 2004). As HSPs são um grupo de proteínas que o nível de expressão é aumentado quando as células são expostas a elevadas temperaturas (SWINDELL *et al.*, 2007), atuando no reestabelecimento da homeostase do organismo. Uma HSP 70 foi encontrada em folha de *C. citriodora*, com massa molecular característica de 70 kDa (Tabela 2). Já em xilema de *E. grandis* e *E. globulus*, as HSPs encontradas possuem massa molecular menor (52 kDa). Celedon e colaboradores (2007) encontraram 2 HSPs com mudanças no nível de expressão, mostrando redução do transcrito correspondente em árvores com 6 anos de idade. Com relação ao volume dos “spots” o maior valor foi obtido para a amostra Eg em detrimento das amostras de Egl (“spot”GL63) (Figura 18).

#### Proteínas relacionadas ao metabolismo

Estas proteínas são as mais abundantes em amostras de tecido vegetal, com padrão de expressão variável (PLOMION *et al.*, 2002).

Como esperado em análises proteômicas de folha de *C. citriodora*, as proteínas envolvidas no metabolismo energético, são em sua grande maioria, as de cloroplasto, como a Rubisco, abundante (“spot” 15) nas plantas de um modo geral. Como esta é uma enzima de alta massa molecular, em análises proteômicas encontram-se normalmente, apenas fragmentos. Sua função é captar o dióxido de carbono atmosférico, formando o fosfoglicerato, o primeiro passo do ciclo de Calvin realizado pelas plantas (PASCUAL, *et al.*, 2007). Castro e colaboradores, (2005), observaram em análises proteômicas, o aumento da expressão desta enzima e de outras proteínas relacionadas à fotossíntese, quando submeteram *V. vinifera* a estresse causado por um herbicida, sugerindo uma alteração nos efeitos normais da síntese de energia pela planta, causadas pelo herbicida (CASTRO *et al.*, 2005). Em condições normais, seriam encontrados fragmentos menores desta enzima em géis bidimensionais (CASTRO *et al.*, 2005), corroborando com os dados encontrados para folha de *C. citriodora* (Tabela 2). Outras proteínas provindas do cloroplasto foram encontradas em folha de *C. citriodora*, como uma fosforibuloquinase e uma proteína envolvida na oxigenação, e uma corismato mutase, sendo que, a proteína envolvida na oxigenação apresentou alto nível de expressão na folha desta espécie (Figura 14a).

Proteínas relacionadas ao metabolismo energético das plantas foram encontradas nas três espécies estudadas, como uma glicerofosfodiesterase, encontrada tanto em xilema de *E. grandis*, quanto em xilema de *E. globulus*, com as mesmas massas moleculares e pIs (Tabela 2). O volume dos “spots” variou entre estas espécies sendo que o maior valor foi obtido para *E. globulus* (“spots” GL 33 e G 43) (Figura 18b). Em estudos relacionados à estresse abiótico, foi demonstrado um aumento nos níveis de expressão desta enzima em tabaco (CHOI e SANO, 2007).

Das enzimas pertencentes ao ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs, os “spots” GL 63 e G 81, foram identificados como uma aconitato hidratase, que catalisam a reação de transformação de citrato a isocitrato. Esta enzima também participa da fixação do carbono em plantas.

No metabolismo do nitrogênio, uma glutamina sintetase foi encontrada em xilema de *E. globulus* com baixo padrão de expressão (Figura 16 b “spot” GL 49). Esta enzima catalisa a condensação do glutamato e amônia para formar a glutamina. Pode estar associada também no processamento de mRNA e proteínas, bem como na estabilidade do citoesqueleto. Em estudos proteômicos de estresse a sal em arroz, foi uma das proteínas mais abundantes a serem identificadas, quando, em condições normais, sua expressão é diminuída (YAN *et al.*, 2005), contribuindo com os níveis de expressão encontrados em *E. globulus*.

As lipoxigenases (“spot” GL 14), catalisam a oxigenação de ácidos graxos poliinsaturados, originando moléculas com diversas atividades fisiológicas. Podem estar envolvidas na produção e armazenamento de energia, bem como na resposta de defesa contra pragas e patógenos (VIEIRA *et al.*, 2001).

### Proteínas estruturais

Ma e Yen (1988) mostraram a presença de actina e miosina nos tubos polínicos de plantas superiores, indicando que estas proteínas têm função no fluxo citoplasmático nos tubos polínicos. Estes estudos sugerem que a actina e miosina em plantas superiores são responsáveis pelos movimentos vegetais. Em ervilha (*Pisum sativum*), as massas moleculares da actina e miosina correspondem a 43 e 440 kDa, podendo ter cadeias com massas moleculares que variam de 15 a 30 kDa. Em xilema de *C. citriodora*, o “spot” de n 6 foi identificado como a miosina (Figura 14 b e Tabela 2). Com base nos valores de massa molecular, 24,3 KDa, sugere-se que se trata a uma das cadeias da miosina. Para xilema de *E. grandis*, a actina possui massa molecular de 51 kDa “spot” G67 (Fig 16a; Tabela 2).

