

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal

Kamilla Emmanuélle Carvalho de Almeida

**PROTEOMA COMPARATIVO DA REGIÃO CAMBIAL DE CLONES
DE *Eucalyptus* spp. E *Corymbia* spp. CULTIVADOS EM DIFERENTES
ESPAÇAMENTOS**

Diamantina

2019

Kamilla Emmanuëlle Carvalho de Almeida

**PROTEOMA COMPARATIVO DA REGIÃO CAMBIAL DE CLONES
DE *Eucalyptus* spp. E *Corymbia* spp. CULTIVADOS EM DIFERENTES
ESPAÇAMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales
do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para a
obtenção do título de “Doutora”.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447p

Almeida, Kamilla Emmanuëlle Carvalho de
Proteoma comparativo da região cambial de clones de *Eucalyptus*
spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos / Kamilla
Emmanuëlle Carvalho de Almeida, 2019.
232 p. : il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal)
- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
Diamantina, 2019.

1. Espécies florestais. 2. Xilema. 3. Densidade de plantio. 4.
Proteômica. 5. Shotgun. I. Laia, Marcelo Luiz de. II. Título. III.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 634.973

KAMILLA EMMANUÉLLE CARVALHO DE ALMEIDA

Proteoma comparativo da região cambial de clones de Eucalyptus spp. e Corymbia spp. cultivados em diferentes espaçamentos

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM CIÊNCIA FLORESTAL, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIA FLORESTAL

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Luiz
De Laia

Data da aprovação : 14/03/2019



Prof.Dr. MARCELO LUIZ DE LAIA - UFVJM



Prof.Dr. EMERSON DELANO LOPES - IFNMG



Prof.Dr. LEANDRO MARCIO MOREIRA - UFOP



Prof.Dr.ª VIVIAN MACHADO BENASSI - UFVJM



Prof.Dr.ª JANAÍNA DE OLIVEIRA MELO - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico esta tese a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste processo. Em especial a meus pais e irmão, pois representam todo o incentivo e apoio que me foi vital para a conclusão desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nivaldo e Imaculada, por serem minha base, priorizando sempre meus estudos, especialmente no início da minha caminhada.

Ao meu irmão, Lucas, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Laia. Obrigada pelo comprometimento com os ensinamentos e pelas oportunidades que me ofereceu. Também expresso aqui minha admiração e agradecimento ao meu coorientador, Professor Jesús V. Jorrín-Novio, pelo apoio e por ter permitido o desenvolvimento deste trabalho na Universidad de Córdoba.

Aos membros da banca, por aceitarem contribuir com meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da UFVJM e do Grupo de Pesquisas em Bioquímica, Proteômica e Biologia de Sistemas Vegetal e Agroflorestal da UCO. Foi um prazer conhecê-los e aprender com cada um de vocês.

À especialista em proteômica vegetal, Dra. M^a Ángeles Castillejo, pelas valiosas contribuições e pelo auxílio em toda a etapa experimental, A Sr^a Mari Carmen Molina, pela atenção e apoio com todas as questões burocráticas e aos Professores Dra. Ana Maldonado e Dr. Manuel Ortega, pela disposição em ensinar e ajudar.

Aos professores Dra. Miranda Titon, Dr. José Barbosa e Dr. Lucas Verardo pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação, que enriqueceram este trabalho.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade e pela bolsa de estudos concedida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e para a realização do estágio no exterior (PDSE), promovendo esta experiência de crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos e amigas da UFVJM e da UCO, por toda amizade e paciência nesta jornada. Aos companheiros Rodrigo, Amanda, Daiana, Lili e Marcone, por tornarem minha caminhada mais leve e alegre. À Ludi, tão presente e atenciosa em todos os momentos. À Luciana e Kamila, por compartilharem comigo uma das maiores experiências da minha vida. À família “Belloteros”, especialmente a Conchi, Isa, Maru, Pati, Fabi, Cristina, Jeffrey, Victor e Rosa, por todo conhecimento compartilhado e pelos momentos vividos dentro e fora do laboratório. ¡Gracias! À Any e Tarcísio, irmãos do LGBF. Às minhas ex-companheiras de república, Pati, Isis, Estela, Bea e Berfin pela convivência e carinho ao longo desta caminhada.

A cada uma das pessoas que fizeram parte deste ciclo, de coração, agradeço pela sua presença!

RESUMO

ALMEIDA, Kamilla Emmanuélle Carvalho de. **Proteoma comparativo da região cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos**. 236 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Diferenças fenotípicas observadas entre árvores cultivadas em diferentes espaçamentos de plantio, no que se refere a propriedades da madeira, podem ser atribuídas a uma diferença no padrão de abundância de proteínas no xilema secundário. Para entender em nível molecular como o espaçamento afeta o crescimento e a formação da madeira de um híbrido tri-cross de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) e de um híbrido de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) K. D. Hill & L. A. Johnson, uma abordagem proteômica foi empregada neste trabalho. Para isso, amostras do tecido cambial foram coletadas de clones, com 24 meses de idade, cultivados em quatro diferentes espaçamentos (3 x 3 m, 3 x 1 m, 6 x 1,5 m e 6 x 0,5 m). Diferentes protocolos foram comparados para extração das proteínas, sendo eles os métodos baseados no uso de TCA/acetona, TCA/acetona/fenol e solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol. As proteínas totais do tecido cambial foram separadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Afim de promover um ensaio sensível e acurado, a proteômica do tipo “shotgun” (nLC-MS/MS-Orbitrap) foi a estratégia adotada. Para a identificação de proteínas, foram utilizados bancos de dados públicos de *Eucalyptus grandis*. As proteínas identificadas nos bancos de dados, quando não caracterizadas, foram funcionalmente anotadas com base na similaridade com sequências anotadas no UniRef90, usando o Sma3s. Por fim, as proteínas com diferença significativa ($p < 0,05$) diferencialmente reguladas (*fold-change* entre 2 e 0,5) foram funcionalmente categorizadas usando a ferramenta MERCATOR-MapMan. Além disso, esse grupo de proteínas foi mapeado nos processos biológicos da base de dados Kegg. De modo geral, proteínas extraídas com solução tampão combinada com fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol apresentaram melhor qualidade, alto rendimento e bandas com melhores intensidades, em comparação com os outros métodos de extração, sendo este o método de extração usado. A análise eletroforética unidimensional revelou alterações no perfil proteico do câmbio vascular dos clones de *Eucalyptus* e *Corymbia* submetidos a diferentes espaçamentos de plantio. A estratégia de proteômica “shotgun” identificou 2547 espécies proteicas, das quais 1484 apresentaram diferenças significativas e mudanças qualitativas ou quantitativas em resposta a clones e espaçamentos de plantio. A análise estatística das proteínas identificadas e dos processos biológicos relacionados revelaram um comportamento diferente nos clones em relação à abundância de suas proteínas indicando um possível ajuste metabólico em função das condições ambientais proporcionadas pelos espaçamentos de plantio avaliados que refletiu nas características da madeira das referidas espécies.

Palavras-chave: Espécies florestais. Xilema. Densidade de plantio. Proteômica. Shotgun.

ABSTRACT

ALMEIDA, Kamilla Emmanuélle Carvalho de. **Comparative proteome of the cambial region of *Eucalyptus* spp. and *Corymbia* spp. clones grown at different spacings.** 236 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

The observed phenotypic differences between trees grown at different planting spacings, in wood properties, can be attributed to a difference in the pattern of protein abundance in the secondary xylem. To understand at the molecular level how the spacing affects the growth and the formation of the wood of a tri-cross hybrid of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) and a hybrid of *Corymbia citriodora* (Hook) KD Hill & LA Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) KD Hill & LA Johnson, a proteomic approach was employed in this study. For this purpose, samples of the cambial tissue were collected from 24-month-old clones cultured in four different spacings (3 x 3 m, 3 x 1 m, 6 x 1,5 m and 6 x 0,5 m). Different protocols were compared for extraction of the proteins, being the methods based on the use of TCA / acetone, TCA / acetone / phenol and buffer / phenol / ammonium acetate solution in methanol. Total proteins of foreign cambial tissue were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In order to promote a sensitive and accurate assay, shotgun-type proteomics (nLC-MS / MS-Orbitrap) was the strategy adopted. For the identification of proteins, public databases of *Eucalyptus grandis* were used. The proteins identified in the databases, when not characterized, were functionally annotated based on the similarity with sequences annotated in UniRef90, using the Sma3s. So, proteins with significantly ($p < 0.05$) differentially regulated (fold-change between 2 and 0,5) were functionally categorized using the MERCATOR-MapMan tool. In addition, this group of proteins was mapped in the biological processes of the Kegg database. In general, proteins extracted with buffer solution combined with phenol and precipitated with ammonium acetate in methanol presented better quality, high yield and bands with better intensities, compared to the other extraction methods, being this the extraction method used in this study. The unidimensional electrophoretic analysis revealed changes in the protein profile of the cambial tissue of the *Eucalyptus* and *Corymbia* clones submitted to different planting spacings. The shotgun proteomics strategy identified 2547 protein species, of which 1484 showed significant differences and qualitative or quantitative changes in response to clones and planting spacings. Statistical analysis of identified proteins and related biological processes revealed a different behavior in the clones in relation to the abundance of their proteins indicating a possible metabolic adjustment as a function of the environmental conditions provided by the evaluated planting spacings that reflected the characteristics of the wood of said species.

Palavras-chave: Forest species. Xylem. Density planting. Proteomics. *Shotgun*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 HIPÓTESE	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 Os gêneros <i>Eucalyptus</i> e <i>Corymbia</i> suas importâncias no setor florestal	17
4.2 Qualidade da madeira e o espaçamento de plantio	22
4.3 Proteômica florestal	26
5 REFERÊNCIAS	30
 CAPITULO 2 – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO CAMBIAL DE EUCALIPTO	 41
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1 Coleta das amostras	45
2.2 Protocolos para extração de proteínas	46
2.2.1 Procedimento baseado em precipitação com TCA/acetona	46
2.2.2 Procedimento baseado em precipitação com TCA/acetona e extração com fenol	47
2.2.3 Procedimento baseado em solubilização com Tampão de extração e fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol	47
2.3 Quantificação de proteínas	48
2.4 SDS-PAGE	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4 CONCLUSÃO	64
5 REFERÊNCIAS	65
 CAPITULO 3 – PROTEOMA COMPARATIVO DA REGIÃO CAMBIAL DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> spp. E <i>Corymbia</i> spp. CULTIVADOS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS .	 70
1 INTRODUÇÃO	72
2 MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1 Caracterização da área experimental	73
2.2 Material vegetal, densidade de plantas por hectare e espaçamento de plantio	73
2.3 Desenho experimental	74
2.4 Coleta do material vegetal	75
2.5 Análises proteômicas	76

2.5.1	Extração de proteínas	76
2.5.2	Quantificação de proteínas	77
2.5.3	SDS-PAGE	78
2.5.4	Pré-fracionamento e digestão <i>In-gel</i> de proteínas	79
2.5.5	nLC-MS/MS	80
2.5.6	Análise dos espectros de massas, identificação e quantificação de proteínas	81
2.5.7	Análise dos dados de proteômica e proteínas diferencialmente reguladas	82
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Extração, quantificação e separação de proteínas	84
3.2	Identificação das proteínas	91
3.3	Análise global das proteínas	94
3.4	Proteínas com regulação diferencial	100
3.4.1	Categorização funcional das proteínas com regulação diferencial	101
3.4.2	Processos biológicos das proteínas com regulação diferencial	106
3.4.2.1	Defesa e estresse e reações de oxirredução (Redox)	108
3.4.2.2	Metabolismo secundário	111
3.4.2.3	Fotossíntese	112
3.4.2.4	Metabolismo de carboidratos	114
3.4.3	Proteínas com regulação diferencial exclusivas em cada tratamento	117
3.4.3.1	Proteínas identificadas exclusivamente no clone de <i>Corymbia</i> spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m	118
3.4.3.2	Proteínas identificadas exclusivamente no clone de <i>Eucalyptus</i> spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m	120
3.4.3.3	Proteínas identificadas exclusivamente no clone de <i>Corymbia</i> spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m	123
3.4.3.4	Proteínas identificadas exclusivamente no clone de <i>Eucalyptus</i> spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m	127
4	CONCLUSÃO	133
5	REFERÊNCIAS	133
APENDICE A		151

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

O sucesso expressivo da eucaliptocultura no Brasil está relacionado à capacidade adaptativa dos eucaliptos a diferentes condições edafoclimáticas, tornando-os capazes de se desenvolver bem em quase todas as regiões do país onde se pratica silvicultura intensiva, e a variedade de usos dos seus multiprodutos, em especial a madeira. Nos últimos anos, o desenvolvimento de tecnologias modernas de implantação e condução dos povoamentos proporcionaram o alcance de níveis ainda mais significativos de ganho de produtividade e qualidade da madeira de eucalipto (SILVEIRA, 1999). Além disso, no campo da genética, tem sido comum o desenvolvimento de pesquisas com vistas a obtenção de conhecimento sobre genes responsáveis por características de interesse agrícola, contribuindo para o melhoramento destas espécies. Entre os importantes avanços alcançados, destaca-se o sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* por Myburg *et al.* (2014), que forneceu um mapa do circuito molecular e permitiu a exploração de informações genéticas relativas ao crescimento, adaptação e respostas metabólicas destas árvores.

As espécies de eucalipto apresentam características que as tornam favoráveis para a produção e comercialização de sua madeira, frequentemente usada como matéria prima para a produção de papel e celulose, energia, construção civil, marcenaria e diversos outros fins. Além disso, de modo geral, a madeira representa um dos mais importantes recursos naturais renováveis e desempenha um papel crucial no ciclo de carbono nos ecossistemas terrestres (GUERRIERO *et al.*, 2014). Em que pese sua importância ecológica e ambiental, pouco se conhece acerca dos processos metabólicos que ocorrem durante a formação deste tecido, bem como sobre suas respostas às diferenças ambientais do ponto de vista molecular. Sua biossíntese é considerada um dos processos fisiológicos mais complexos, cuja completa compreensão permitirá o desenvolvimento de estratégias para o aproveitamento integral da biomassa lenhosa.

Definida como um conjunto de células do xilema secundário acumuladas no decorrer do desenvolvimento das espécies lenhosas (LARSON, 1994), a madeira é basicamente composta por polissacarídeos (40% - 50% celulose e 25% hemicelulose), ligninas (25% - 35%), proteínas de parede, compostos solúveis (taninos, terpenóides, flavanóides, estilbenos) e insolúveis (pectina) (HIGUCHI, 1997). Sua presença confere suporte mecânico e possibilita o transporte de água e minerais da raiz a parte aérea pelas células do xilema. Sua formação é um

processo resultante do crescimento secundário, coordenado pelo câmbio vascular (PLOMION *et al.*, 2001).

A atividade do câmbio garante a renovação regular de elementos do xilema e floema secundário, assegurando o ciclo de vida perene das plantas, além de promover o crescimento diametral dos troncos, ramos e raízes das gimnospermas e angiospermas (PLOMION, 2001). Para isso, as células formadas pela atividade cambial originam o lenho, que se diferencia em alburno, parte vascularmente ativa do xilema, e em cerne, porção central do eixo lenhoso sem atividade fisiológica. Durante o período de atividade cambial a adição de células resultantes das divisões de células do câmbio é muito rápida, levando ao acúmulo de células com diversos níveis de diferenciação dificilmente distinguíveis e à formação de uma região meristemática extensa (ESAU, 1977), denominada “região cambial” (PARHAM, 1983). Transcritos e proteínas envolvidos nesses processos podem ser encontrados nesta zona (MELLEROWICZ *et al.*, 2001).

O processo de crescimento e diferenciação celular derivado da atividade cambial influencia o alongamento radial e longitudinal das células, o espessamento e a lignificação da parede celular, com reflexos nas características tecnológicas da madeira (GROZDITS; IFJU, 1984). Além de ser regulado por fatores intrínsecos, como a expressão de genes envolvidos na homeostase cambial e sinais hormonais, tal processo também é influenciado por fatores ambientais (DESLAURIERS; MORIN, 2005, GRİČAR *et al.* 2007), que interferem na produção e na qualidade da madeira através da dinâmica do crescimento radial e da densidade deste tecido (GUERRIERO *et al.*, 2014).

Neste sentido, técnicas silviculturais adotadas para a implantação e condução das florestas, particularmente o espaçamento de plantio, podem interferir no desenvolvimento e na produtividade florestal (LELES *et al.*, 1998), bem como nas propriedades químicas, físicas e anatômicas da madeira, ao determinar o tempo e a intensidade da competição por recursos ambientais, como nutrientes, água, luz e temperatura, entre as árvores (HARRINGTON *et al.*, 2009). O espaçamento de plantio tem sido abordado em diversos estudos que avaliam as respostas de materiais genéticos a um sítio florestal (FERREIRA *et al.*, 2014), permitindo uma maior compreensão acerca dos processos adaptativos das espécies florestais às condições ambientais disponíveis para o seu desenvolvimento e contribuindo para a garantia da produtividade e o atendimento das demandas por produtos de origem florestal.

O emprego da engenharia genética para ampliar a funcionalidade dos recursos genômicos florestais depende do entendimento detalhado das vias de sinalização e dos genes que codificam e regulam proteínas-chave dos processos de desenvolvimento das árvores.