### Proteínas transportadoras

Os “spots” GL 70 e G84 foram identificados como a proteína anquirina, sendo que o “spot” detectado para xilema de *E. grandis* apresentou maior valor de volume, indicando a expressão diferencial desta proteína entre *E. grandis* e *E. globulus* (Tabela 2). Anquirinas são proteínas grandes e normalmente acídicas, que transportam outras proteínas integrais da membrana ao citoesqueleto da célula. A presença desta proteína pode indicar possíveis interações proteína-proteína em tecidos vegetais em regeneração ou crescimento (PECK, *et al.*, 2001). As transposases são enzimas que se ligam a uma fita simples de um pedaço do DNA e pode incorpora-lo ao DNA genômico.

Foi encontrada também a subunidade II da citocromo oxidase, A citocromo oxidase contém cerca de 13 subunidades acopladas e está diretamente envolvida na cadeia de transporte de elétrons na respiração celular. Esta foi encontrada em *E. globulus*, (“spot”GL 73) (Tabela 2). Outras classes de proteínas também foram encontradas (Tabela 2), incluindo as não caracterizadas e as proteínas hipotéticas, o nível de expressão destas, foi baixo, quando comparados aos estudos envolvendo xilema de outras espécies (PLOMION *et al.*, 2002).

### Outras Proteínas

Outras classes de proteínas também foram encontradas (Tabela 2), incluindo as não caracterizadas e as proteínas hipotéticas, o nível de expressão destas, foi baixo, quando comparados aos estudos envolvendo xilema de outras espécies (PLOMION *et al.*, 2002).

### Proteínas envolvidas na via de lignificação

A via de síntese dos fenilpropanóides é uma das mais importantes vias metabólicas, devido ao papel de síntese de compostos fenólicos e de uma série de produtos secundários em plantas, que lhes conferem rigidez, proteção mecânica e estrutural. Dentre estes compostos, um dos mais importantes relacionados na influência da qualidade da madeira na produção de papel e celulose, é a lignina. Pois este composto, devido a algumas características químicas e em excesso, prejudica a remoção das fibras de celulose e no processo de branqueamento da polpa. Diante disto, vários estudos, incluindo melhoramento vegetal através da seleção de linhagens, ou mais diretamente a manipulação das características químicas da madeira, têm sido feitos.

Como já descrito anteriormente, algumas enzimas atuam em passos determinantes na via de lignificação, como a determinação da relação de unidades S/G na composição da lignina. Neste estudo, foram encontradas 3 enzimas desta via, sendo que, a CCoAOMT, com 2 isoformas, foi encontrada em *E. grandis* e *E. globulus* (Tabela 2). Esta enzima, (“spots” GL62/G79), apresentou um padrão diferencial de expressão entre estas duas espécies, sendo maior em *E. grandis* (Figura 18b), já na outra isoforma, (“spots” GL68/G83), não se observou uma diferença de expressão entre estas duas espécies. Análises no genoma de álamo mostram apenas duas cópias do gene (Tuskan, *et al.*, 2006), porém, em estudos proteômicos de *E. grandis*, Celedon *et al.*, 2007, encontraram três “spots” referentes á esta enzima, com massas moleculares de 38.00 kDa e pIs variando de 5.2 a 5.5, enquanto em Eg e Egl, as massas variam de 40 a 52 e os pIs variam de 4.33 a 4.6. Estas massas e pIs também diferem das mostradas na Tabela 1, feitas com base em busca no banco de dados do NCBI, indicando possíveis isoformas. Na busca do banco de ESTs do Genolyptus, somente uma destas seqüências foi reconhecida. GL62/79 alinhou com uma CCoAOMT – 6. estes resultados podem indicar outras possíveis isoformas presentes no xilema destas duas amostras.

Diretamente relacionada a atividade desta enzima, foram identificadas também, duas isoformas de S-adenosilmetionina sintetase (“spots” GL78/G65 e GL30), todos com altos níveis de expressão, o que já era esperado, pois, em ESTs de álamo, estes foram encontrados altamente expressos (WHETTEN, *et al.*, 2001). Resultados similares também foram encontrados no proteoma de *Pinus pinaster*, onde estas SAMs foram representadas por 14 “spots” (PLOMION, *et al.*, 2002). S-adenosilmetionina sintetase pode ter um papel importante no processo de formação da madeira em *E. grandis* e *E. globulus*, pois esta proteína sintetiza a S-adenosil-D-metionina (AdoMet), que é o doador de muitas reações de transmetilação, também encontradas na biossíntese de lignina (TIBURCIO *et al.*, 1990). Em alguns estudos, a atividade de SAMs têm sido correlacionadas com a atividade de COMT /CCoAOMT, indicando grande importância destas enzimas na via de lignificação.

Outra enzima importante na via de lignificação trata-se da 4CL, que foi encontrada nos três xilemas amostrados, porém, com massas moleculares e pIs diferentes (Tabela 2). Em comparação às massas e pIs das espécies encontradas no banco de dados (Tabela 1), nota-se que as 4-CLs possuem ampla variação nas médias de suas massas, o que pode ser explicado pela quantidade de isoformas encontradas em espécies de *Arabidopsis*, *Populus*, e *Pinus* (ANTEROLA e LEWIS, 2002). O padrão de expressão desta enzima em amostras de *C. citriodora* foi relativamente baixo, quando comparados às amostras de xilema de *E. grandis* e *E. globulus* (Figura 18, Tabela 2). Este trabalho é o primeiro registro de detecção de 4CL de

plantas utilizando a abordagem proteômica, outros estudos proteômicos seja de eucalipto como de outras plantas não detectaram esta enzima.

Uma CAD foi encontrada em xilema de *C. citriodora* e outra em xilema de *E. globulus*, com massas moleculares e pIs similares àquelas descritas na Tabela 1. Os níveis de expressão, mostrados pelo volume dos “spots” correspondentes, são altos. Em estudos aos níveis de expressão de 9 genes relacionados à CAD em *A. thaliana*, KIM, *et al.*, (2007), mostraram que a expressão desta enzima também pode ser detectada em tecidos não lignificados, sugerindo também para esta enzima, um a função de proteção da planta, bem como envolvimento em outros processos não relacionados á lignificação. Em eucalipto, são descritas duas isoformas de CAD, com altos níveis de expressão do mRNA, o que corresponde aos altos níveis também encontrados nestas análises. A nível proteômico, esta enzima ainda não tinha sido descrita em xilemas.

O nível de expressão das proteínas aqui identificadas pode contribuir para o melhoramento vegetal, identificando pontos-chave de atuação das mesmas, quando relacionadas ao alto ou baixo teor de lignina. Em xilema de *C. citriodora*, não foram encontradas isoformas destas enzimas, esta fato, pode estar relacionado ao fato da grande quantidade de lignina guaiacil, pois a formação destes monômeros possui menor número de passos enzimáticos. Em *E. globulus* e *E. grandis*, foram encontradas isoformas de CCoAOMT, com altos níveis de expressão, e em estudos preliminares dos padrões de expressão nestas duas espécies, SANTOS, 2006 sugere que, as quantidades de lignina siringil estão relacionadas com o aumento do nível de expressão desta enzima em eucalipto. A super-expressão do gene codificante desta enzima leva ao aumento da produção de compostos feruloil, que por sua vez, são convertidos em unidades siringil, o que está, portanto correlacionado à facilidade de branqueamento da polpa de *E. globulus*, bem como para, *E. grandis*, mostradas pelo nível de expressão desta enzima neste estudo, Porém, em *E. globulus*, a expressão aumentada desta enzima, neste estudo, sugere que, se altos níveis desta enzima estão sendo expressos, o teor de lignina siringil pode ser um pouco maior, do que em relação à *E. grandis*, com expressão pouco menor desta enzima.

A análise de proteomas de espécies de *Eucalyptus* spp com fenótipos contrastantes no que se refere à qualidade da madeira pode levar à identificação de proteínas diferencialmente expressas e conseqüentemente uma maior compreensão da via de lignificação e síntese de celulose. Os dados aqui gerados a partir destas análises, com a identificação de enzimas importantes na via de lignificação, bem como suas possíveis isoformas, podem fornecer grande informação acerca do processo de síntese de madeira em *Eucalyptus* spp, bem como,

relaciona-las à características de composição química da madeira, permitindo o desenvolvimento de uma nova tecnologia para a identificação de genes envolvidos no controle genético da qualidade da madeira. Esta informação prontamente disponibilizada às empresas produtoras de polpa de papel e celulose a partir da madeira de eucalipto poderá ser utilizada em futuros esforços na modificação das propriedades da madeira para uso industrial ou outras características, diminuindo, ou até mesmo eliminando o uso de produtos químicos na produção de papel, que são prejudiciais ao meio ambiente e diminuindo o custo da produção para empresas e finalmente, para o consumidor.

## **7 – CONCLUSÕES**

## 7 – CONCLUSÕES

- O método de extração fenólica foi o mais adequado para a extração de proteínas do xilema e folhas de *Eucalyptus* spp;
- Foram obtidos mapas consenso das três espécies estudadas, com alta grau de similaridade;
- Há uma alta variação no padrão do nível de expressão protéica entre as espécies em número e qualidade;
- Foram identificadas 63 proteínas nos mapas consenso das 3 espécies estudadas, que se agrupam em diversas classes com diferentes funções, inclusive, proteínas com diferentes isoformas;
- Foram identificadas 3 enzimas da via de síntese de fenilpropanóides, sendo 2 isoformas de CCoAOMT, 1 4CL em *E. Grandis* e *E. Globulus*, 1 4CL em *C. citriodora*, 1 CAD em *E. globulus* e 1 CAD em *C. citriodora*.