Abordagens transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas têm sido empregadas para a identificação e caracterização de genes e produtos de expressão gênica induzidos por déficit hídrico, salinidade, temperatura e entre outros, bem como das suas vias de sinalização e regulação em árvores (HARFOUCHE *et al.*, 2012). Neste âmbito, experimentos que investiguem a interação entre genótipos e espaçamento de plantio em nível molecular são cruciais para a obtenção de novos insights que possam preencher lacunas substanciais ainda existentes no conhecimento acerca da biossíntese da madeira.

Dada a sua capacidade de fornecer informações sobre proteínas codificadas a partir do genoma de *Eucalyptus*, tecnologias de proteômica em larga escala foram empregadas neste estudo para identificar alterações na abundância de espécies proteicas na região cambial de um híbrido tri-cross de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) e um híbrido de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) K. D. Hill & L. A. Johnson, induzidas pelo cultivo em diferentes espaçamentos. A detecção destas alterações pode contribuir para o desenvolvimento de genótipos com maior potencial produtivo e para a geração de informações sobre genes expressos e proteínas diferencialmente reguladas durante o desenvolvimento do xilema, explicando processos e como este tecido responde a essas diferenças ambientais do ponto de vista molecular.

O presente trabalho está inserido no projeto desenvolvido pelos pesquisadores do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, cujo tema é “Estudo genético e seleção de genótipos de *Eucalyptus* e de *Corymbia* aptos à colheita precoce sob espaçamento adensado em áreas com déficit hídrico”, desenvolvido em parceria com pesquisadores do grupo de Bioquímica, Proteômica e Biologia de Sistemas Vegetal e Agroflorestal da Universidade de Córdoba, Espanha e teve como objetivo aplicar as ferramentas proteômicas nos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. existentes no experimento em campo. Já se conhecem a densidade básica da madeira aos 12 e 24 meses, o volume produzido, a quantidade de celulose e hemicelulose e lignina, qualidade do carvão, dentre outros. No campo molecular, o desafio é compreender como se dá a expressão gênica nestes genótipos nestas condições que resultam naquelas características da madeira auferidas previamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Promover o desenvolvimento de pesquisa científica sobre genômica funcional de clones de *Eucalyptus* spp. e de *Corymbia* spp. com fins no aumento da produtividade e na melhoria da qualidade da madeira, pelo uso de ferramentas proteômicas de última geração.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar três diferentes métodos de extração de proteínas totais do tecido cambial de eucalipto, com vistas a determinação da melhor alternativa, levando em conta a dificuldade no preparo deste tipo de amostra vegetal.

Estudar a resposta molecular de genótipos de *Eucalyptus* e *Corymbia* ao cultivo em diferentes espaçamentos de plantio.

Identificar proteínas específicas da região cambial da madeira e sua função na formação do xilema.

Identificar proteínas específicas da região cambial da madeira envolvidas na formação do xilema e responsivas aos diferentes espaçamentos de plantio.

Identificar proteínas específicas da região cambial da madeira envolvidas na formação do xilema genótipo específicas.

Estabelecer um banco de dados sobre o proteoma associado à xilogênese para posteriormente identificar genes de interesse para a manipulação genética.

3 HIPÓTESE

Diferenças fenotípicas entre *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos, no que se refere à qualidade da madeira, podem ser atribuídas, em parte, a diferenças no padrão de regulação de proteínas no xilema em desenvolvimento. Tais diferenças podem contribuir para a expressão de características específicas de cada uma das espécies nestas condições, estando relacionadas com o nível de expressão de genes codificadores de proteínas reguladoras e de enzimas, principalmente das vias de síntese de lignina e celulose.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Os gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* suas importâncias no setor florestal

No cenário mundial, florestas plantadas correspondem a cerca de 264 milhões de hectares, geralmente compostas por pinus e eucaliptos (FAO, 2006). No Brasil, o setor de árvores plantadas ocupa, aproximadamente, 7,8 milhões de hectares, correspondentes a 0,9% do território nacional, e é responsável por cerca de 91% de toda a madeira produzida para fins industriais. Entre as espécies cultivadas, o eucalipto (*Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.) aparece em posição de destaque, seguido por pinus (*Pinus* spp.), seringueira (*Hevea* spp.), acácia (*Acacia* spp.), paricá (*Shizolobium amazonicum*), teca (*Tectona grandis*), araucária (*Araucaria angustifolia*) e outras espécies de menor expressividade (IBA, 2016).

As madeiras provenientes dos povoamentos de eucalipto são voltadas, principalmente, para a produção de matéria prima e para o abastecimento de importantes setores industriais, como os de papel e celulose, energia e construção (LONGUE JUNIOR; COLODETTE, 2013). Mais recentemente, graças ao aumento da demanda por novos produtos madeiráveis, as possibilidades de uso da madeira foram ampliadas com o desenvolvimento de bioprodutos derivados de seus componentes, a exemplo, os biocombustíveis e géis (ASSIS, 2000; SOARES *et al.*, 2003).

O grande destaque dos eucaliptos se deve, principalmente, a alta produtividade de suas florestas. O clima subtropical ou tropical característico na maioria do território brasileiro e as condições edáficas favoráveis possibilitam o crescimento e o maior acúmulo de biomassa. Além disso, programas de melhoramento genético florestal têm disponibilizado materiais genéticos superiores e adaptáveis às diferenças edafoclimáticas observadas nas diferentes regiões onde se pratica silvicultura intensiva. Acrescentam-se o controle de pragas e o uso de técnicas de manejo e colheita florestal de alta tecnologia (ARAÚJO *et al.*, 2017). Como resultado, a idade média de rotação dos plantios de eucalipto brasileiros varia entre cinco e sete anos e a produtividade pode chegar a até 60 m³.há⁻¹.ano⁻¹ (STAPE *et al.*, 2010).

Os gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* estão incluídos na família *Myrtaceae*. Até os anos 90, as espécies que constituem os referidos gêneros eram classificadas unicamente como *Eucalyptus*. Entretanto, indícios de diferenças reprodutivas entre plantas de *Symphyomyrtus* (maioria dos eucaliptos) e de *Corymbia* despertaram o interesse dos taxonomistas em separar estes, até então, subgêneros e rearranjar suas espécies. Devido às evidências, principalmente genéticas, *Corymbia* foi oficialmente considerado um novo gênero pela comunidade científica

(HILL; JOHNSON, 1995). Os resultados de diversos estudos moleculares realizados na década de 1990 indicaram maior similaridade entre os gêneros *Corymbia* e *Angophora* do que entre *Corymbia* e *Eucalyptus* (VALE *et al.*, 2014). Desde então, determinou-se a existência de duas linhagens principais, sendo uma constituída pelos gêneros *Angophora* e *Corymbia* e a outra compreendendo o gênero *Eucalyptus*. Na figura 1 está representado o diagrama das relações filogenéticas dos eucaliptos. Ressalta-se que, ainda que pertencentes a diferentes gêneros, estes grupos estão intimamente relacionados a nível genético, portanto é aceitável que sejam usualmente denominados como eucaliptos.

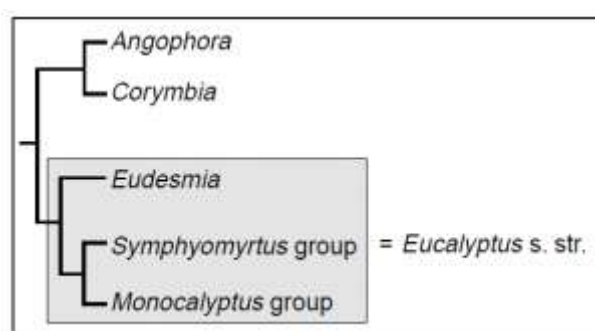


Figura 1 – Relação filogenética dos eucaliptos. Fonte: ROZEFELDS, 1996.

Nativo da Austrália, o gênero botânico *Eucalyptus* possui cerca de 700 espécies identificadas (HOLLIDAY, 2002) e um grande número de variedades e híbridos, conhecidos por sua alta plasticidade e rápido crescimento (ANDRADE, 1993). Este gênero se destaca pela diversidade de espécies botânicas, possivelmente, devido à pressão de seleção causada por alterações ambientais. Seu quadro de distribuição é reflexo de diferentes adaptações a variações edafoclimáticas (FLORENCE, 1985). Apesar do elevado número de espécies descritas, os plantios são restritos a poucas, entre elas *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata* e *E. robusta*. A diversidade de suas propriedades físicas e químicas permitem que as espécies do gênero *Eucalyptus* sejam usadas para diferentes fins como, estacas, moirões e dormentes, lenha e carvão vegetal, papel e celulose, chapas de fibras e partículas, moveis, medicamentos, entre outros. As madeiras de *Eucalyptus* representam excelentes opções para a formação de florestas energéticas devido, principalmente, a forma do fuste que determina alto rendimento no processo de colheita (LOPES, 2017). Atualmente, as principais espécies de *Eucalyptus* usadas no Brasil para a plantação destas florestas são *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis*. Alguns cruzamentos, como *E. urophylla* x *E. camaldulensis* e *E. grandis* x *E.*

camaldulensis, são bastante comuns nas empresas florestais, com boas perspectivas de produtividade e qualidade da madeira. Entretanto, o cruzamento *E. urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*) tem sido um dos mais efetivos na produção de indivíduos superiores para florestas clonais (ASSIS; MAFIA, 2007), possibilitando a transferência de características de interesse da madeira destas espécies, bem como a obtenção de algumas vantagens adaptativas à nova combinação.

O *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, originário da zona norte de Nova Gales do Sul e da costa sul de Queensland, é uma espécie com boa adaptação e crescimento em diferentes condições edafoclimáticas, capaz de produzir grandes volumes de madeira em um curto período. Esta apresenta-se leve e com densidade de aproximadamente $0,50 \text{ g.cm}^{-3}$ (PEREIRA *et al.*, 2000) é usada, principalmente, para produção de papel e celulose, combustível industrial e doméstico, painéis de fibra e aglomerados e para serraria (SOARES *et al.*, 2003). Já o *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake é nativo da Indonésia e de Timor e ocorre em um grupo de ilhas conhecido como grupo menor das ilhas Sonda (MOURA, 2004). A comprovada resistência ao cancro do eucalipto, superior à apresentada por *E. grandis*, despertou o interesse sobre esta espécie e potencializou seu uso (MOURA *et al.*, 1980). Acrescentam-se características como o grande porte de suas árvores, fuste retilíneo e forte dominância apical (BARROSO, 1999). Sua madeira possui densidade mediana. Por sua vez, o *Eucalyptus camaldulensis* Dehn representa outra espécie de grande interesse econômico, sendo uma das primeiras espécies de eucalipto a ser cultivada com êxito fora da Austrália. Além de apresentar ampla distribuição geográfica, esta espécie é capaz de ocupar diversos ambientes ecológicos, apresentando, simultaneamente, tolerância a inundações temporárias e resistência a altas temperaturas (DEL QUIQUI *et al.*, 2011) e bom desenvolvimento em solos relativamente pobres (MARTINS *et al.*, 2002). A madeira produzida por esta espécie é mais dura, pesada e escura do que aquela produzida por *E. grandis* (MARTINS *et al.*, 2002).

Igualmente nativo da Austrália, o gênero *Corymbia* compreende 113 espécies. Algumas das espécies mais importantes deste gênero, vulgarmente conhecidas como “spotted gum” (MARASENI *et al.*, 2009), são *C. citriodora* subsp. *citriodora*, *C. citriodora* subsp. *variegata*, *C. maculata*, *C. henryi*, além de *C. torelliana*, *C. maculata*, *C. calophylla* e *C. ficifolia*. Sua ampla utilização se deve a excelente qualidade de suas madeiras, principalmente em relação às suas propriedades físicas, o que as tornam indicadas para plantios dirigidos a usos múltiplos, construções pesadas, postes, estacas, dormentes, mourões, madeira para compensados e bioenergia (BOLAND *et al.*, 1994; BOOTLE, 2005). Além destes usos, as espécies de *Corymbia* também apresentam grande potencial de produção de óleos essenciais

(VALE *et al.*, 2014). Comparando o crescimento de espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, Vilas Boas *et al.* (2009) concluíram que a espécie *C. citriodora* apresenta melhor produção de madeira. Sem embargo, espécies de *Corymbia* são consideradas de difícil propagação e apresentam baixos índices de enraizamento, com exceção de *C. torelliana*, onde o enraizamento é viável. Devido à esta propriedade, plantios comerciais de *Corymbia* têm sido estabelecidos tradicionalmente por via seminal (REIS *et al.*, 2013). No Brasil, destaca-se o uso das espécies *C. torelliana* e *C. citriodora* para a geração de híbridos e materiais clonais para fins bioenergéticos. Os híbridos de *C. torelliana* x *C. citriodora* apresentam uma série de propriedades positivas. Além do crescimento e densidade, características herdadas de forma aditiva, apresentando valores médios em relação as espécies genitoras, são resistentes à grande maioria das pragas causadoras de danos em plantios de eucalipto.

A espécie *C. citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A. Johnson inclui as duas subespécies *C. citriodora* subsp. *citriodora* e *C. citriodora* subsp. *Variegata* (BROOKER; KLEINIG, 2004), com distribuição natural nas regiões de clima temperado e subtropical do nordeste da Austrália. Esta espécie apresenta árvores com altura de 25 a 40 m e folhas com típico aroma cítrico. Sua casca é lisa e decídua, de cor branca, cinza ou rósea e sua madeira é dura e de cor marrom (LORENZI *et al.*, 2003), sendo excelente para uso energético, fabricação de dormentes, mourões e postes, para construção e serraria (MORA; GARCIA, 2000). A espécie é largamente cultivada para reflorestamentos e também para a extração do óleo essencial de suas folhas. Pouco susceptível às variações edafoclimáticas, seu uso tem sido estimulado em diferentes regiões do país. Já a espécie *Corymbia torelliana* (F. Muell) K.D. Hill & L.A. Johnson é nativa de uma pequena área situada ao norte de Queensland, Austrália, cujo clima é classificado como tropical úmido, sem ou com déficit hídrico moderado (BOLAND *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2010, GOLFARI *et al.*, 1978). A espécie é tolerante a condições ambientais adversas e apresenta boa adaptação, sobretudo, a climas quentes, bem como boa rusticidade e crescimento, mesmo em regiões mais secas (LORENZI *et al.*, 2003; MADEIRA, 2011). Sua madeira apresenta coloração que varia de castanho-claro a marrom e densidade básica média de 0,905 a 1,010 g cm⁻³, que pode ser empregada para a fabricação de dormentes, postes, carvão vegetal e uso em serrarias (GOLFARI *et al.*, 1978), sendo também interessante sob ponto de vista paisagístico (LORENZI *et al.*, 2003). Diversos estudos apontaram o uso medicinal da referida espécie para o tratamento de feridas e úlceras (ADENIYI *et al.*, 2006) e para o de infecções do trato respiratório (LAWAL *et al.*, 2012), revelando uma nova área potencial de valor terapêutico de *C. torelliana*. Seu cruzamento com outras espécies do gênero confere aos híbridos

características de interesse como resistência a doenças e pragas, resistência a geadas, crescimento rápido e, especialmente, bom enraizamento (SMITH, 2005; ASSIS, 2000).

Em consequência do desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas da hibridação e clonagem, bem como de técnicas silviculturais, nas últimas décadas, têm sido registrados aumentos significativos na produtividade das florestas de *Eucalyptus*. O uso da madeira destas espécies é consagrado em diferentes setores e estas plantações desempenham um papel de importância fundamental para o suprimento de madeira em diversas regiões do Brasil e no mundo. Em relação ao gênero *Corymbia*, no passado, suas espécies eram consideradas pouco importantes pelo setor florestal e, portanto, não experienciaram a mesma melhora que as espécies do gênero *Eucalyptus* nos últimos anos. Entretanto, recentemente, o gênero *Corymbia* tem despertado o interesse por parte de pesquisadores e empresas da área, devido à produção, tanto por espécies puras, quanto pelos híbridos, de madeiras de alta qualidade, sua resistência a pragas e doenças e tolerância a extremos climáticos (LEE *et al.*, 2010). Embora pouco explorados, seus híbridos representam uma excelente opção para a obtenção de biomassa para energia, por apresentarem alta densidade básica da madeira (RESENDE *et al.*, 2014). Os híbridos conhecidos como “Torelliodora”, obtidos a partir do cruzamento das espécies *C. torelliana* e *C. citriodora*, compõem materiais genéticos promissores em alguns plantios pilotos na região Norte de Minas Gerais devido a características intrínsecas como alta densidade básica, resistência à déficit hídrico e bom crescimento nesta região.

Em que pese sua vocação florestal, o grande potencial produtivo, tanto para o cultivo quanto para a geração de produtos madeireiros ainda não foi completamente explorado no Brasil (LONGUE JUNIOR; COLODETTE, 2013). Os progressos no melhoramento genético florestal têm estimulado o desenvolvimento tecnológico com vistas ao aumento da produtividade e da precocidade dos plantios. Em adição, estudos avaliando o potencial de espaçamentos mais adensados para a curta rotação florestal têm apresentado vantagens em comparação com o ciclo de corte atual, que é de seis a sete anos (SEIXAS, 2002). Dada à importância dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* como fonte potencial de matéria prima para as indústrias do setor florestal, o desenvolvimento de novos estudos com vistas ao desenvolvimento tecnológico destas espécies tornam-se fundamentais. A partir desta estratégia é possível aumentar a produtividades destas árvores, bem como promover a melhoria na qualidade de suas madeiras, com vistas a obtenção de uma produção alinhada com as exigências das indústrias de base florestal.