## **8- PERSPECTIVAS**

## **8 – PERSPECTIVAS**

- Comparar os dados obtidos às análises de microarranjos, destas mesmas amostras feitas pelo GENOLYPTUS, relacionando o padrão de expressão de proteínas expressas, com seus respectivos mRNAs;
  
- Fazer as análises proteômicas dos híbridos do projeto Genolyptus, bem como comparar o padrão de proteínas expressas com suas respectivas espécies puras;

## **9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, E. (1977). **Lignin chemistry: past, present and futures.** *Wood Science and Technology*. **11**: 169–218.
- Allina, S.A.; Pri-Hadash, A.; Theilmann, D.; Ellis, B.E and Douglas, C.J. (1998). **4-Coumarate: Coenzyme A Ligase in Hybrid Poplar1 Properties of Native Enzymes, cDNA Cloning, and Analysis of Recombinant Enzymes.** *Plant Physiology* **116**: 743–754.
- Anterola, A. M. & Lewis, N. G. (2002). **Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity.** *Phytochemistry*. **61**: 221-294.
- Asirvatham, V. S.; Watson. B. S.; Sumner, L.W. (2002). **Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago truncatula* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** *Proteomics*. **8**: 960-968.
- Baghdady, A Blervacq, A.-S; Jouanin,L; Grima-Pettenati, J; Sivadon, P; and S. Hawkins (2006). ***Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Physiology and Biochemistry*. **44**: 11-12
- Baucher, M.; Monties, B. Van Montagu, M. and Boerjan, W. (1998). **Biosynthesis and genetic engineering of lignin.** *Critical Reviews in Plant Sciences* **17** :125–197.
- Berth, M.; Moser, F. M.; Kolbe, M.; Bernhardt, J. (2007). **The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images.***Applied Microbiology and Biotechnology*. **76**:1223-1243.
- Blee, K. A.; Wheatley, E. R.; Bonham, V. A.; Mitchell, G. P.; Robertson, D.; Slabas, A. R.; Burrell, M. M.; Wojtaszc, P.; Bolwell, G. P. (2001). **Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesizes secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters.** *Planta*. **212**: 404-415.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**: 93-99.
- Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. (2003). **Lignin biosynthesis.** *Annual Review of Plant biology* **54**: 519-546.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bodie, E. e Borneman, S. (1997). **Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds.** *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4627–4632.
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* **72**:680–685.

- Brasileiro, L. B.; Colodette, J. L.; Pilo-Veloso, D. (2001). **A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas.** *Química Nova*. 24: 819-829.
- Brett, C. T. & Waldron, K. W. (1996). **Physiology and biochemistry of plant cell walls.** 2<sup>nd</sup> edition. *Chapmann & Hall, London*. 255p.
- Brill, E.M.; Abrahams, S.; Hayes, C.M.; Jenkins, C.L. and Watson, J.M. (1999). **Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.).** *Plant Molecular Biology*. 41: 279–291.
- Castro, A. J.; Carapito, C.; Zorn, N.; Magné, C.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Clement, C. (2005) **Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress.** *Journal of Experimental Botany*. 56: 2783-2795.
- 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.; Franceschini, L. M.; Oda, S.; Labate, C. A. (2007). **Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages.** *Proteomics*. 7: 2258-74.
- Chapple, C.C.S.; Vogt, T.; Ellis, B.E. and Somerville, C.R. (1992). **An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway.** *The Plant Cell* . 4:1413–1424.
- Choi CS, Sano H. (2007). **Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants.** *Molecular Genetics Genomics* 277:589-600.
- Choi, C. S.; Sano, H. (2007). **Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants.** *Molecular Genetics genomics*. 277: 589-600.
- Cooper, G. M. (2000). **The cell: A molecular approach.** *Sinauer Associates Inc*. 739 páginas.
- Daniel, G. (2003). **Microview of under degradation by bacteria and fungi.** In: **Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World**, Washington: ACS Symposium Series, v 845. p.34-72.
- Dean, J. F. D. **Synthesis of lignin in transgenic and mutant plants.** In: Steinbüchel, A.; Doi, Y. (2005). **Biotechnology of biopolymers: from synthesis to patents.** *Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co*. p. 3-26.
- Dell`Aica, I; Caniato, R; Biggin, S; Garbisa, S. (2007). **Matrix proteases, green tea, and St. John's wort: biomedical research catches up with folk medicine.** *Clinical Chim Acta* 381:69-77.