4.2 Qualidade da madeira e o espaçamento de plantio

A redução a nível global de recursos florestais e a crescente demanda por madeira são um dos principais motivos que promovem o estabelecimento de plantações de manejo intensivo (GAILING *et al.*, 2009). Neste contexto, um dos objetivos básicos da silvicultura é produzir um alto volume de madeira de um determinado material que seja adequado a cada uso, atendendo, a curto prazo, a demanda por esta matéria prima (BALLONI; SIMÕES, 1980). Um dos aspectos a ser considerado no manejo se refere à escolha adequada do espaçamento de plantio, devido à sua influência direta sob o crescimento individual e conjunto das plantas, sobretudo em florestas de ciclo curto.

O conceito deste tipo de sistema surgiu do termo florestas energéticas. Nele, a madeira é tradicionalmente transformada em cavacos e direcionada à queima direta em caldeiras ou processada em briquetes ou pellets para melhora de suas características físicas e térmicas. Ressalta-se que, os sistemas florestais de curta rotação são conduzidos em condições que diferem do manejo convencional. Além do alto controle de mato competição, fertilização e irrigação, recomendam-se o uso espaçamentos mais adensados, tendo em vista a produção de um maior volume de biomassa por unidade de área em um menor espaço de tempo (CHRISTOPHERSON; MATTSON, 1990). Plantios baseados no sistema florestal de curta rotação vêm exibindo alta produtividade, com valores médios que podem chegar a $120 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (GUERRA *et al.*, 2012), despertando a atenção dos produtores florestais interessados, particularmente, na madeira como suprimento energético.

A definição do espaçamento de plantio relaciona-se diretamente com a densidade de plantas no sítio. À medida que o espaçamento de plantio é reduzido, o número de árvores cresce e tem-se uma maior densidade populacional por unidade de área, o que promove o aumento da competição entre as plantas (SCOLFORO, 1998). Deste modo, alterações relativas as populações de plantas podem diminuir ou ampliar os ganhos em produtividade e determinar certas propriedades da madeira, tendo em vista que estas características são consequência, também, da densidade das plantas nas linhas e do espaçamento entre linhas de plantio. Tanto o espaçamento quanto a densidade de plantas podem ser manipulados a fim de se obter o arranjo (distância entre linhas e entre plantas) mais adequado (TOURINHO *et al.*, 2002).

O entendimento sobre os efeitos ecológicos e silviculturais do espaçamento de plantio adquirem grande importância ao influenciar diretamente os custos de implantação (VALE *et al.*, 1982), manutenção e exploração da floresta (MELLO *et al.*, 1976) a qualidade e a produtividade da madeira produzida, principalmente em florestas de ciclo curto (BERGER,

2000). De modo geral, recomenda-se que o número de árvores por área seja suficiente para o aproveitamento de fatores de crescimento, levando a produção do maior volume de produtos florestais de qualidade, dimensões e formato de interesse (SMITH, 1997). Entretanto, para saber até que ponto é possível controlar a qualidade da madeira é preciso conhecer as propriedades que a determinam e o quanto elas são influenciadas pelas características genéticas e pelas condições ambientais disponíveis (GOULART *et al.*, 2003).

A natureza genética das espécies florestais é, de fato, o principal fator capaz de modificar os padrões de formação, desenvolvimento e qualidade da madeira. Entretanto, quando associada a fatores ambientais podem provocar alterações ainda mais expressivas (SHIMOYAMA; BARRICHELO, 1989). Fatores de origem biótica e abiótica influenciam o crescimento da árvore, o que causa variações nas propriedades dos elementos celulares formados na madeira, na proporção de lenho inicial e tardio e no arranjo de elementos anatômicos (PALERMO *et al.*, 2003). Isso acontece pois, em resposta, as árvores adaptam seus processos fisiológicos às condições ambientais disponíveis (LARCHER, 1980; KOZLOWSKI *et al.*, 1991), com reflexos na atividade cambial (GARTNER, 1995). Como a abundância e a repartição de tais elementos interferem em outras características tecnológicas da madeira (ROQUE; TOMAZELLO, 2009), certamente, fatores ambientais poderão afetá-las. Por sua vez, o espaçamento de plantio, além de promover a expressão de características genotípicas, regula a interferência do ambiente ao determinar o nível de competição por recursos como nutrientes, água, luz e temperatura entre as árvores (HARRINGTON *et al.*, 2009; SHMULSKY; JONES, 2011). Neste sentido, a escolha de espaçamentos apropriados para o plantio espécies florestais é de fundamental importância sobretudo em regiões onde normalmente observa-se a escassez de recursos do ambiente (LELES, 2001).

Geralmente, plantios mais espaçados destinam uma maior área por indivíduo e um maior incremento por árvore, principalmente na fase inicial. Diversos estudos demonstram que espaçamentos maiores promovem um maior crescimento em diâmetro das árvores, bem como maior produção individual em volume e biomassa do fuste por árvore em comparação com espaçamentos menores (CHIES, 2005; BERGER, 2000). Espaçamentos menores, por sua vez, proporcionam maior área basal, volume e biomassa em termos de produção total por hectare, porém diâmetros menores (BERGER *et al.*, 2002; FISHWICK, 1976). Em termos de altura, árvores cultivadas em distâncias reduzidas entre linhas tendem a apresentar melhores valores para esta variável, evidenciando o maior crescimento apical sob uma maior competição por espaço, processo comum em plantas com características heliófitas (KOZLOWSKI *et al.*, 1991).

Em relação às propriedades físicas da madeira, um importante atributo para a determinação da sua qualidade é a densidade básica, que representa a relação entre o peso absolutamente seco da madeira e seu volume quando em estado de saturação de água (FOELKEL *et al.*, 1971). É uma característica resultante da interação entre as propriedades químicas e anatômicas da madeira e está correlacionada com o teor de celulose e extrativos, além da proporção de vasos e parênquima e da espessura da parede celular (FOEKL, 1978). Sua variação ocorre tanto entre espécies quanto dentro da própria árvore e depende, particularmente, das modificações na proporção dos vasos e da espessura da parede celular das fibras. Neste sentido, um aumento da proporção ou da espessura das fibras em relação à proporção dos vasos promove um acréscimo desta variável.

Esta característica parece ser mais influenciada por fatores genéticos do que pelo ambiente (TRUGILHO *et al.*, 2010). Normalmente, a densidade básica da madeira tende a aumentar com a idade em resposta ao aumento da espessura da parede celular e diminuição da largura das células. Como consequência, a madeira nas idades mais avançadas difere significativamente da madeira dos primeiros anos do povoamento. No que diz respeito à influência dos espaçamentos de plantio na densidade básica da madeira os resultados encontrados na literatura são divergentes. Alguns autores afirmam que melhores condições ambientais favorecem a atividade fisiológica e cambial da planta ocasionando uma maior taxa de divisão celular que, frequentemente, não é acompanhada do espessamento da parede celular, o que pode proporcionar uma menor densidade da madeira (BERGÈS *et al.*, 2008). Como exemplo, Garcia *et al.* (2001) verificaram a diminuição da densidade básica da madeira com o aumento do espaçamento de plantio para *E. saligna* e *E. grandis*. Não obstante, Lima *et al.* (2009) e Haselein *et al.* (2002) observaram uma tendência no acréscimo da densidade básica com o aumento do espaçamento de plantio. Nestes casos, a maior disponibilidade de nutrientes observada nos espaçamentos mais amplos ocasiona um maior volume de copa das árvores e, com isso, uma maior quantidade de fotoassimilados é produzida, o que pode contribuir para o aumento da densidade básica da madeira (ROCHA, 2011).

Constituintes químicos da madeira, entre eles a celulose, hemicelulose e lignina, principais componentes da parede celular, também podem apresentar variações entre gêneros, espécies e até mesmo dentro de um mesmo indivíduo (GOMIDE; COLODETTE, 2007) e são influenciados pela pelas variações microclimáticas, edáficas, pluviométricas, nutricionais, estágio de desenvolvimento das árvores, bem como pelas condições de manejo determinantes do crescimento florestal (BRAND, 2010).

A celulose é o mais abundante composto orgânico da natureza, sendo o componente químico majoritário na madeira e o principal constituinte da parede celular vegetal. Trata-se de um polímero linear de alto peso molecular, composto por unidades monoméricas de β -D-glucose, com função estrutural na parede celular (SJÖSTRÖM, 1981). Nos vegetais superiores está presente principalmente sob a forma de fibras junto a outros componentes fundamentais e acidentais (TRUGILHO *et al.*, 1996). Já as hemiceluloses representam os principais polissacarídeos não celulósicos da madeira. Intimamente associados à celulose, as hemiceluloses determinam propriedades estruturais na parede celular e exercem funções na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. Nos eucaliptos, as hemiceluloses são constituídas basicamente de xilanas (PASCOAL NETO *et al.*, 2004), principais hemiceluloses encontradas em vegetais, que compõem até 90% da fração hemicelulósica de madeiras duras e até 50% de madeiras macias. Juntamente com a celulose constituem a fração da madeira e da casca conhecida como holocelulose. As hemiceluloses também atuam como elo químico entre a celulose e a lignina. Em plantios com maior espaçamento entre árvores é comum a ocorrência de redução do teor de hemicelulose e celulose da madeira (ZANUNCIO *et al.*, 2013).

A lignina, por sua vez, representa um dos mais importantes componentes da madeira, correspondendo a 15 a 35% de seu peso. Trata-se de um biopolímero complexo, exibindo estrutura aromática e de alto peso molecular (FENGEL; WEGENER, 1989). Rica em carbono e hidrogênio, apresenta poder calorífico superior quando comparada com os carboidratos presentes na parede celular das plantas (BRAND, 2010). A lignina é o componente mais hidrofóbico da madeira, confere resistência e rigidez às células da parede celular das plantas e está associada à hemicelulose e celulose (BOWYER *et al.*, 2007). Comumente, seu teor é maior em plantas cultivadas em espaçamentos de plantio mais abertos (MOULIN *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2017). Estudando a composição química da madeira de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, Zanuncio *et al.* (2013) constataram um favorecimento da biossíntese deste composto em plantas cultivadas em espaçamentos mais amplos.

É notório que, embora as variações nas composições químicas e físicas da madeira ocorram principalmente em função de fatores genéticos, elas também ocorrem em função de fatores ambientais que influenciam na performance do uso final desta matéria prima.

A diminuição da disponibilidade de luz, água e nutrientes em espaçamentos mais adensados é muito comum, portanto, as respostas a esses fatores em combinação justificam uma investigação mais aprofundada do comportamento das árvores nestas condições. Contudo, a maioria dos estudos tem sido direcionado a fatores unidimensionais, enquanto condições ambientais mais complexas ou determinadas por multifatores permanecem pouco estudadas

(KANT *et al.*, 2011). Ressalta-se que, nestes casos, as respostas metabólicas das árvores geralmente são únicas e, por isso, não podem ser extrapoladas a partir das respostas à fatores ambientais observados de modo isolado (MITTLER, 2006).

Neste contexto, estudos aprofundados relacionados a influência dos espaçamentos de plantio sobre as características da madeira de uma determinada espécie, procedência ou clone são cada vez mais necessários para o sucesso dos plantios florestais, particularmente, daqueles baseados no sistema de curta rotação. Portanto, experimentos que investiguem, ao nível molecular, as propriedades da madeira em diferentes arranjos silviculturais são fundamentais para a seleção efetiva de materiais genéticos que a produzam na quantidade e qualidade desejada para seus diversos usos.

4.3 Proteômica florestal

O grande investimento na área da genética, promovendo avanços tecnológicos significativos neste campo da biologia, a inovação e a consolidação de técnicas de análise genômica, tornou possível o sequenciamento do genoma de seres complexos, permitindo sua análise como um todo. Entretanto, o sequenciamento de genes gera dados limitados, sendo necessária a integração com outras técnicas que possibilitem o estudo dos processos de transcrição dos genes e tradução em seus produtos, as proteínas. Para suprir essa demanda, iniciou-se uma nova etapa na pesquisa biológica conhecida como era pós-genômica, promovendo o desenvolvimento de técnicas para o estudo de transcritos de RNAm (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica), conectadas pela bioinformática (PALSSON, 2002; WECKWERTH *et al.*, 2004). Juntas, estas técnicas conhecidas como “ômicas”, desempenham um papel cada vez mais importante nos estudos florestais, dada a sua capacidade de revelar as bases moleculares de características valiosas, fundamentais para o melhoramento de árvores e seleção antecipada em programas de melhoramento.

O uso da proteômica tem se destacado pela possibilidade de obter informações não disponibilizadas pelo uso de técnicas como a genômica ou transcriptômica. De fato, a genômica fornece a informação contida em um genoma, entretanto, nem sempre essa informação é expressa e tão pouco se observa uma boa correlação entre transcritos e proteínas (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2014). Estudos sobre a biologia celular através do mapeamento de perfis proteicos, quantificação de proteínas, interações entre proteínas e modificações pós traducionais, levaram ao surgimento da proteômica (SALVATO; CARVALHO, 2010). Esta

técnica relativamente recente, permite a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas reguladas em uma unidade biológica, a partir do genoma, em um estágio de desenvolvimento e sob uma condição determinada (WILKINS *et al.*, 1996; CHEN; HARMON, 2006), representando uma ponte entre os genes e suas funções.

Contrário ao genoma, o proteoma de um organismo é dinâmico e pode apresentar variações de acordo com as condições ambientais disponíveis. Através da proteômica espera-se saber como, onde, quando e para que espécies proteicas são produzidas em um organismo, como elas interagem entre si e com outras moléculas para a constituição celular e como trabalham umas com as outras para se adequarem ao crescimento e desenvolvimento programado, bem como para interagir com fatores bióticos e abióticos (ABRIL *et al.*, 2011). Neste contexto, a proteômica representa uma importante ferramenta no melhoramento genético, pois, fornece informações da variabilidade genética realmente expressa no genoma em nível molecular ao oposto do que se observa quando se utilizam marcadores fenotípicos ou baseados em DNA (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Nos últimos anos novos protocolos e plataformas proteômicas foram desenvolvidas, com melhorias contínuas em todas as etapas de trabalho. Geralmente, o fluxo de trabalho de um experimento proteômico padrão baseado em espectrometria de massa inclui etapas de delineamento experimental, amostragem, preparação das amostras (tecido/célula/organela), extração de proteínas, separação de proteínas por meio de técnicas de eletroforese em gel, digestão com proteases das proteínas, análise dos peptídeos resultantes por espectrometria de massa, identificação e quantificação de proteínas através de diferentes algoritmos e bases de dados, validação e interpretação biológica dos resultados (GÓMEZ-GÁLVEZ, 2017).

Uma das etapas mais crítica nestes estudos ainda é o preparo das amostras e a extração de proteínas. Uma vez que nenhuma abordagem única pode revelar completamente o proteoma de um organismo, diferentes protocolos de extração, adaptados conforme as características da espécie, tipo de célula e tecido e propriedades bioquímicas das proteínas de interesse, têm sido desenvolvidos (DUNN, 1993; GÖRG *et al.*, 2004). Os métodos mais comuns são os que usam tampões específicos para a homogeneização do tecido vegetal e solventes orgânicos, como ácido tricloroacético-acetona e fenol, fornecendo extratos proteicos com bom rendimento e o mínimo de interferentes possíveis (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009). De modo geral, recomenda-se que o protocolo de extração seja reproduzível e capaz de capturar e solubilizar o máximo de proteínas em uma dada amostra, minimizando contaminantes não proteicos e artefatos pós-extração (ROSE *et al.*, 2004).

Em relação às proteínas de plantas, um dos maiores problemas encontrados é a presença de componentes interferentes como proteases, compostos fenólicos, pigmentos, carboidratos, além de lipídeos, polissacarídeos de parede e reserva e metabólitos secundários nas amostras, pois estes interagem com as proteínas durante o processo e reduzem a reprodutibilidade de diversas técnicas de análise (CARPENTIER *et al.*, 2005). Buscando melhorar representatividade de proteínas a partir de amostras complexas e tecidos vegetais recalcitrantes, diferentes métodos de otimização de análises proteômicas já foram testados para várias espécies de importância econômica e ambiental. Entretanto, ainda são necessários estudos direcionados a tecidos de espécies florestais, como por exemplo a madeira, cuja região meristemática é rica em proteínas que atuam em sua formação (LEV-YADUN; SEDEROFF, 2000), fornecendo importantes informações acerca dos eventos da expressão gênica envolvidos na xilogênese.

O desenvolvimento de novas técnicas para a separação de peptídeos/proteínas, espectrometria de massa e análises bioinformáticas tem proporcionado um grande avanço nos estudos proteômicos. Melhoras na resolução, precisão, sensibilidade e taxa de varredura de espectrômetros de massa, bem como a introdução dos analisadores de massa híbridos, melhoraram expressivamente as análises proteômicas. Acrescenta-se o desenvolvimento de algoritmos computacionais, capazes de analisar dados proteômicos de modo efetivo, permitindo a identificação e quantificação de proteínas em larga escala (ZHANG *et al.*, 2013).