- Dixon, R. A.; Chen, F.; Guo, D.; Parvathi, K. (2001). **The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units?.** *Phytochemistry*. 57: 1069–1084.
- Du, J.; Xie, H. L.; Zhang, D. Q.; He, X. Q.; Wang, M. J.; Li, Y. Z.; Cui, K. M.; Lu, M. Z. (2006). **Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach.** *Proteomics*. 3: 881-895.
- Ehlting, D. Büttner, Q. Wang, C.J. Douglas, I.E. Somssich and Kombrink, E. (1999). **Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in Arabidopsis thaliana represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms.** *The Plant Journal* 19: 9–20.
- Ephritikhine, G.; Ferro, M.; Rollando, N. (2004). **Plant membrane proteomics.** *Plant physiology and biochemistry*. 42: 943-962.
- Faurobert, M; Pelpoir, E; Chaib, J (2007). **Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues.** *Methods Molecular Biology*. 355:9-14.
- Ferreira, M. (1979). **Escolha de espécies de Eucalipto.** Circular técnica IPEP, v. 47, p. 1-30.
- Ferrer, J. L.; Zubieta, C.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. (2005). **Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase.** *Plant physiology*. 137:1009-17
- Foelkel, C.E.B.; Barrichelo, L.E.G.; Milanez, A. F. (1975). **Estudo comparativo das madeiras de Eucalyptus saligna, E. paniculata, C. citriodora, E. maculata e E. tereticornis para a produção de celulose sulfato.** *IPEF* 10:17-37.
- Franke, R.; McMichael, C.M.; Meyer, K.; Shirley, A.M.; Cusumano, J.C. and Chapple, C. (2000). **Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase.** *The Plant Journal*. 22:223–234.
- Gang, D. R.; Kasahara, H.; Xia, Z. Q.; Vander, M. K.; Bauw, G.; Boerjan, W.; van Montagu, M.; Davin, L. B.; Lewis, N. G. (1999). **Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases.** *Journal Biology Chemistry*. 274: 7526-27.
- Gharahdaghi, F.; Weinberg, C. R.; Meagher, D. A.; Imai, B. S.; Mishe, s. m. (1999). **Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity.** *Electrophoresis*. 20: 601-605.
- Gion, J-M.; Lalanne, C.; Provost, G. L.; Ferry-Dumazet, H.; Paiva, J.; Chaumeil, P.; Frigerio, J-M.; Brach, J.; Barre, A.; Daruvar, A.; Clavero, S.; Bonneu, M.; Sommerer, N.; Negroni, L.; Plomion, C. (2005). **The proteome of maritime wood forming tissue.** *Proteomics*. 5: 3731-3751.
- Goujon, T.; Ferret, V.; Mila, I.; Pollet, B.; Ruel, K.; Burlat, V.; Joseleau, J.P.; Barriere, Y.; Lapiere, C.; Jouanin, L. (2003). **Down-regulation of the AtCCR1 gene in Arabidopsis thaliana: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability.** *Planta*. 217: 218-228.

- Grima-Pettenati, J.; Feuillet, C.; Goffner, D.; Borderies, G. and Boudet, A.M. (1993). **Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase.** *Plant Molecular Biology* 21:1085–1095.
- Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2000). **Down-regulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.): impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin.** *Plant Cell* 13: 73–88.
- Harding, S. A.; Leshkevich, J.; Chiang, V. L.; Tsai, C. J. (2002). **Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen.** *Plant physiology*. 128:428-38.
- Halpin, C.; Knight, M. E.; Grima-Pettenati, J.; Goffner, D.; Boudet, A.; Schuch, W. (1992). **Purification and Characterization of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Tobacco Stems.** *Plant Physiology*. 98:12-16.
- Hawkins, S. W. e Boudet, A. M. (1994). **Purification and Characterization of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Isoforms from the Periderm of *Eucalyptus gunnii* Hook.** *Plant Physiology* 104:75–84.
- Hawkins, S.; Samaj, J.; Lauvergeat, V.; Boudet, A.; Grima-Pettenati, J. (1997). **Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase: Identification of New Sites of Promoter Activity in Transgenic Poplar.** *Plant physiology*. 113:321-325.
- Hu, W-J; Harding, S.A.; Lung, J.; Popko, J.; Ralph, J.; Stokke, D.D.; Tsai, C-J.; Chiang, L. (1999). **Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic tree.** *Nature Biotechnology*. 17: 808-812.
- Huang, X.; Jeronimidis, G. e Vincent, J.F.V. (1999). **Mechanical properties of wood from transgenic poplar trees with modified lignification.** *The 2nd Symposium of Chinese Youth Scholars on Material Science and Technology* 10:1–9.
- Hurkman, W.; Tanaka, C. (1986). **Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis.** *Plant physiology*, Whashington, v. 81, n. 3, p. 802-806.
- Iiyhama, K., Lam, T.B.T. & Stone, B. A. (1993). **Cell wall biosynthesis and its regulation.** *Forage Cell Wall Structure and Digestibility Chem.* 46: 829–835.
- Jaffe M. J, Galston A. W. (1967). **Physiological studies on pea tendrils. III. ATPase activity and contractility associated with coiling.** *Plant Physiology* .42: 845-847.
- Jones, A. M.; Thomas, V.; Bennett, M. H.; Mansfield, J.; Grant, M. (2006). **Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*.** *Plant physiology*. 142: 1603-1620.