A informação do proteoma de um organismo pode ser obtida a partir de análises proteômicas do tipo “*top-down*” ou “*bottom-up*”. A análise proteômica do tipo “*top-down*” é empregada para a caracterização de proteínas intactas e apresenta algumas vantagens como sua eficiência para detectar modificações pós traducionais e determinar isoformas de proteína. Entretanto, possui limitações pela energia de colisão necessária na fragmentação proteica, insuficiente para proteínas maiores que 50 KDa, sendo restrita a análise de proteínas purificadas (NESATY; SUTER, 2008). Já a análise proteômica do tipo “*bottom-up*” refere-se à caracterização de proteínas pela análise de seus peptídeos, liberados por proteólise. Neste caso, são empregados géis desnaturantes ou cromatografia líquida. A eletroforese bidimensional (2D) promove a separação de misturas complexas, fornecendo um perfil de distribuição de *spots* constituídos por misturas proteicas simples ou proteínas únicas (PENNINGTON; DUNN, 2001). Entretanto, esta técnica apresenta baixa reprodutibilidade, o que prejudica o resultado das análises, bem como uma baixa cobertura do proteoma (ABRIL *et al.*, 2011). Neste sentido, foram desenvolvidos os métodos livre de gel como alternativa à 2D para a separação de

proteínas, ainda que ambas possam ser empregadas em conjunto em um experimento proteômico (CANOVAS *et al.*, 2004).

Os métodos livres de gel se adequam a desenhos experimentais simples e requerem menos manipulação amostral. Além disso, esta técnica está inserida no contexto da proteômica “*shotgun*”, que possibilita uma maior cobertura do proteoma, bem como a estimativa de proteínas em termos absolutos, permitindo a identificação de proteínas menos abundantes (WASHBURN *et al.*, 2001). A proteômica “*shotgun*” dispensa a separação prévia de proteínas antes da digestão, sendo que os peptídeos resultantes são separados por cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Uma maior resolução pode ser obtida ao incluir etapas de pré-fracionamento antes da LC-MS/MS. Entre os métodos de pré-fracionamento mais usados incluem-se outros tipos de cromatografia, separação inicial por isoeletoenfoque (IEF), ou por géis monodimensionais (1-DE SDS PAGE) (DAVALIEVA *et al.*, 2016). A identificação do peptídeo é realizada por comparação dos espectros de massa em tandem provenientes da fragmentação peptídica com espectros de massa em tandem teóricos originados da digestão *in silico* de uma base de dados de proteínas e a inferência de proteínas é realizada atribuindo sequências peptídicas a proteínas (ZHANG *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a plataforma proteômica mais utilizada em espécies vegetais foram aquelas baseadas na eletroforese (1-DE ou 2-DE) acoplada a espectrometria de massas, resultando na obtenção de baixas coberturas do proteoma (CARPENTIER, 2008). Em espécies florestais, o uso de técnicas de separação baseadas em cromatografia líquida de peptídeos (“*bottom up*”) ou proteínas (“*top-down*”) e de segunda geração para proteômica quantitativa permaneceram, por muito tempo, pouco exploradas (ABRIL *et al.*, 2011). O sequenciamento completo e a análise de genomas de organismos modelo e de outras importantes espécies florestais, aliado ao desenvolvimento de novos protocolos experimentais e a melhorias contínuas em todos os estágios do fluxo de trabalho tem permitido o uso de tecnologias de proteômica em larga escala, como a abordagem “*shotgun*”. Entretanto, essas novas ferramentas são usadas, principalmente, em organismos modelo e espécies agronômicas (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009) e, em menor frequência, em espécies florestais. Ressalta-se que, de modo geral, diversos autores destacam que as variações em nível de proteína e metabolitos são menos pesquisadas em espécies florestais em comparação com espécies herbáceas (WARREN *et al.*, 2011; VALDÉS *et al.*, 2013).

Em relação aos eucaliptos, muitos estudos proteômicos foram realizados nos últimos anos, sendo grande parte deles concentrados na plasticidade e na variabilidade do

proteoma de tecidos formadores de madeira, bem como na regulação das proteínas destes tecidos em resposta a diferentes estímulos ambientais, a maioria empregando-se técnicas proteômicas baseadas em 2-DE (PLOMION, 2003; ANDRADE, 2006; CELÉDON, 2007; MEIRELES, 2006; PEREIRA, 2007; BEDON *et al.*, 2012; BRITTO, 2012; BUDZINSKI, 2012; BUDZINSKI, 2016; CORREIA, 2016). Apenas recentemente, a estratégia proteômica do tipo “*shotgun*” foi empregada para o estudo de alterações no sistema antioxidante e no metabolismo da lignificação em árvores cultivadas em diferentes temperaturas, permitindo a identificação de um grande número de proteínas do tecido cambial envolvidas nestes processos (COSTA, 2017). Esta estratégia também foi empregada no estudo de respostas proteômicas em folhas de *Eucalyptus* submetidas ao déficit hídrico (BORGES, 2016) e na detecção de alterações no proteoma cloroplastidial de plantas de *Eucalyptus* cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂ (SANTOS, 2016).

Estes trabalhos forneceram uma importante base para os estudos relativos a estas espécies, entretanto os estudos proteômicos acerca dos eucaliptos ainda apresentam um grande potencial exploratório, sobretudo após o sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* por Myburg *et al.* (2014) e a disponibilização das sequências em bases de dados de acesso público, o que possibilitou o início de uma nova etapa da pesquisa científica destas espécies e uma extraordinária oportunidade para compreender os processos biológicos envolvidos na formação da madeira a nível de genes e proteínas.

5 REFERÊNCIAS

- ABRIL, N.; GION, J.; KERNER, R.; MULLER-STARCK, G.; CERRILLO, R. N.; PLOMION, C. RENAUT, J.; VALLEDOR, L.; JORRÍN-NOVO, J. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1219-1242, 2011.
- ADENIYI, B. A.; ODUFOWOKE, R. O.; OLALEYE, S. B. Antibacterial and gastroprotective properties of *Eucalyptus torrelliana* [Myrtaceae] crude extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 362-365, 2006.
- ANDRADE, A. M. de. **Efeitos da fertilização mineral e da calagem na produção e na qualidade da madeira e do carvão de eucalipto**. 105 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1993.
- ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 120p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2006.

ASSIS, A. L. **Avaliação de modelos polinomiais segmentados e não segmentados na estimativa de diâmetros e volumes comerciais de *Pinus taeda***. 198 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BOREM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 93-121.

BALLONI, E.; SIMÕES, J. W. **O espaçamento de plantio e suas implicações silviculturais**. Piracicaba: IPEF, 1980.

BARROSO, D. G. **Qualidade de mudas de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* produzidas em tubetes e em blocos prensados com diferentes substratos**. 77 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacases, RJ, 1999.

BEDON, F.; MAJADA, J.; FEITO, I.; CHAUMEIL, P.; DUPUY, J. W.; LOMENECH, A. M.; PLOMION, C. Interaction between environmental factors affects the accumulation of root proteins in hydroponically grown *Eucalyptus globulus* (Labill.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 69-76, 2011.

BERGER, R. **Crescimento e qualidade da madeira de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith sob o efeito do espaçamento e da fertilização**. 126p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

BERGER, R.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER GUIMARÃES, C. A.; HASELEIN, C. R. Efeito do espaçamento e da adubação no crescimento de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p. 75-87, 2002.

BERGÈS, L.; NEPVEU, G.; & FRANC, A. Effects of ecological factors on radial growth and wood density components of sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.) in Northern France. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 3-4, p. 567-579, 2008.

BOLAND, D.; BROKER, M. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINING, D. A.; MCDONALD, M. W.; TURNER, J. D. **Forest trees of Australia**. Melbourne: CSIRO, 2006. 736 p.

BOOTLE, K. R. **Wood in Austrália**: Types, properties and uses. 2. ed. Austrália, Sydney: McGraw-Hill, 2005. 452 p.

BOWYER, J. L.; SHMULSKY, R.; HAYGREEN, J. G. **Forest products and wood science: An introduction**. Ames Iowa, Blackwell Publishing, 2007. 558 p.

BRAND, M. A. **Energia de biomassa florestal**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2010. 103 p.

BRITTO, D. S.; PIROVANI, C. P.; GONZALEZ, E. R.; SILVA, J. F.; GESTEIRA, A. S.; CASCARDO, J. C. M. Oxidative stress proteins as an indicator of a low quality of *Eucalyptus* clones for the pulp and paper industry. **Genetics Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 3798-3813, 2012.

- BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field Guide to Eucalypts**. Volume 1 South-eastern Australia. 2. ed. Australia: Bloomings Books. 1999. 353 p.
- BUDZINSKI, I. G. F.; MOON, D. H.; MOROSINI, J. S.; LINDÉN, P.; BRAGATTO, J.; MORITZ, T.; & LABATE, C. A. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 149, 2016.
- BUDZINSKI, I. G. F. **Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis***. 185 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2012.
- CANOVAS, F. M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRÍN, J.; MOCK, H. P.; & ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 285-298, 2004.
- CARPENTIER, S. C.; PANIS, B.; VERTOMMEN, A.; SWENNEN, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; DEVREESE, B. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 4, p. 354-377, 2008.
- CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; & PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.
- CELEDON, P. A. F.; DE ANDRADE, A.; MEIRELES, K. G. X.; DA CRUZ GALLO DE CARVALHO, M. C.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; ... & LABATE, C. A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v. 7, n. 13, p. 2258-2274, 2007.
- CHEN, S.; HARMON, C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.
- CHIES, D. **Influência do espaçamento sobre a qualidade e o rendimento da madeira serrada de *Pinus taeda* L.** 123 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.
- CHRISTOPHERSON, N. S.; MATTSON, J. A. Mechanization of the Operational Aspects of Short- Rotation Forestry. **Biomass**, v. 22, n. 1-4. p. 123-133, 1990.
- CORREIA, B.; VALLEDOR, L.; HANCOCK, R. D.; RENAUT, J.; PASCUAL, J.; SOARES, A. M.; & PINTO, G. Integrated proteomics and metabolomics to unlock global and clonal responses of *Eucalyptus globulus* recovery from water deficit. **Metabolomics**, v. 12, n. 8, p. 141, 2016.
- COSTA, M. G. de S. **Alterações no proteoma caulinar de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* em resposta a variações de temperatura**. 89p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, 2017.
- DAVALIEVA, K.; MALEVA KOSTOVSKA, I.; & DWORK, A. J. Proteomics research in schizophrenia. Proteomics research in schizophrenia. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 10, p. 18, 2016.

DEL QUIQUI, E. M.; MARTINS, S. S.; SHIMIZU, J. Y. Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* sp. para o Noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scintiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1173-1177, 2001.

DESLAURIERS, A., MORIN, H. Intra-annual tracheid production in balsam fir stems and the effect of meteorological variables. **Trees**, n. 19, p. 402-408, 2005.

DUNN, J. Detection of total proteins on western blots of 2-D polyacrylamide gels. In: **2-D Proteome Analysis Protocols**. Humana Press, 1999. p. 319-329.

ESAU, K. Anatomy of seed plants. **Soil Science**, v. 90, n. 2, p. 149, 1960.

FAO. Global Forest Resource Assessment 2005: Progress towards sustainable forest management. **FAO Forestry Paper**, v. 147, p. 320, 2005.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry ultrastructure reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 610 p.

FERREIRA, D. H. A. A.; DOS SANTOS LELES, P. S.; MACHADO, E. C.; DE ABREU, A. H. M.; ABILIO, F. M. Crescimento de clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em diferentes espaçamentos. **Floresta**, v. 44, n. 3, p. 431-440, 2014.

FISHWICK, R. W. Estudos de espaçamentos e desbastes em plantações brasileiras. **Brasil florestal**, v. 7, p. 13-23, 1976.

FLORENCE, R. G. Eucalypt forests and woodlands. In: **Think trees grow trees**. Department of Arts, Heritage and Environment in association with the Institute of Foresters of Australia. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1985, 210 p.

FOELKEL, C. Aplicações da Biotecnologia em Processos Industriais de Fabricação de Papel de Eucalipto. *Eucalyptus* online book. Disponível em: http://eucalyptus.com.br/eucaliptos/PT33_Biotecnologia_Papel.pdf. Acesso em: 01/01/2019.

FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V. de; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F. de; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2010. 200 p.

GAILING, O.; VORNAM, B.; LEINEMANN, L.; & FINKELDEY, R. Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 509-519, 2009.

GARCIA, C. H.; CORRADINE, L.; ALVARENGA, S. F. Comportamento florestal de *Eucalyptus grandis* em diferentes espaçamentos. **IPEF**, n. 179, p. 1-8, 1991.

GARTNER, B. L. **Plant stems: physiology and functional morphology**. Elsevier, 1995. 440 p.

GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2ª. Aproximação)**. Belo Horizonte: PRODEPEF, 1978. 66 p.

GOMEZ-GALVEZ, I. M. **Optimización de técnicas de proteómica ‘shotgun’ para la caracterización del proteoma de encina (*Quercus ilex*)**. 33 p. Dissertação (Mestrado) – Universidad de Córdoba, Córdoba, 2018.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L. Qualidade da madeira. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Editora: Viçosa, p. 25-54, 2007.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J.; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GOULART, M.; HASELEIN, C. R.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J. A.; & PAULESKI, D. T. Massa específica básica e massa seca de madeira de *Eucalyptus grandis* sob o efeito do espaçamento de plantio e da posição axial no tronco. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p. 167-175, 2003.

GRIČAR, J.; ZUPANČIČ, M.; ČUFAR, K.; OVEN, P.: Regular cambial activity and xylem and phloem formation in locally heated and cooled stem portions of Norway spruce. **Wood Science Technology**, n. 41, v. 6, p. 463-475, 2007

GROZDITS, G.A.; IFJU, G. Differentiation of tracheids in developing secondary xylem of *Tsuga canadensis* L. Carr. Changes in morphology and cell-wall structure. **Wood Fiber Science**, n. 16, p. 20-36, 1984.

GUERRA, S. P. S.; SANCAS, K. P.; GARCIA, E. A.; SPINELLI, R. Eucalipto adensado: manejo para florestas energéticas. In: LEMOS, E. G. M.; NELSON, R. S. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012, p.125-161.

GUERRIERO, G.; SERGEANT, K.; HAUSMAN, J. F. Wood biosynthesis and typologies: a molecular rhapsody. **Tree Physiology**. V. 34, p. 839–855, 2014.

HARFOUCHE, A.; MEILAN, R.; KIRST, M.; MORGANTE, M.; BOERJAN, W.; SABATTI, M.; MUGNOZZA, G. S. Accelerating the domestication of forest trees in a changing world. **Trends in plant science**, v. 17, n. 2, p. 64-72, 2012.

HARRINGTON, T. B.; HARRINGTON, C. A.; DEBELL, D. S.; Effects of planting spacing and site quality on 25-year growth and mortality relationships of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 1, p. 18-25, 2009.
HASELEIN, C.R.; BERGER, R.; GOULART, M. Propriedades de flexão estática da madeira e umidade e a 12% de umidade de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith sob efeito do espaçamento e da adubação. **Ciência Florestal**, v.12, n.2, p.147-152, 2002.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Londres: Springer Verlag, 2012.

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. Systematic studies in the eucalyptus 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v. 6, p. 185-504, 1995.

HOLLIDAY, I. A field guide to Australian trees. Sydney: Reed New Holland, 2002. 328p.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Anuário Estatístico IBÁ 2016**. Brasília, 2016. 96 p.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRIA-ZOMENO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 2009.

JORRÍN-NOVO, J.; NAVARRO-CERRILLO, R. M. Variabilidad y respuesta a distintos estreses em poblaciones de encina (*Quercus ilex* L.) en Andalucía mediante una aproximación proteómica. **Ecosistemas**, n. 23, v. 2, p. 99-107, 2014.

KANT, S.; BI, Y.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2010.

KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J. PALLARDY, SG. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academic Press, 1991. 657 p.

LARCHER, W. 1980. **Physiological Plant Ecology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1980. 303 pp.

LARSON, P. R. The vascular cambium: development and structure. Berlin: Springer, 1994. 725 p.

LAWAL, T. O.; ADENIYI, B. A.; MOODY, J. O.; MAHADY, G. B. Combination studies of *Eucalyptus torelliana* F. Muell leaf extracts and Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. **Phytotherapy Research**, n. 26, p. 1393-1398, 2012.

LEE, D. J.; HUTH, J. R.; OSBORNE, D. O.; HOGG, B. W. Selecting hardwood taxa for wood and fibre production in Queensland's subtropics. **Australian Forestry**, Melbourne n.73, p. 106-114, 2010.

LELES, P. S. S.; REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; MORAIS, E. J. Crescimento, produção e alocação de matéria seca de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. pellita* sob diferentes espaçamentos na região de cerrado, MG. **Scientia Forestalis**, v. 59, p. 77-87, 2001.

LELES, P. S. S. Relações hídricas e crescimento de árvores de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus pellita* sob diferentes espaçamentos na região de cerrado. **Revista Árvore**, v. 22, n. 1, p. 41-50, 1998.