- Jones, L.; Ennos, A.R.; Turner, S.R. (2001). **Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis.** *The Plant Journal* 26:205-216 .
- Jouanin, L.; Goujon, T.; De Nadai, V.; Martin, M. T.; Mila, I.;Vallet, C.; Pollet, B.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Petit-Conil, M.; Lapiere, C. (2000). **Lignification in Transgenic Poplars with Extremely Reduced Caffeic Acid O-Methyltransferase Activity.** *Plant Physiology.* 123: 1363–1373.
- Kalluri, J. C.; and Joshi, C. P. (2004). **Differential expression patterns of two cellulose synthase genes are associated with primary and secondary cell wall development in aspen trees.** *Planta.* 220:47-55.
- Katagiri, N.; Tsutsumi, Y.; Nishida, T. (1995). **Correlation of Brightening with Cumulative Enzyme Activity Related to Lignin Biodegradation during Biobleaching of Kraft Pulp by White Rot Fungi in the Solid-State Fermentation System.** *Applied and environmental microbiology.* 61: 617–622.
- Kim, Y.J.; Kim, D.G.; Lee, S.H. e Lee, I. (2006). **Wound-induced expression of the ferulate 5-hydroxylase gene in Camptotheca acuminata.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* Volume 1760: 182-190.
- Lacombe, E; Hawkins, S.; Van, J; Piquemal, J; Goffner, D; Poeydomenge, O; Boudet, A.M; Grima-Pettenati, J. (1997). **Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships.** *The Plant Journal* 11: 429-441.
- Lesley, S. A.; Kuhn, P.; Godzik, A., *et al.* (2002). **Structural genomics of the Thermotoga maritima proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline.** *PNAS.* 99: 11664–11669.
- Li, L.; Cheng, X.; Lu, S.; Nakatsubo, T.; Umezawa, T.; Chiang, V. L (2005). **Clarification of cinnamoyl co-enzyme A reductase catalysis in monolignol biosynthesis.** *Plant Cell Physiology.* 46:1073-82
- Li, L.; Zhou, Y.; Cheng, X.; Sun, J.; Marita, J. M.; Ralph, J.; Chiang, V. (2003). **Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation.** *PNAS.* 100: 4939–4944.
- Liu, Y.; Dammann, C.; Bhattacharyya, M. K. (2001). **The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean.** *Plant physiology.* 127: 1788-1797.
- Ma Y. Z, Yen L. F (1988). **The presence of myosin and actin in pollens and their role in cytoplasmic streaming.** *Acta Botany Sin.* 30: 285-291.
- Meireles, K. G. X. (2006). **Identificação de proteínas expressas na região cambial de Eucalyptus grandis, por espectrometria de massa. Tese de mestrado. Esalq.**

- Meyer, K.; Shirley, A.M.; Cusumano, J.C.; Bell-Lelong, D.A. and Chapple, C. (1998). **Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in Arabidopsis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6619–6623.
- Micic, M.; Orbulescu, J.; Radotic, K.; Jeremic, M.; Sui, G.; Zheng, Y.; Leblanc, R. M. (2002). **DHP Lignin model compound at the air – water interface**. *Biophysical Chemistry* 99:55-62.
- Millar, A. H.; Sweetlove, L. J.; Giege, P.; Leaver, C. J. (2001). **Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome**. *Plant Physiology*. **127**: 1711–1727.
- Ministério da Ciência e Tecnologia: Especial Genolyptus. In: <http://ftp.mct.gov.br/especial/genolyptus4.htm>. **Especial Genolyptus**. Acesso em 20/07/06.
- Morreel, K.; Ralph, J.; Lu, F.; Goeminne, G.; Busson, R.; Herdewijin, P.; Goeman, J. L.; Van der Eycken, J.; Boerjan, W.; Messens, E. (2004). **Phenolic Profiling of Caffeic Acid O-Methyltransferase-Deficient Poplar Reveals Novel Benzodioxane Oligolignols**. *Plant physiology*. 136:4023-4036.
- Neto, C.P.; Evtuguin, D. V.; Pinto, P. C.; Silvestre, A. J. D. e Freire, C. S. R. (2005). **Química da madeira de *Eucalyptus globulus*: especificidades e impacto nos processos de cozimento e de branqueamento**. *Pasta e papel*, 7 32-42.
- Ni, W; Paiva, N.L. e Dixon, R.A. (1994). **Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene**. *Transgenic Research* 3: 120–126.
- Ning, Z.; Cox, A. J.; Mullikin, J. C. (2001). **SSAHA: a fast search method for large DNA databases**. *Genome research*. 11:1725-29.
- O'malley, D. M.; Porter, S.; Sederoff, R. R. (1992). **Purification, Characterization, and Cloning of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.)**.98: 1364-1371.
- Parvathi, K.; Cheng, F.; Guo, D.; Blount, J. W.; Dixon, R. A. (2001). **Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols**. *Plant journal*. 25:193-202.
- Pascual, M. B.; Jing, Z. P.; Kirby, E. G.; Canovas, F. M.; Gallardo, F. (2007). **Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinothricin**. *Phytochemistry*. Aguardando impressão.
- Peck, S. C.; Nühse, T.S.; Hess, D.; Iglesias, A.; Meins, F.; Boller, T. (2001). **Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors**. *Plant Cell*. 13:1467-1475.
- Peck, S.C; Nühse T.S; Hess, D; Iglesias, A; Meins, F; Boller, T. (2001) **Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors**. *Plant Cell*, 13:1467-75.