LEV-YADUN, S.; SEDEROFF, R.; Pines as model gymnosperms to study evolution, wood formation, and perennial growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, n. 3, p. 290-305, 2000.

LIMA, I. L.; MONTEIRO, B. F. S.; LONGUI, E. L. Influência do espaçamento em algumas propriedades físicas da madeira de *Tectona grandis* Linn, **Revista Cerne**, v.15, n.2, p.244-250, 2009.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

LOPES, E. D. **Avaliação de clones de *Eucalyptus* spp e *Corymbia* spp em diferentes espaçamentos visando à produção de bioenergia**. Tese (doutorado). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2017.

LOPES, E. D., DE LAIA, M. L., DOS SANTOS, A. S., SOARES, G. M., LEITE, R. W. P., & DE SOUZA MARTINS. Influência do espaçamento de plantio na produção energética de clones de *Corymbia* e *Eucalyptus*. **Floresta**, v. 47, n. 1, p. 95 - 104, 2017.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 352 p.

MARASENI, T. N.; COCKFIELD, G.; & MAROULIS, J. An assessment of silvipasture potential in southeast Queensland, Australia. **Australasian Journal of Regional Studies**. v. 15, n. 3, p. 297, 2009.

MARTINS, I.S.; PIRES, I.E. & OLIVEIRA, M.C. Divergência genética em progênies de uma população de *Eucalyptus camaldulensis*. **Floresta Ambiente**, v. 9, p. 81-89, 2002.

MEIRELES, K. G. X. **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa**. 117 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2006.

MELLEROWICZ, E. J.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. In: **Plant Cell Walls**. Springer, Dordrecht, 2001. p. 239-274.

MELLO, H. A.; SIMÕES, J. A.; SORR, J. M. Influência do espaçamento e da idade de corte na produção de madeira de eucalipto em solo de cerrado. **IPEF**, v.13, p.143-62, 1976.

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

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

MOULIN, J. C.; ARANTES, M. D. C.; VIDAURRE, G. B.; PAES, J. B.; CARNEIRO, A. de C. O. Efeito do espaçamento, da idade e da irrigação nos Componentes químicos da madeira de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 199-208, 2015.

MOURA, V.P.G. et al. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo**: resultados parciais. Brasília: EMBRAPA/CPAC; 1980. 104 p.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; MERWE, K.; SINGH, P.; JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.;

TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T. J.; YE, C-Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M. M.; CLEMENTE, H. S.; SAIDI, N.; CASSANWANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C. A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A. R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSE, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; LHEIM, C.K.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JR, JG. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J. J.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.

PALERMO, G. P. M.; LATORRACA, J. V. F.; REZENDE, M. A.; NASCIMENTO, A. M.; SEVERO, E. T. D.; ABREU, H. S. Análise da densidade da madeira de *Pinus elliottii* Engelm. por meio de radiação gama de acordo com as direções estruturais (longitudinal radial) e a idade de crescimento. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.47-57, 2003.

PALSSON, B. In silico biology through “omics”. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 649, 2002.

PARHAM, R. A. Wood defects. In: KOCUREK, M. J.; STEVENS, C. F. B. (Ed.). **Pulp and paper manufacture**. 3. ed. Montreal: Canadian Pulp and Paper Association, 1983. p. 66-79.

PASCOAL NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D.; EVTUGUIN, D. V.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C. R.; SANTIAGO, A. S.; HOLMBOM, B. Bulk and surface chemical composition of ECF-bleached hardwood kraft pulp fibres: A comparative study. **Nordic Pulp e Paper Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 513-520, 2004.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. Proteomics: from protein sequence to function. Garland Science, 2001.

PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 113 p.

PEREIRA, Jackeline Leite et al. **Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus***. 180p. Tese (Doutorado). Universidade Católica de Brasília. 2007.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant physiology**, v. 127, n. 4, p. 1513-1523, 2001.

PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BAILLÈRES, H. Identification of tension-wood responsive proteins in the developing xylem of *Eucalyptus*. **Holzforschung**, v. 57, p. 353-358, 2003.

REIS, C. A. F.; ASSIS, T. F. de; SANTOS, A. M.; PALUDZYSZYN FILHO, E. *Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. 48 p.

RESENDE, M. D. V.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D.; PIRES, I. E. Genética e melhoramento do Eucalipto. In: VALE, A. B.; MACHADO, C. C.; PIRES, J. M. M.; VILAR, M. B.; COSTA, C. B.; NACIF, A. P. **Eucaliptocultura no Brasil: silvicultura, manejo e ambiência**. Viçosa: SIF, 2014. p. 103-119.

ROCHA, M.F.V. **Influência do espaçamento e da idade na produtividade e propriedades da madeira de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* para energia**. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

ROQUE, R. M.; TOMAZELLO FILHO, M. Variação radial da estrutura anatômica do lenho de árvores de *Gmelina arborea* em diferentes condições de clima e de manejo na Costa Rica. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 83, p. 273-285, set. 2009.

ROSE, J. K.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J. J.; JAHN, M. M.; & SARAVANAN, R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The plant journal**, v. 39, n. 5, p. 715-733, 2004.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, p. 727-734, 2010.

SANTOS, B. M. **Cultivo de *Eucalyptus urograndis* em atmosfera enriquecida com CO₂: mudanças no proteoma cloroplastidial**. 110 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, 2016.

SCOLFORO, J. R. **Manejo florestal**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 438 p.

SEIXAS, F. Efeitos físicos da colheita mecanizada de madeira sobre o solo. In: GONÇALVES, J. L. M.; STAPE, J. L. (Ed.). **Conservação e cultivo de solos para plantações florestais**. Piracicaba: IPEF, 2002, p. 313-350.

SHIMOYAMA, V. R. S.; BARRICHELO, L. E. G. Densidade básica da madeira, melhoramento e manejo florestal. Piracicaba: IPEF/ESALQ, 1989. 22 p.

SHMULSKY, R.; JONES, P. D. Forest products and wood science: an introduction. Wiley-Blackwell, 2019. 504 p.

SILVEIRA, V. **Comportamento de clones de *Eucalyptus* em diversos ambientes definidos pela qualidade de sítio e espaçamento**. 124 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, 1999.

SJÖSTRÖN, E. **Wood chemistry**. Nova York: Academic Press, 1981. 223p.

SMITH, D. M.; LARSON, B. C.; KELTY, M. J.; & ASHTON, P. M. S. **The practice of silviculture: applied forest ecology**. John Wiley and Sons, 1997.

SMITH, H. *Corymbia* breeding and deployment program. *Corymbia* Research Meeting: Underpinning development of a profitable hardwood plantation industry in northern Australia by research into *Corymbia* species and hybrids. **Forests NSW**, p. 22-23, 2005.

SOARES, T. S.; VALE, A. B. D.; LEITE, H. G.; & MACHADO, C. C. Optization of multiproducts in forest stands. **Revista Árvore**, v. 27, n. 6, p. 811-820, 2003.

STAPE, J. L. **Utilização de delineamento sistemático tipo leque no estudo de espaçamentos florestais**. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

TOURINHO, M.C.C.; REZENDE, P.M. de; SALVADOR, N. Espaçamento, densidade e uniformidade de semeadura na produtividade e características agronômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1071-1077, 2002.

TRUGILHO, P. F.; LIMA, J. T.; & MENDES, L. M. Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus saligna*. **Cerne**, v. 2, n. 1, p. 94-111, 1996.

TRUGILHO, P. F.; ARANTES, M. D. C.; PÁDUA, F. A. de; ALMADO, R. P.; BALIZA, A. E. R. R. Estimativa de carbono fixado na madeira de um clone híbrido de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, **Revista Cerne**, v. 16, p. 33-40, 2010.

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

VALE, A. B.; MACHADO, C. C.; PIRES, J. M. M.; VILAR, M. B.; COSTA, C. B.; NACIF, A. P. **Eucaliptocultura no Brasil: Silvicultura, Manejo e Ambiência**. Viçosa: SIF, 2014. 551p.

VALE, A. B.; PAIVA, H. N. & FELFILI, J. M. **Influência do espaçamento do sítio na produção florestal**. Boletim Técnico SIF, n.4, 1982. 20 p

VILAS BÔAS, O.; MAX, J.C.M.; MELO, A.C.G. Crescimento comparativo de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* no município de Marília-SP. **Revista Instituto Florestal**, v.21, n.1, p.63-72, 2009.

WARREN, C. R.; ARANDA, I.; & CANO, F. J. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* sp. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 10, p. 1609-1629, 2011.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; & YATES III, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242, 2001.

WECKWERTH, W.; LOUREIRO, M. E.; WENZEL, K.; & FIEHN, O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 20, p. 7809-7814, 2004.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; & HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838, 1996.

ZANUNCIO, A. J. V.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B.; CARNEIRO, A. D. C. O.; & VITAL, B. R. Composição química da madeira de eucalipto com diferentes níveis de desbaste. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 4, p. 755-760, 2013.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M. C.; YATES, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-94, 2013.

CAPITULO 2 – AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO CAMBIAL DE EUCALIPTO

RESUMO

Embora represente uma fonte natural de energia de grande importância econômica e ambiental, pouco se conhece sobre os mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos envolvidos na formação da madeira. Uma ferramenta bastante útil para o estudo desses processos é a proteômica. Entretanto, o sucesso da análise de qualquer proteoma depende fundamentalmente de uma eficiente extração das proteínas, o que pode variar de acordo com a recalcitrância do material analisado e a remoção dos contaminantes. Nesse aspecto, o tecido cambial, excelente fonte de células para esse tipo de estudo, possui natureza altamente recalcitrante, com elevados níveis de enzimas oxidativas, compostos fenólicos, carboidratos e outros metabólitos considerados interferentes que devem ser removidos na etapa de extração proteica. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de três protocolos de extração de proteínas da região cambial da madeira de eucalipto: o método ácido de precipitação de proteínas com TCA/acetona (TCA/acetona) e os métodos fenólicos de precipitação de proteínas com TCA/acetona e extração subsequente com fenol (TCA/acetona/fenol) e de solubilização de proteínas com solução tampão, extração subsequente com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol). A avaliação foi feita em termos da comparação da concentração de proteínas totais extraídas por meio de cada procedimento, utilizando-se o método de Bradford. Também foi avaliada a influência dos protocolos de extração no perfil proteico do material amostral mediante eletroforese SDS-PAGE. De modo geral, proteínas extraídas com solução tampão combinada com fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol apresentaram melhor qualidade, alto rendimento e bandas com melhores intensidades em comparação com os outros métodos de extração, mostrando-se como o mais indicado para os estudos proteômicos deste tipo de tecido.

Palavras-chaves: *Eucalyptus*. Câmbio vascular. Tecidos recalcitrantes Extração proteica.

CHAPTER 2 - EVALUATION OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FOR PROTEOMIC ANALYSIS OF EUCALYPTUS CAMBIAL TISSUE

ABSTRACT

Although represents a natural source of energy of great economic and environmental importance, little is known about the cellular, molecular and biochemical mechanisms involved in wood formation. Proteomics is a very useful tool for studying these processes. However, the success of proteome analysis depends fundamentally on efficient protein extraction, which may vary depending on the recalcitrance of the material analyzed and the removal of contaminants. In this respect, cambial tissue, an excellent source of cells for this study, has a highly recalcitrant nature, with high levels of oxidative enzymes, phenolic compounds, carbohydrates and other metabolites considered interfering that must be removed in the protein extraction step. The objective of this study was to evaluate the efficiency of three protocols for the extraction of proteins from the cambial region of eucalyptus wood: the acid method of protein precipitation with TCA / acetone (TCA / acetone) and the phenolic methods of protein precipitation with TCA / acetone and subsequent phenol extraction (TCA / acetone / phenol) and protein solubilization with buffer solution, extraction phenol and precipitation with ammonium acetate in methanol (buffer solution / phenol / ammonium acetate in methanol). The evaluation was made in terms of comparing the total protein concentration extracted using the Bradford method. The influence of extraction protocols on the protein profile of the sample material was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis. In general, proteins extracted with phenol combined buffer and precipitated with ammonium acetate in methanol showed quality, high yield and intense bands. This has been the preferred method for proteomic studies of this tissue.

Keywords: *Eucalyptus*. Vascular cambium. Recalcitrant tissues. Protein extraction.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido cada vez mais crescente a identificação de genes e proteínas relacionados aos mecanismos de formação da madeira e sua utilização no melhoramento genético florestal. Para a caracterização dessas moléculas, metodologias modernas podem ser utilizadas, como a proteômica. Esta técnica relativamente recente permite a análise sistemática do conjunto de proteínas reguladas em uma célula ou tecido, em decorrência direta das condições externas e da situação do organismo em um determinado momento, a partir do genoma e representa uma ponte entre os genes e suas funções.

Em que pese sua constante evolução, a proteômica apresenta uma limitação central. Apenas uma fração de proteínas sintetizadas, normalmente proteínas solúveis totais, pode ser detectada em estudos proteômicos. Neste sentido, uma boa preparação amostral, isto é, a extração do maior número de proteínas de uma célula, tecido ou órgão é a mais importante etapa para a subsequente separação, resolução e identificação proteica (PARK, 2004). A escolha do protocolo de extração mais adequado para o tipo de material a ser estudado e o correto preparo das amostras pode garantir o sucesso dos estudos proteômicos (ROSE *et al.*, 2004). Além de ser avaliado e otimizado de acordo com o sistema experimental a ser estudado, o protocolo escolhido deve ser compatível com as demais etapas do fluxo de trabalho proteômico (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2018).

Uma vez que nenhuma abordagem única pode revelar completamente o proteoma de um organismo, diferentes protocolos de extração, adaptados conforme as características da espécie, tipo de material e propriedades bioquímicas das proteínas de interesse, têm sido desenvolvidos para estudos proteômicos (DUNN, 1993; GÖRG *et al.*, 2004). Os métodos mais comuns são os que usam tampões específicos para a homogeneização do tecido vegetal e os que utilizam solventes orgânicos como ácido tricloroacético-acetona e fenol, fornecendo extratos proteicos com bom rendimento em termos quantitativas e o mínimo de interferentes possível (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009). Neste aspecto, nos últimos anos dois protocolos básicos foram apresentados: a extração fenólica, desenvolvida por Hurkman e Tanaka (1986) e que representa uma alternativa eficaz para o isolamento de proteínas de amostras biológicas em compostos fenólicos e a extração ácida, desenvolvida por Damerval *et al.* (1986), um procedimento rápido e também bastante eficiente para uma variedade de materiais. Posteriormente, Wang *et al.* (2003) combinaram esses dois protocolos, associando a precipitação através de TCA/acetona à extração com fenol (SHIOSE *et al.*, 2019).

Quanto à extração de proteínas de plantas, um dos maiores problemas observados é a presença de grande quantidade de componentes interferentes como proteases, compostos fenólicos, pigmentos, carboidratos, além de lipídeos, polissacarídeos de parede e reserva e metabolitos secundários nas amostras que interagem com as proteínas durante o processo e reduzem a reprodutibilidade de diversas técnicas de análise (CARPENTIER *et al.*, 2005). Além disso, a presença de parede celular nas células vegetais exige sua ruptura para posterior lise celular, dificultando o processo de extração proteica. Uma outra característica diz respeito à massa celular que é composta em grande parte pela própria parede celular e pelo vacúolo, o que pode ocasionar um menor rendimento da extração proteica (ISAACSON *et al.*, 2006), sendo necessário o ajuste da massa de amostra de tecido inicial a ser utilizada na extração (SHIOSE *et al.*, 2019). Devido a tais particularidades, o protocolo de extração em uma dada amostra vegetal deve, além de ser reproduzível e capaz de capturar e solubilizar o máximo de proteínas possível, minimizar a presença de contaminantes não proteicos, bem como a ocorrência de degradação e modificações proteicas durante o processo de extração (ROSE *et al.*, 2004; JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009).

Buscando melhorar representatividade de proteínas a partir de amostras complexas e tecidos vegetais recalcitrantes, diferentes métodos de otimização de análises proteômicas já foram testados para uma grande variedade de espécies vegetais. Entretanto, ainda faltam estudos direcionados a tecidos de espécies florestais, como o tecido cambial, um meristema rico em proteínas que atuam na formação da madeira (LEV-YADUN; SEDEROFF, 2000) e que, por isso, fornece importantes informações acerca dos eventos da expressão gênica envolvidos na xilogênese.

Dada à importância ambiental e econômica dos eucaliptos, a necessidade do entendimento dos processos envolvidos na formação da madeira e a carência de estudos envolvendo o seu proteoma, o objetivo deste estudo foi testar diferentes protocolos de extração de proteínas totais do tecido cambial dessas espécies. Foram avaliados três protocolos básicos, comumente empregados em tecidos vegetais: o método ácido de precipitação de proteínas com TCA/acetona (TCA/acetona) e os métodos fenólicos de precipitação de proteínas com TCA/acetona e extração subsequente com fenol (TCA/acetona/fenol) e de solubilização de proteínas com solução tampão, extração subsequente com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol). Esses métodos vêm demonstrando grande eficácia para a extração de proteínas de plantas (CARPENTIER *et al.*, 2005).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

As amostras de tecido cambial foram coletadas a partir de árvores de *Eucalyptus* spp. localizadas no Campus da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, em Diamantina, Minas Gerais. Estas amostras foram utilizadas para o estabelecimento e a padronização das metodologias de extração de proteínas e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

O tecido cambial, ou xilema em desenvolvimento, usado nas análises proteômicas, foi coletado a partir da retirada da casca de uma área retangular de 10 x 20 cm, localizada a 10 cm acima e 10 cm abaixo do DAP (Diâmetro a altura do peito ou a 1,30 m do solo), e da raspagem, com auxílio de uma lâmina de bisturi, de todo o tecido jovem existente entre a casca e o xilema lignificado (FIGURA 2). Para esta análise foi coletada a região cambial de 5 árvores, distribuídas igualmente em três *bulks*, perfazendo três réplicas biológicas.

As amostras de tecido cambial coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para transporte até o Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da UFVJM, onde foram submetidas a liofilização seguida de pulverização. Posteriormente, as amostras foram enviadas ao laboratório de Bioquímica, Proteômica e Biologia de Sistemas Vegetal e Agroflorestal da Universidade de Córdoba - UCO, Espanha, onde foram realizadas todas as análises proteômicas.



Figura 2 – Detalhe da coleta de tecido cambial. (A) Retirada da casca. (B) Raspagem do tecido depositado na parte interna da casca e no xilema lignificado. (C) Deposição do tecido coletado em tubos para posterior congelamento em nitrogênio líquido.

2.2 Protocolos para extração de proteínas

Neste ensaio, foram testados três diferentes métodos de extração de proteínas: os métodos de precipitação de proteínas por TCA/acetona (DAMERVAL *et al.*, 1986), precipitação de proteínas com TCA/acetona e extração subsequente com fenol, descrito por Wang *et al.* (2003) e de solubilização de proteínas com Tampão de extração e extração subsequente com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, descrito por Hurkman e Tanaka (1986), ambos com modificações. Os métodos foram avaliados usando um único *pool* de tecido cambial previamente coletado, liofilizado e pulverizado.

2.2.1 Procedimento baseado em precipitação com TCA/acetona

Para esse ensaio, 0,3 g de tecido cambial liofilizado e pulverizado foram pesados e distribuídos em três tubos de 2 mL (0,1 g em cada tubo), totalizando três réplicas técnicas da amostra. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % em acetona, contendo 0,07 % ditioneitol (DTT). Em banho de gelo, as amostras foram levadas ao sonicador (Ultrasonic homogenizer – Sonic Ruptor 250) a uma amplitude de 60, durante 10 s. Após a sonicação, as amostras tiveram seu volume completo até 2 mL com a mesma solução citada anteriormente, foram precipitadas overnight a -20° C e, em seguida, centrifugadas a 12000 rpm, a 4° C, durante 10 min. Ao final, o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* foi recuperado. Cada *pellet* recuperado foi ressuspensionado em 2 mL de acetona pura, conservada a -20° C, seguido de agitação, inversão manual e centrifugação a 12000 rpm, a 4° C, por 10 min. Novamente, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* foi recuperado. Este procedimento foi repetido por duas vezes para lavagem do *pellet* e remoção de resíduos de TCA. Após esta etapa, os *pellets* foram secos e solubilizados durante 4 h em 400 µL meio de solubilização constituído por 7 M de ureia, 2 M de tioúreia, 4 % (p/v) CHAPS, 2 % (v/v) Triton-X 100, 100 mM ditioneitol (DTT), em agitação constante, a 4° C. Devido à pouca solubilização dos *pellets*, observada ao final do procedimento, estes foram novamente centrifugados a 12000 rpm, a 4° C, por 10 min e o sobrenadante obtido em cada amostra foi recuperado em novos tubos.

2.2.2 Procedimento baseado em precipitação com TCA/acetona e extração subsequente com fenol

Inicialmente, 0,3 g de tecido cambial liofilizado e pulverizado foram pesados e distribuídos em três tubos de 2 mL (0,1 g em cada tubo) contendo 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % em acetona, contendo 0,07 % de diotretol (DTT). As amostras foram homogeneizadas, sonicadas por 10 s e centrifugadas por 10 min, a 12000 rpm, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* recuperado em cada tubo foi lavado por duas vezes com acetona 80%, conservada a -20° C, sendo as lavagens seguidas de centrifugação por 10 min, a 12000 rpm, a 4° C. Ao *pellet* final, seco por cerca de 30 min, adicionou-se 800 µL de SDS Buffer, composto por 30% sacarose, 2% dodecil sulfato de sódio SDS, 5% β-mercaptoetanol e 0,1 M Tris pH 8 e, em sequência, o mesmo volume de fenol (Phenol pH 8 Sigma). As amostras foram homogeneizadas, incubadas por 5 min no gelo e, posteriormente, centrifugadas por 10 min, a 12000 rpm, a 4° C. O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo contendo cerca de 2 mL de tampão de precipitação, composto por 0,1 M acetato de amônio em metanol 100%, conservado a -20° C. O material foi homogeneizado e as proteínas foram precipitadas por 16 h, a -20° C. Após 24 h, os tubos foram centrifugados por 10 min, a 12000 rpm, a 4° C e o sobrenadante obtido foi descartado. O *pellet* recuperado foi lavado uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 80%, ambos mantidos a -20° C. Em cada lavagem as proteínas foram recuperadas por precipitação nas mesmas condições anteriores. Os *pellets* resultantes foram secos por 30 min, ressuspensos em 100 µL meio de solubilização composto por 7 M de Úreia, 2 M de Tioúreia, 4 % (p/v) CHAPS, 2 % (v/v) Triton-X 100, 100 mM ditiotretol (DTT) e homogeneizados por 2 h em agitação constante a 4° C.

2.2.3 Procedimento baseado em solubilização com Tampão de extração e fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol

Para o desenvolvimento do protocolo, inicialmente, 0,3 g de tecido cambial liofilizado e pulverizado foram pesados e distribuídos em três tubos de 2 mL (0,1 g em cada tubo). A extração consistiu em homogeneizar 0,1 g de tecido cambial de eucalipto, previamente liofilizado, em 1 mL de tampão de extração constituído de 1% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP), 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M de sacarose, 2 % (p/v) β-mercaptoetanol e 1 % mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) em um tubo de 2 mL do tipo Eppendorf. Foram realizadas 3 réplicas técnicas da amostra. Após

homogeneização das amostras por 30 min e a 4° C, acrescentou-se o mesmo volume de fenol saturado em Tris pH 8,1 em cada tubo e, novamente, o material foi submetido a homogeneização nas mesmas condições, seguida de centrifugação por 30 min a 12000 rpm, a 4° C. A fase fenólica recuperada após a centrifugação foi transferida para um novo tubo e re-extraída com a adição de volumes iguais de tampão de extração e, em seguida, de fenol, sendo homogeneizada a cada acréscimo e, posteriormente, centrifugada nas mesmas condições anteriores, por 3 vezes para remoção de possíveis resíduos. A fase fenólica recuperada na última re-extração foi transferida para tubos de 5 mL e precipitadas por 16 h a -20° C pelo acréscimo de 4 volumes de tampão de precipitação, composto por 0,1 M de acetato de amônio em metanol 100%, conservado a -20° C. No dia seguinte, a fase fenólica em tampão de precipitação foi centrifugada por 30 min a 12000 rpm a 4° C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet recuperado em cada um dos tubos foi lavado três vezes com tampão de precipitação e uma vez com acetona 80 %, sendo que, em cada etapa as proteínas foram precipitadas por 30 min a -20° C e centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. O pellet final foi seco por 30 min e ressuspendido em 100 µL de tampão de solubilização, composto por 7 M de úrea, 2 M de tiourea, 4 % (p/v) CHAPS, 2 % (v/v) Triton-X 100, 100 mM ditiotretol (DTT) e, em seguida, homogeneizado por 2 hrs em agitação constante a 4° C.

2.3 Quantificação de proteínas

Após a obtenção dos extratos proteicos, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para isso, foi preparada uma curva de calibração para a quantificação de proteínas, utilizando albumina de soro bovino como padrão. A partir de uma solução estoque de BSA (10 mg/mL) foram feitas 5 diluições em água destilada deionizada, com as concentrações 0, 2, 4, 6 e 8 mg/mL. Para a leitura de absorbância foram aplicados 1 µL das amostras de proteína, 499 µL de água destilada deionizada e 500 µL de reagente Bradford nas cubeta e em triplicata. As cubetas foram incubadas por cerca de 5 min em temperatura ambiente e, em seguida, o valor de absorbância foi obtido em espectrofotômetro (Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometers), através do software InSight (Thermo Scientific™), usando o comprimento de onda de 595 nm. Os dados de absorbância encontrados foram plotados no Excel e a curva de calibração foi construída, obtendo-se a equação de ajuste linear $y = 0,589 * x$, ($R^2 = 0,997$). Para a quantificação dos extratos proteicos obtidos, inicialmente, 1 µL do tampão empregado para a solubilização dos extratos proteicos foi diluído em 499 µL de água destilada deionizada e 500 µL de reagente de

Bradford em uma cubeta para o preparo do branco. Para o preparo das amostras, adicionou-se 500 μL de reagente de Bradford, 499 μL de água destilada deionizada e 1 μL do extrato proteico em cada cubeta. Para cada amostra foram preparadas 3 réplicas técnicas para leitura de absorbância a 595 nm, conforme citado anteriormente. Do valor médio de absorbância de cada réplica da amostra foi subtraído o valor da absorbância do branco e o valor de absorbância final obtido foi plotado na equação, onde x representou a massa de proteínas na alíquota (1 μL). A massa de proteínas para a alíquota foi convertida para a concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e para quantidade de proteína total (μg) em meio de solubilização e, em seguida, calculou-se o rendimento, considerando o peso fresco das amostras igual a 0,1 g.

2.4 SDS-PAGE

A análise da qualidade dos extratos proteicos foi realizada mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O sistema eletroforético foi composto por um gel de empilhamento e um gel de separação, preparados a 4 % e a 12 % de acrilamida, respectivamente em uma placa de vidro. Após a polimerização do gel, a placa foi transferida para uma cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio Rad) contendo tampão de corrida 1 x (0,192 M de glicina, 0,025 mM de Tris base e 0,1 % SDS), e carregada com volumes de extratos proteicos equivalentes a 80 μg de proteína diluídos em buffer Laemmli (4% dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol 0,004 % azul de bromofenol e 0,125 de M Tris HCl), na proporção 1:1. Antes de serem aplicadas nos poços do gel, juntamente com o marcador de peso molecular (gTPbio, bíoBLU Prestained Protein Ladder), as amostras foram submetidas a 95° C por 5 min. Para a regulação do sistema, aplicou-se uma corrente constante de 20 mA, interrompendo-se a eletroforese quando o azul de bromofenol chegou ao final do gel. Foram realizadas três réplicas biológicas para cada amostra.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram visualizadas através da coloração do gel com azul de Coomassie Brilhante G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988). Primeiramente, o gel foi submetido a solução de fixação (10 % v/v de ácido acético e 40 % v/v de metanol) por 60 min, lavado duas vezes com água destilada deionizada por 10 min e, posteriormente, mantido por 16 h em solução de coloração composta por 0,1 % p/v de Coomassie Brillante Blue G-250, 10 % v/v de ácido fosfórico, 10 % p/v de sulfato de amônio, 20 % v/v de metanol, em agitação orbital. Depois de corado, o gel foi lavado com 0,1 M de Tris H_3PO_4 pH 6,3 por 3 min com metanol 25

% e com sulfato de amônio por 1 min cada e com água destilada deionizada até a eliminação do corante excedente.

As imagens dos géis foram obtidas por meio de um scanner GS-900 Calibrated Densitometer (Bio Rad) e analisadas através do programa Image Lab 5.2.1 (BioRad). Os valores de densidade ótica obtidos pelo programa foram normalizados em relação ao total detectado para cada uma das amostras e, em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e ao teste de comparações múltiplas de Tukey dos dados. As bandas obtidas foram representadas em um heatmap (*Heatmap*), obtido através do programa *Metaboanalyst* 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (XIA *et al.*, 2009) considerando-se a distância euclidiana como medida de similaridade e o algoritmo de agrupamento Ward's Linkage. Para estas análises, foram usados os valores médios de densidade ótica (OD) dos extratos proteicos das réplicas técnicas das amostras de tecido cambial empregadas para a avaliação da eficiência de cada protocolo de extração.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para encontrar um protocolo eficiente para a extração de proteínas do tecido cambial de eucalipto, três diferentes métodos de extração foram avaliados quanto ao rendimento e qualidade dos extratos: o método ácido de precipitação de proteínas com TCA/acetona (TCA/acetona) e os métodos fenólicos de precipitação de proteínas com TCA/acetona e extração subsequente com fenol (TCA/acetona/fenol) e de solubilização de proteínas com solução tampão, extração subsequente com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol). As três estratégias de extração de proteínas avaliadas apresentaram diferenças no rendimento total de proteína por grama de tecido e em relação à qualidade das amostras produzidas.

O rendimento de proteínas obtidas pelo método de extração com TCA/acetona foi menor (1245 µg de proteínas/g de tecido vegetal seco) em comparação com o rendimento de proteínas obtidas pelo método de extração com TCA/acetona/fenol (2329 µg de proteínas/g de tecido vegetal seco). Em contrapartida, o rendimento de proteínas extraídas pelo método de extração com tampão/fenol/acetato de amônio em metanol (5499 µg de proteínas/g de tecido vegetal seco) foi cerca de quatro vezes maior quando comparado com o rendimento de proteínas obtidas pelo método de extração com TCA/acetona e cerca de duas vezes maior quando comparado com o rendimento de proteínas extraídas com TCA/acetona/fenol (FIGURA 3).

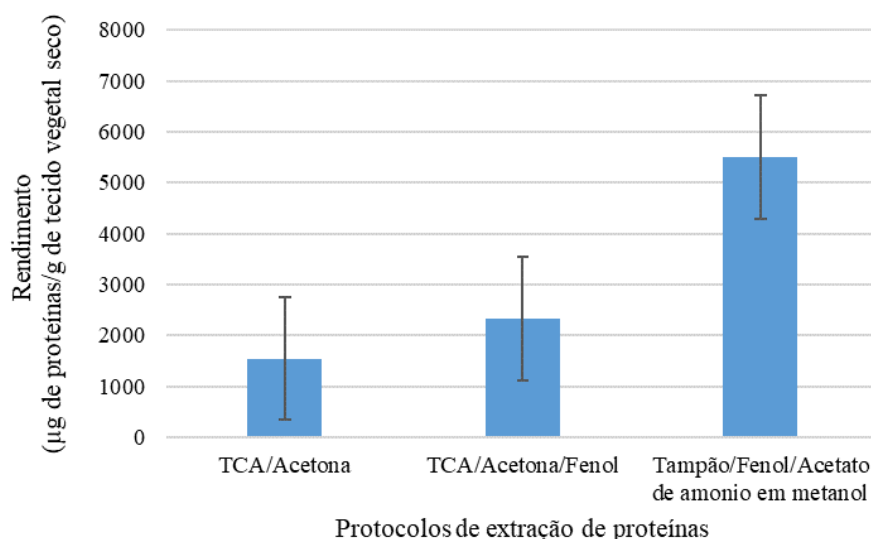


Figura 3 – Rendimento proteico obtido após o uso de diferentes estratégias de extração de proteínas do tecido cambial de eucalipto representando a média de três repetições biológicas. (1) Método de precipitação de proteínas com TCA/Acetona; (2) método de precipitação de proteínas com TCA/Acetona e extração com Fenol; (3) método de solubilização de proteínas com solução tampão e extração subsequente com fenol e precipitação em acetato de amônio em metanol.

Conforme relatado por Pereira (2007), a quantidade de proteínas detectadas para amostras de tecido cambial de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus* extraídas pelo método de extração que utiliza TCA/acetona/fenol foi aproximadamente três vezes maior do que o detectado na extração por TCA/acetona. Celedon (2006) obteve rendimento de proteínas do tecido cambial de *Eucalyptus grandis* extraídas pelo uso de solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol de três a quatro vezes maior (aproximadamente 1800 µg de proteína/g de tecido vegetal) em comparação ao rendimento de proteínas extraídas pelo uso de TCA/acetona (aproximadamente 500 µg de proteína/g de tecido vegetal). Igualmente, melhores resultados de rendimento de proteínas foram encontrados para este método fenólico em uma análise comparativa realizada por Meirelles (2006), onde, a partir de amostras de tecido cambial de *Eucalyptus grandis*, foram obtidos, em média, extratos com 5 µg/µl de proteína, aumentando a eficiência da extração cerca de três vezes em relação ao método ácido. A metodologia de extração de proteínas pelo uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol, proposta por Hurkman e Tanaka (1986), também foi utilizada por Camargo (2008), Budzinski (2012), Britto (2012), resultando na obtenção de extratos proteicos do tecido cambial de *Eucalyptus* spp. com maior rendimento e qualidade.