- Pereira, J. C. D.; Sturion, J. A.; Higa, A. R. Higa, R.C.V.; Shimizu, J. Y. (2000). **Características da madeira de algumas espécies Eucalipto plantadas no Brasil.** Colombo. Embrapa florestas, 113p.
- Pichon, M.; Courbou, I.; Beckert, M.; Boudet, A.-M. and Grima-Pettenati, J. (1998). **Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes.** *Plant Molecular Biology* **38**:671–676.
- Pinçon, G.; Maury, S.; Hoffmann, L.; Geoffroy, P., Lapierre, C.; Pollet, and Legrand, M. (2001). **Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects B. cts lignin synthesis and plant growth.** *Phytochemistry* **57**: 1167–1176.
- Pionneau, C. P.; Bauw, G.; Dubos, C.; Bahrmann, N.; Kremer, A.; Frigerio, J. M.; Plomion, C. (1999). **Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins.** *Electrophoresis*. **20**: 1098-1108.
- Piquemal, J. Chamayou, S.; Nadaud, I.; Beckert, M.; Barrière, Y.; Mila, I.; Lapierre, C.; Rigau, J.; Puigdomenech, P.; Jauneau, A.; Dignonnet, C.; Boudet, A.M.; Goffner, D.; and Pichon, M. (2002). **Down-Regulation of Caffeic Acid O-Methyltransferase in Maize Revisited Using a Transgenic Approach.** *Plant Physiology*. **130**: 1675–1685.
- Pincon, G.; Maury, S.; Hoffmann, L.; Geoffroy, P.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Legrand, M. (2001) **Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth.** *Phytochemistry* **57**: 1167–1176
- Plomion, C.; Pionneau, C.; Brach, J.; Costa, P.; Bailleres, H. (2000). **Compression Wood-Responsive Proteins in Developing Xylem of Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.).** *Plant Physiology*. **123**: 959–969.
- Poke, F. S.; Vaillancourt, R. E.; Potts, B. M.; Reid, J. B. (2005). **Genomic research in Eucalyptus** **125**: 79-101.
- Projeto Genolyptus: [www.ucb.br/genolyptus](http://www.ucb.br/genolyptus). Acesso em novembro, 2006.
- Revista madeira (2003). **Projeto GENOMA do Eucalipto.** n° 75, ano 13.
- Roncero, M. B.; Torres, A. L.; Colom, J. F.; Vidal, T. (2004). **The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps.** *Bioresource Technology* **96**: 21–30.
- Rose, J.K; Bashir, S; Giovannoni, J.J; Jahn, M.M; Saravanan, R.S (2004). **Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools.** *Plant Journal* **39**:715-33.
- Sali, A.; Matsumoto, R.; McNeil, H.P., Karplus, M. e Stevens, R.L. (1993). **Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes.** *The Journal of biological chemistry* **268**:9023-9034.

- Santana, M.C.A.; Cavali, J. (2006). **Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens**. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* Vol. VII.
- Santos, S. N. (2005). **Genes de lignificação em *Eucalyptus*: estrutura e diversidade genética dos genes 4cl e ccoaomt**. Dissertação de mestrado. UCB.
- Sauvage, F. X.; Pradal, M.; Chatelet, P.; Tesniere, C. (2007). **Proteome changes in leaves from grapevine (*Vitis vinifera* L.) transformed for alcohol dehydrogenase activity**. *Journal Agricola food chemistry*. 55: 2597-2603.
- Shevchenko, A.; Shevchenko, A. (2001). **Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry**.
- Silva, J.C.; Matos, J.L.M.; Oliveira, J.T.S.; Evangelista, W.V. (2005). **Influência da idade e da posição ao longo do tronco na composição química da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden**. *Revista Árvore* 29: 455 – 460.
- Somerville, C.; Bauer, S.; Brininstool, G.; Facette, M.; Hamann, T.; Milne, J.; Osborne, E.; Paredez, A.; Persson, S.; Raab, T.; Vorwerk, S.; Youngs, H. (2004). **Toward a systems approach to understanding plant cell walls**. 306: 2206-2211.
- Sterky, F.; Bhalerao, R. R.; Unneberg, p.; Segerman, B.; Nilsson, P.; Brunner, A. M.; Charbonnel-Campaa, L.; Lindvall, J. J.; Tandré, K.; Strauss, S. H.; Sundberg, B.; Gustafsson, P.; Uhlén, M.; Bhalerao, R. P.; Nilsson, O.; Sandberg, G.; Karlsson, J.; Lundberg, J.; Jansson, S. (2004). **A *Populus* EST resource for plant functional genomics**. *PNAS*. 101: 13951–13956.
- Swindell, WR.; Huebner, M.; Weber, AP. (2007) **Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways**. *BMC Genomics* 8:125.
- Tiburcio, A. F., Kaur-Sawhney, R., Galston, A. W., in: Miñin, B. J., Lea, P. J., (Eds.) (1990). **The biochemistry of plants: A comprehensive treatise Intermediary Nitrogen Metabolism**. *Academic Press, Orlando, vol. 16*, p. 283–325.
- Tonello, K. C. (2006). **Melhoramento de essências vegetais**. <http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div03.htm>. Acesso em julho de 2007.
- Trugilho, P. F.; Lima, J. T.; Mori, F. A.; Lino, A. L. (2001). **Avaliação de clones de *Eucalyptus* para a produção de carvão vegetal**. *Cerne, Lavras, v. 7, n. 2*, p. 104-114.
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J. *et al.* (2006). **The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)**. *Science*. 313, 1596–1604.
- Vega-Bustillos, O.; Sassine, A.; March, R. (2003). **A espectrometria de massa quadrupolar**. São Paulo, SP: Scortecci cap 1.