Embora tenham sido empregadas menores quantidades de material vegetal para as extrações, foram encontrados valores elevados para rendimento de proteínas. Isso se deve, possivelmente, ao fato de as amostras de tecido cambial terem sido liofilizadas para o transporte

e a conservação adequada do material vegetal em temperatura ambiente. Segundo Carpentier *et al.* (2007), durante o processo de liofilização, tanto proteínas quanto compostos interferentes, tais como metabolitos secundários (polifenóis, pigmentos, carboidratos, terpenos, etc.), comumente encontrados em plantas, tendem a concentrar-se em função da eliminação da água do material vegetal. Estes mesmos autores afirmam que protocolos de extração de proteínas que combinam o uso de fenol e acetato de amônio em metanol são eficientes o bastante para lidar com a alta concentração de compostos interferentes nas amostras liofilizadas, produzindo extratos proteicos de qualidade. As características qualitativas dos extratos obtidos pelos métodos de extração testados foram comparadas usando SDS-PAGE monodimensional, onde 30 µg de proteínas provenientes das extrações foram aplicados em um mini-gel de acrilamida a 12%, corado com Coomassie G-250 (FIGURA 4).

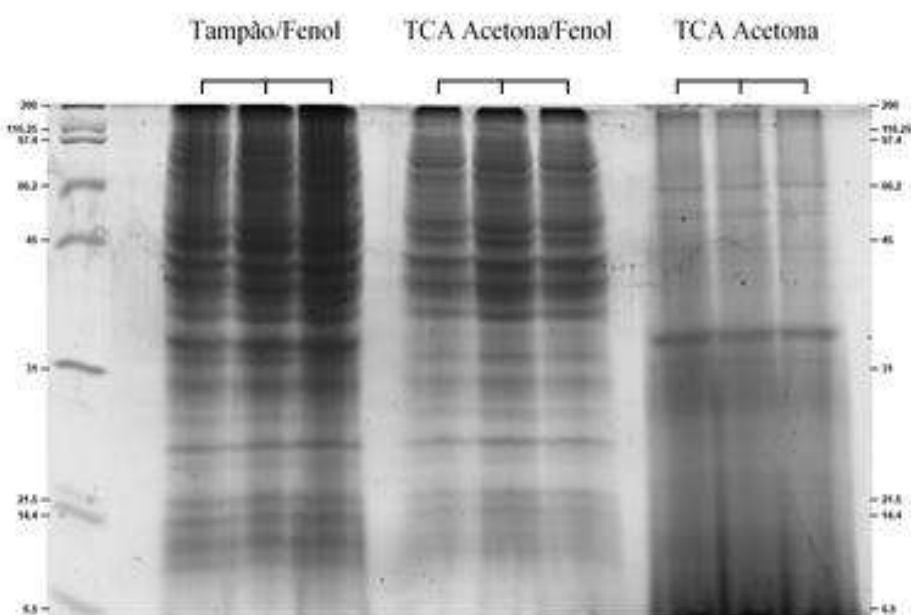


Figura 4 – 1-D (SDS-PAGE; mini-gel a 12% de acrilamida). Coloração com azul de Coomassie Brilhante G-250. Amostras de proteína da região cambial de eucalipto resultantes da extração de proteínas por solubilização com solução tampão, extração subsequente com Fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, precipitação com TCA/Acetona e extração subsequente com Fenol e por precipitação com TCA/Acetona.

A intensidade de cada banda foi dada pela sua densidade ótica (OD), obtida pela coloração empregada, neste caso, o corante azul de Coomassie Brilhante G-250. A análise em triplicata das bandas no mini-gel permitiu a obtenção de três valores de OD para cada banda proteica relativa a um método de extração. De modo geral, as três metodologias de extração avaliadas produziram extratos com padrões proteicos que diferiram na qualidade, resolução e número de bandas.

A ocorrência de coloração de fundo, arraste e/ou distorção das bandas foi observada a certo nível em todos os extratos, sendo particularmente evidente nos extratos obtidos através do método ácido. Observou-se que as amostras extraídas pelo método TCA/acetona apresentaram um menor número de bandas proteicas, baixa nitidez, alta difusão e manchas, indicativo da presença de contaminantes que, possivelmente, distorceram o carregamento da amostra no gel. Já os extratos obtidos pelos métodos fenólicos geraram, efetivamente, amostras de melhor qualidade, com bandas bem resolvidas em uma ampla faixa de pesos moleculares (M_r). No entanto, para estas mesmas amostras, também foi observada a ocorrência de coloração de fundo e/ou arraste de bandas, além da presença de materiais não migrantes nos poços do mini-gel.

A concentração elevada de proteínas aplicadas no mini-gel ou a presença de proteínas com alta abundância também podem explicar a ocorrência da coloração de fundo e/ou arraste observados, principalmente, nas bandas de proteínas mais intensas localizadas nas regiões de M_r elevada, obtidas pelos métodos fenólicos. Este problema pode ser prevenido pela aplicação de uma menor concentração de proteínas nos poços, o que causaria a diminuição da intensidade de outras bandas, prejudicando a análise diferencial do mini-gel, sendo necessário o uso de técnicas de coloração mais sensíveis para detectá-las.

A análise em SDS-PAGE evidenciou que as proteínas de maior peso molecular foram quantitativamente a maioria nos extratos proteicos avaliados. As extrações fenólicas apresentaram padrões de bandas similares entre si e favoreceram o aparecimento de bandas com M_r elevado. Algumas bandas foram observadas apenas e/ou em maiores intensidades nos extratos obtidos através do método de extração que combina o uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol. Bandas de baixo M_r também apresentaram melhores padrões para este método, sobretudo para o grupo de proteínas com peso molecular variando entre 45 e 6,5 kDa. O método de extração com TCA/acetona apresentou o menor número de bandas comuns entre os três métodos. Estes resultados estão de acordo com Saravanan e Rose (2004) que relataram a ocorrência de um menor número de proteínas com elevada M_r em extratos proteicos obtidos por protocolos baseados no uso de TCA, enquanto os protocolos baseados no uso de fenol produziram amostras com bandas bem resolvidas em uma ampla faixa de M_r .

A comparação entre a extração de proteína com TCA/acetona e a extração com TCA/acetona/fenol indicou que o uso combinado dos métodos de precipitação por TCA/acetona e extração por fenol apresentou amostras mais puras, com bandas mais definidas. Em um intervalo de 6,5-200 kD, as amostras extraídas com TCA/acetona exibiram cerca de 7 bandas, enquanto as amostras extraídas com TCA/acetona/fenol exibiram 27 bandas. Embora tenha sido

observada a ocorrência de maior grau de arraste de bandas para as amostras extraídas com solução tampão combinado com fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol em comparação com o método que combinou o uso de TCA/acetona e fenol, os extratos obtidos por meio deste protocolo apresentaram maior número de bandas (28 bandas em um intervalo de 6,5-200 kD), além de maiores intensidades na amostra, o que sugeriu uma menor perda de proteínas para este método. O maior número de bandas de proteínas detectado (28 bandas) foi usado como padrão para a análise comparativa com os demais métodos.

A análise de variância (ANOVA) (FIGURA 5) e o teste Tukey (TABELA 1) evidenciaram a existência de diferenças significativas, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os diferentes métodos de extração de proteínas avaliados em 28 bandas de proteínas com relação às suas intensidades.

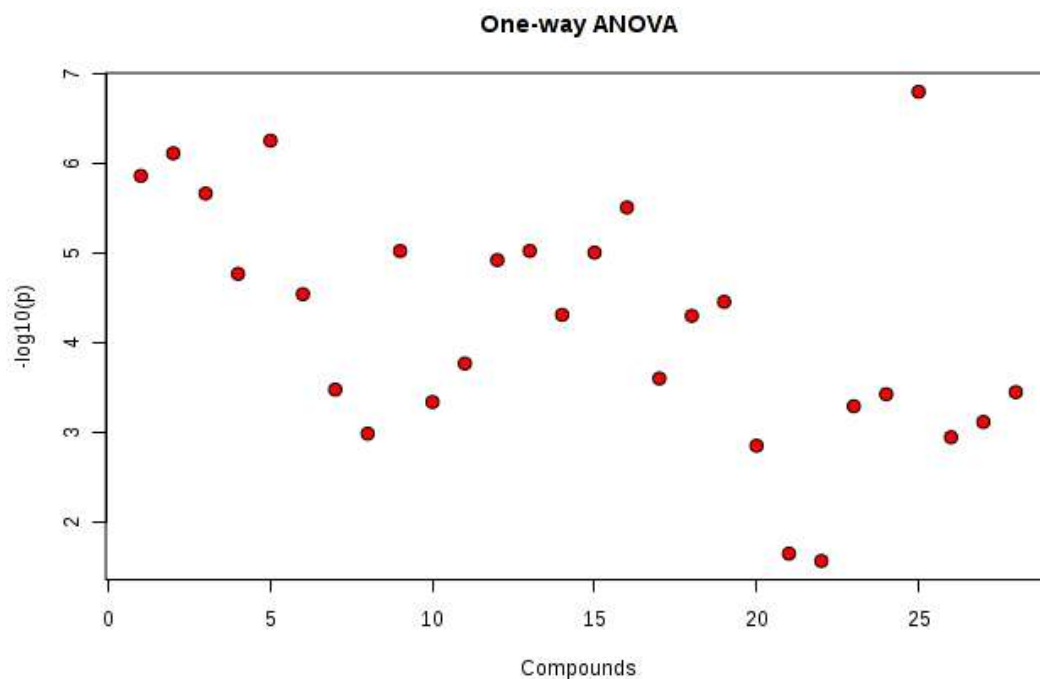


Figura 5 – Gráfico de análise de variância (ANOVA). Os pontos vermelhos representam bandas de proteínas do tecido cambial de eucalipto identificadas com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de extração.

Tabela 1 – Bandas de proteína do tecido cambial com diferenças significativas, identificadas pela ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$), entre os métodos de extração: solubilização com tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (M1), precipitação com TCA/acetona e extração com fenol (M2) e por precipitação com TCA/acetona (M3)

Bandas	f.valor	p.valor	-log10(x)	FDR	Tukey HSD
25	551,78	0,00	6,80	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
5	361,83	0,00	6,25	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
2	324,28	0,00	6,11	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
1	266,78	0,00	5,86	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
3	228,76	0,00	5,66	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
16	202,66	0,00	5,51	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
13	138,73	0,00	5,02	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
9	138,55	0,00	5,02	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
15	136,67	0,00	5,00	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
12	128,00	0,00	4,92	0,00	M3-M1; M2-M3
4	113,40	0,00	4,77	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
6	94,75	0,00	4,54	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
19	88,58	0,00	4,45	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
14	78,89	0,00	4,31	0,00	M3-M1; M2-M3
18	78,19	0,00	4,30	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
11	50,94	0,00	3,76	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
17	44,44	0,00	3,60	0,00	M3-M1; M2-M3
7	40,12	0,00	3,47	0,00	M3-M1; M2-M3
28	39,20	0,00	3,44	0,00	M2-M1; M2-M3
24	38,45	0,00	3,42	0,00	M3-M1; M2-M1
10	35,77	0,00	3,33	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
23	34,40	0,00	3,29	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
27	29,67	0,00	3,11	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
8	26,55	0,00	2,98	0,00	M3-M1; M2-M1; M2-M3
26	25,66	0,00	2,94	0,00	M3-M1; M2-M1
20	23,65	0,00	2,85	0,00	M3-M1; M2-M3
21	7,56	0,00	1,64	0,02	M3-M1
22	6,92	0,00	1,56	0,03	M3-M1

Adicionalmente, a análise de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico demonstraram uma clara separação entre os diferentes métodos de extração.

O resultado da PCA revelou que o primeiro componente (PC1) separou as bandas identificadas nos extratos obtidos a partir das extrações fenólicas daquelas obtidas pelo método de extração ácida e correspondeu a 84,1% da variabilidade experimental. Já o segundo componente principal (PC2) separou as bandas identificadas nos extratos obtidos a partir da extração com solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol daquelas obtidas pelos métodos de extração com TCA/acetona e TCA/acetona/fenol e correspondeu a 13% da variabilidade experimental. Ambos os componentes explicaram 97,1% da variabilidade total do experimento (FIGURA 6).

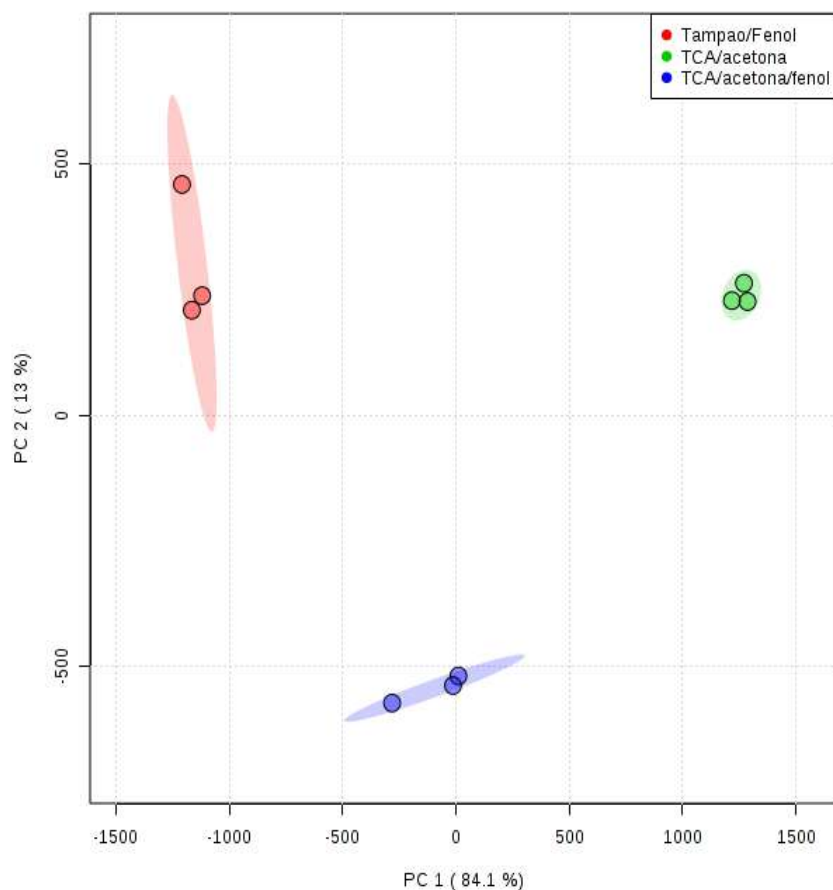


Figura 6 – Análise de componentes principais (PCA) da intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial de eucalipto resultantes da extração por solubilização com solução tampão, extração subsequente com Fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (vermelho) precipitação com TCA/Acetona e extração subsequente com Fenol (azul) e por precipitação com TCA/Acetona (verde).

O agrupamento hierárquico revelou a classificação das bandas de proteínas em dois grupos caracterizados, particularmente, pela natureza das extrações pelas quais foram obtidas. As bandas proteicas reveladas nos extratos obtidos pelos métodos de extração fenólicos solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol e TCA/acetona/fenol foram agrupadas separadamente daquelas obtidas pelo método de extração ácido TCA/acetona. O agrupamento das réplicas biológicas para cada um dos métodos de extração avaliados indicou a reprodutibilidade do ensaio (FIGURA 7).

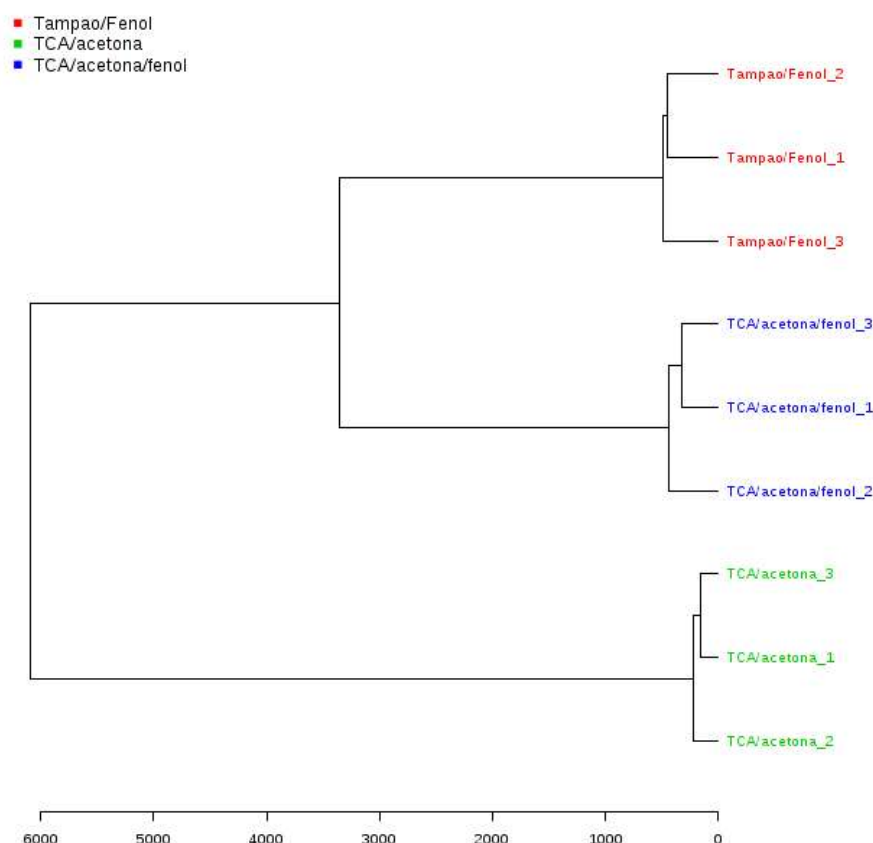


Figura 7 – Análise de agrupamento hierárquico da intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial de eucalipto resultantes da extração por solubilização com solução tampão, extração subsequente com Fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (vermelho) precipitação com TCA/Acetona e extração subsequente com Fenol (azul) e por precipitação com TCA/Acetona (verde).