- Vieira, A. A.; Oliveira, M. G. A.; José, I. C.; Piovesan, N. D.; Rezende, S. T.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2001). **Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 13, n. 1, p. 5-12.
- Vieira, A. A.; Oliveira, M. G. A.; José, I. C.; Piovesan, N. D.; Rezende, S. T.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2001). **Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 5-12.
- Wang, W.; Scali, M.; Vignani, R.; Spadafora, A.; Sensi, E.; Mazzuca, S.; Cresti M. (2003). **Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds.** *Electrophoresis*. 14:2369-75.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altaman, A. (2004). **The Biochemistry of Plants.** *Plant Science*. 9: 244–252.
- Whetten, R.; Sun, Y. H.; Zhang Y.; Sederoff, R. (2001). **Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine.** *Plant Molecular Biology*. 47: 275-291.
- Williamson, R. E.; Burn, J. E.; Hocart, C. H. (2002). **Towards the mechanism of cellulose synthesis.** *TRENDS in Plant Science* 10: 461-467.
- Wyrambik, D. and Grisebach, H. (1975). **Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures.** *European Journal of Biochemistry* 59: 9–15.
- Yan, S.; Tang, Z.; Su, W.; Sun, W. (2005). **Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root.** *Proteomics*. 5: 235-244.
- Yao, Y; Yang, Y.W; Liu, J.Y; **An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE.** 2006 *Electrophoresis* 27:4559-69.
- Zhong, R.; Morrison, III, W.H.; Negrel, J. and Ye, Z.-H. (1998). **Dual methylation pathways in lignin biosynthesis.** *The Plant Cell* 10:2033–2045.

## **10- ANEXOS**

## 10 – ANEXOS

### Anexo 1

**Artigo:** Production and biochemical characterization of insecticidal enzymes from *Aspergillus fumigatus* toward *Callosobruchus maculatus*.

**Autores:** Jackeline Leite Pereira, Octávio L. Franco e Eliane F. Noronha.

**Revista:** Current Microbiology, Vol 52 (2006), pp. 430-434.

## **Anexo 2**

**Artigo:** Novel insights into use of fungal hydrolytic enzymes

**Autores:** Jackeline Leite Pereira, Eliane F. Noronha, Robert N. G. Miller e Octávio L. Franco

**Revista:** Letters in Applied Microbiology, Vol 44 (2007), pp. 573-581

### **Anexo 3**

**Artigo:** *Xanthomonas gardneri* exoenzymatic activity toward plant tissue

**Autores:** Elizabete S. Candido, Jackeline Leite Pereira, Alice M. Quezado-Duval, Eliane F. Noronha, Ricardo H. Krüger e Betania F. Quirino.

**Revista:** World Journal of Microbiology and Biotechnology, Publicação *on line*.

#### **Anexo 4**

**Artigo:** Production *In vivo* proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*

**Autores:** Aretusa E. Andrade, Luciano P. Silva, Jackeline L. Pereira, Eliane F. Noronha, Fabio B. Reis Jr, Carlos Bloch Jr, Octávio L. Franco, Marise F. dos Santos, Gilberto B. Domont e Angela Mehta.

**Revista:** Submetido na FEMS Microbiology Letters em julho de 2007.

## **Anexo 5**

### **Artigo: Comparison of plant proteomic patterns in root-nematode interactions**

**Autores:** Octávio L. Franco, Aretusa E. Andrade, Jackeline Leite Pereira, Paulo H. A. Costa, Thales L. Rocha, Érika V. S. A. Barros, Maria F. Grossi-de-Sá, Regina M. D. G Carneiro, Rui G. Carneiro e Ângela Mehta

**Revista:** Submetido na revista *Journal of Phytopathology* em julho de 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)