Para melhor observar o padrão de distribuição das bandas obtidas para cada método de extração de proteínas avaliado o agrupamento hierárquico foi representado por um *heatmap* (FIGURA 8). As cores do *heatmap* corresponderam às médias de intensidade das bandas de proteínas em uma escala de cores. Maiores intensidades de banda foram representadas pelo gradiente de cor em tons vermelhos, enquanto as menores intensidades foram representadas pelo gradiente de cor em tons verdes. Tons mais escuros indicam pouca variação da intensidade de bandas de proteínas.

A análise do *heatmap* evidenciou a grande variação da intensidade de bandas de proteínas entre os diferentes métodos de extração avaliados. As extrações fenólicas apresentaram melhores padrões de banda de proteína quando comparadas com a extração ácida, conforme previamente observado no mini-gel. Entre o grupo que englobou os métodos de extração fenólicos foram confirmados os maiores valores de intensidades das bandas de

proteínas das amostras obtidas através do método de extração que combinou o uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol. O agrupamento hierárquico também revelou a classificação das bandas de proteínas em dois grupos maiores. O primeiro grupo englobou as bandas 18, 26, 27, 28, localizadas na área inferior do mini-gel, onde se separam as proteínas de baixo peso molecular. Conforme observado, a intensidade das bandas de proteínas localizadas nesta região foi expressivamente maior para o método de extração com solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol, evidenciando a perda destas proteínas nas amostras extraídas pelo método TCA/acetona e fenol.

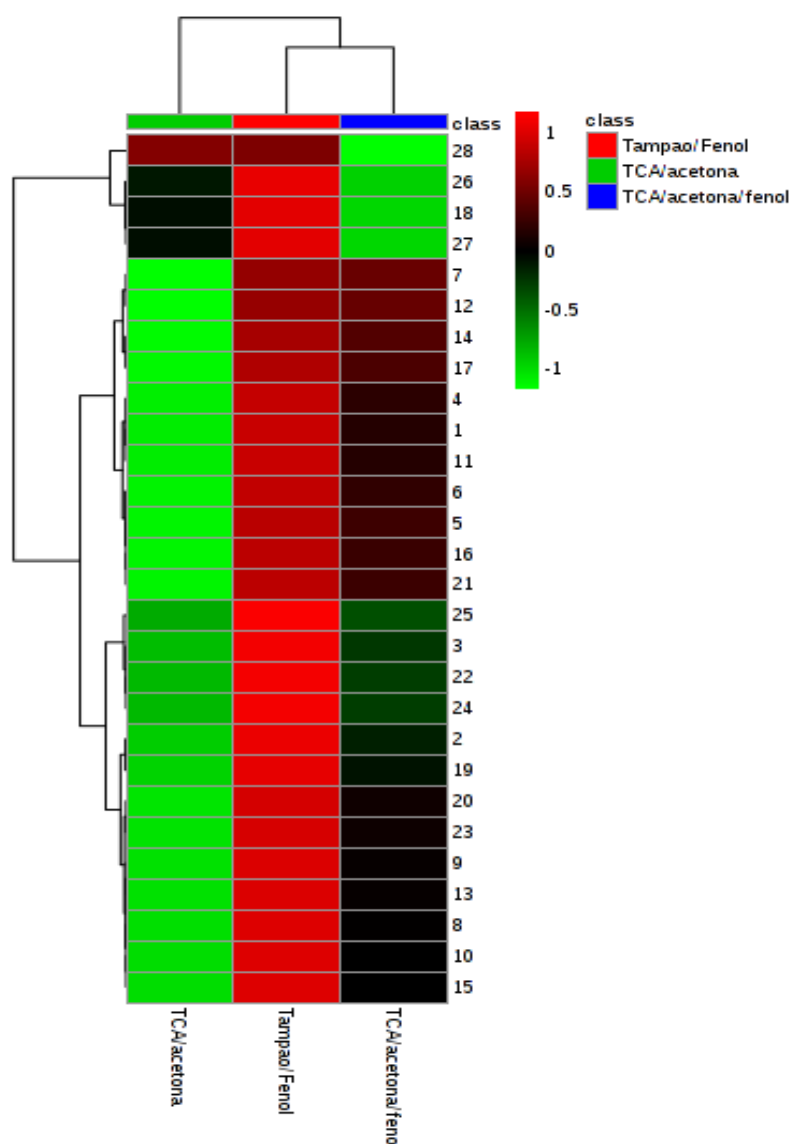


Figura 8 – Heatmap representando a intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial de eucalipto obtidas a partir de três métodos de extração: solubilização com solução tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol; precipitação com TCA/acetona e extração com fenol e por precipitação com TCA/acetona. A barra à direita indica aumento (vermelho), redução (verde) e níveis sem mudanças significativas (preto) na abundância de proteínas. As proteínas foram agrupadas considerando-se a distância euclidiana como medida de similaridade e o algoritmo de agrupamento ward. D.

Ressalta-se que, nesta região foi observado alto grau de distorção de bandas de proteínas das amostras extraídas pelo método TCA/acetona, sendo que, a presença de manchas no mini-gel pode ter contribuído para a obtenção de elevados valores de OD, em que pese a não observação de bandas bem resolvidas nesta área. A presença da banda 18 no primeiro grupo comprovou, de modo particular, a perda desta proteína durante o processo de extração com TCA/acetona e fenol, dado os baixos valores de intensidade de banda encontrado. Entre as bandas de proteína nitidamente visíveis nas amostras extraídas pelo método TCA/acetona, a banda 18 apresentou os melhores resultados de intensidade para este protocolo.

O segundo grupo englobou as demais bandas e evidenciou maiores intensidades para aquelas extraídas pelos métodos fenólicos em relação ao método ácido. Por sua vez, foi subdividido em outros dois subgrupos. No primeiro subgrupo observou-se menor variação de intensidade entre as bandas proteicas das amostras obtidas pelos métodos fenólicos. O *heatmap* registrou um aumento da intensidade das bandas de proteínas extraídas com TCA/acetona e fenol e uma ligeira diminuição da intensidade das bandas de proteínas extraídas com solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol. Já no segundo subgrupo foi encontrado o maior número de bandas com considerável variabilidade para os valores de intensidade registrados entre os métodos de extração.

De modo geral, as bandas de proteínas extraídas com solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol apresentaram elevados valores de intensidade, confirmando a eficiência deste protocolo para a extração das proteínas do tecido cambial de eucalipto. A diminuição dos valores de intensidade de banda encontrados para as proteínas extraídas com TCA/acetona e fenol deste subgrupo confirmou a perda de proteínas para este protocolo, principalmente daquelas de baixo peso molecular.

O padrão diferencial das bandas observadas pode ser explicado pela capacidade que os protocolos de extração têm de alterar o ambiente físico-químico de proteínas específicas de modo distinto, alterando a estabilidade e a solubilidade proteica (MALDONADO *et al.*, 2008). Deste modo, o método de extração baseado no uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol pode ter proporcionado uma melhor solubilização e a extração seletiva de proteínas em uma maior faixa de M_r (peso molecular) em comparação aos demais métodos, revelando bandas proteicas mais intensas em comparação com os demais métodos de extração.

Via de regra, a análise proteômica de tecidos vegetais é mais complicada quando comparada com outros tipos de tecido. As células vegetais são mais recalcitrantes pelo fato de apresentarem menor concentração relativa de proteínas, presença de parede celular e vacúolos e riqueza de componentes que interferem negativamente na estabilidade, separação e análise

das proteínas, tais como proteases e enzimas oxidativas, polissacarídeos de parede e reserva, pigmentos e lipídeos, ácidos nucleicos, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários (ISAACSON, 2006; WU *et al.*, 2014; CARPENTIER *et al.*, 2005).

A presença de compostos fenólicos nos tecidos vegetais é um dos maiores problemas encontrados para a caracterização de proteínas e enzimas de plantas. Liberados durante o rompimento celular, os fenóis descompartimentalizados são oxidados a quinonas pela ação de enzimas da planta (polifenoloxidase e peroxidase) e reagem inativando enzimas e alterando a mobilidade das moléculas de proteínas (ALFENAS *et al.*, 1998). As moléculas de quinonas, altamente reativas, polimerizam-se umas com as outras, oxidam outros compostos fenólicos e combinam-se com grupos reativos em proteínas, causando agregação e precipitação (PIERPOINT, 1996). Além dos compostos fenólicos, proteases, terpenos, pigmentos e lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos também podem interagir com as proteínas e causar interferências nas suas determinações, portanto, devem ser removidos da amostra para que o procedimento de separação e identificação das proteínas apresente resultados efetivos.

A liberação de proteases pelo rompimento das células ou do tecido leva a ocorrência de proteólise em larga escala, gerando erros de identificação de proteínas em análises por espectrometria de massa e a diminuição do rendimento proteico (RABILLOUD, 1996). Contaminantes não proteicos como terpenos, pigmentos e lipídeos também interagem com proteínas e podem causar heterogeneidade de cargas, bem como problemas durante a separação eletroforética de proteínas do extrato de tecidos vegetais (GRANIER, 1988; CARPENTIER *et al.*, 2005).

Os carboidratos podem bloquear os poros do gel, causando a precipitação de proteínas e o aumento do tempo de focalização, importante etapa da eletroforese bidimensional. Já alguns polissacarídeos de carga negativa podem formar complexos com proteínas por meio de interações eletrostáticas (CARPENTIER *et al.*, 2008), dificultando sua solubilização. Tanto a presença de polissacarídeos quanto de ácidos nucleicos nos extratos pode aumentar a viscosidade das soluções resultando em manchas de fundo nos géis (SZEWCZYK; KOWALSKI, 2016).

Estes compostos são encontrados ainda em maior quantidade em plantas lenhosas, principalmente em tecidos lignificados como a madeira (VÂLCU; SHILINK, 2006), que é um produto do câmbio vascular (LARSON, 1994). Neste sentido, o preparo da amostra configura-se uma etapa crítica para uma abordagem proteômica focada em tecidos formadores de madeira, sobretudo, devido às concentrações de celulose e lignina que podem ser encontradas nestes materiais (SHI *et al.*, 2011).

O tecido vegetal utilizado neste trabalho é definido como região cambial ou xilema em desenvolvimento e compreende o câmbio *sensu stricto*, composto por uma camada de células juvenis, denominadas células iniciais fusiformes, e as células mãe do floema e xilema secundários, derivadas das células iniciais cambiais (PLOMION *et al.*, 2001; MARCATI *et al.*, 2008). A diferenciação das células do câmbio em células mãe do xilema secundário é parte do processo de desenvolvimento sequencial da madeira, que também envolve a expansão celular, deposição de paredes secundárias, morte celular programada e, por fim, a formação do cerne (YE *et al.*, 2015).

O câmbio é composto predominantemente por substâncias pécicas, celuloses, hemiceluloses e carboidratos de baixo peso molecular (VIAKARI *et al.*, 1990; FOELKEL, 2013). Além disso, é rico em proteínas e ácidos nucléicos (ANDRADE *et al.*, 2006). Já seu principal produto, o tecido xilemático (madeira), é composto por celulose, hemiceluloses e lignina (PANDEY *et al.*, 2000; SUN; CHENG, 2002), além de pectinas, proteínas, carboidratos solúveis, terpenos, alcaloides, polifenóis, gomas, gorduras e outros componentes (KHUAD; SINGH, 1993). De modo geral, madeiras de espécies folhosas são compostas por 44% de celulose, 28% de hemiceluloses, 24% de lignina e 4% de extrativos (WALKER, 2006). Neste sentido, as células cambiais e suas derivadas podem conter tais compostos, muitos deles interferentes e prejudiciais às análises proteômicas. A escolha de um método de extração eficiente pode minimizar os efeitos negativos causados pela presença destes compostos neste tipo de tecido (SARAVANAN; ROSE, 2004; THIELLEMENT *et al.*, 2007).

Entre os diferentes métodos de extração empregados na análise proteômica de tecidos vegetais, a extração ácida com TCA/acetona, inicialmente desenvolvida por Damerval *et al.* (1986), baseia-se na desnaturação e precipitação de proteínas em condições ácidas e hidrofóbicas. Segundo Mechín *et al.* (2007) durante a precipitação em TCA/acetona, as proteínas e demais substâncias insolúveis permanecem no precipitado, enquanto substâncias solúveis são lavadas. As proteínas presentes no precipitado são, então, extraídas pelo uso de um tampão. Por ser uma metodologia rápida e de fácil realização, este protocolo é recomendado como ponto de partida para a extração de proteínas vegetais (WANG *et al.*, 2008), sendo um dos métodos mais utilizados em análises proteômicas de tecidos de plantas (JORRÍN-NOVO *et al.*; 2007; JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009).

Além de promover a inativação de proteases, prevenindo a degradação de proteínas (VÂLCU; SCHLINK, 2006), esta abordagem também colabora para a remoção de sais, polifenóis (GÖRG *et al.*, 2004) e demais compostos interferentes, como lipídeos e pigmentos (WANG *et al.*, 2008). No entanto, alguns interferentes poliméricos não são completamente

extraídos, o que representa um problema para os tecidos ricos em compostos como polissacarídeos de parede celular e polifenóis solúveis (SARAVANAN; ROSE, 2004). Deste modo, são necessárias etapas de lavagem até que a amostra se torne incolor, um processo demorado, que prolonga a exposição a um baixo pH, levando a degradação e/ou modificação da proteína, não sendo necessariamente a melhor escolha para tecidos vegetais mais complexos (WANG *et al.*, 2003; SARAVANAN; ROSE, 2004). Ademais, estudos anteriores demonstraram que o método de extração de proteínas com TCA/acetona produz um precipitado sólido de difícil dispersão, o que restringe a remoção de contaminantes e a ressolubilização da proteína precipitada (HAO *et al.*, 2015).

De fato, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com a observação de que a extração ácida com TCA/acetona, em comparação com os métodos de extração fenólicos, fornece um pellet de difícil dissolução em meio de solubilização (MALDONADO *et al.*, 2008), causando a permanência de materiais insolúveis nas amostras, o que pode ter contribuído para o menor número de bandas e para a baixa qualidade e resolução das bandas proteicas relativas a este método. Embora o Coomassie G-250 seja eficiente para a ligação com proteínas (CANDIANO *et al.*, 2004) a presença destes contaminantes pode ter superestimado a quantificação pelo método de Bradford das amostras provenientes da extração por TCA/acetona, haja vista a baixa quantidade de bandas proteicas detectadas. Todavia, o menor valor registrado para o rendimento de proteínas extraídas pelo método TCA/acetona, quando comparado com os métodos fenólicos, pode ser atribuído à insolubilidade do *pellet* resultante, o que causa perdas amostrais (CHEN; HARMON, 2006).

O protocolo baseado no uso de TCA/acetona combinado com fenol (WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006) foi desenvolvido inicialmente para a extração de proteínas de folhas perenes adultas de oliveira (*Olea europea* L.) e vem demonstrando alta aplicabilidade na produção de proteínas de qualidade a partir de diferentes materiais. O TCA/acetona promove a precipitação de proteínas e a remoção de contaminantes em uma breve etapa de limpeza, seguida de passos de lavagem com acetona para remoção de TCA residual. A extração com SDS faz com que as proteínas se solubilizem após a precipitação com TCA/acetona e os extratos proteicos obtidos possam ser purificados pela extração com fenol (WU *et al.*, 2014). Além de favorecer a solubilização, a combinação SDS/fenol promove a concentração das proteínas do precipitado, incluindo proteínas de membrana, permitindo que substâncias hidrofílicas como carboidratos e ácidos nucleicos permaneçam na fase aquosa a ser descartada (WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006). As proteínas da fase fenólica são, então, seletivamente precipitadas com acetato de amônio em metanol e posteriormente solubilizadas. A extração com fenol

minimiza a degradação de proteínas durante o preparo da amostra e promove uma alta capacidade de limpeza (CARPENTIER, 2005). Este método pode gerar extratos proteicos com menor contaminação mesmo em tecidos mais resistentes, resultando em um aumento na qualidade da proteína extraída em comparação com o protocolo que utiliza somente TCA/acetona (MALDONADO *et al.*, 2008).

O protocolo de extração baseado no uso de TCA/acetona/fenol foi capaz de isolar proteínas do tecido cambial de eucalipto de modo eficiente, revelando padrões de proteína em gel 1-DE de boa resolução e qualidade. Os valores mais baixos de rendimento encontrados para as proteínas extraídas em comparação com o método baseado no uso de solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol podem ser decorrentes de perdas durante lavagens sequenciais que, segundo Maldonado *et al.* (2008), melhoram a pureza da amostra. Além de mais complicado e demorado que o método TCA/acetona, este protocolo contém muitas etapas, o que pode prejudicar o rendimento de proteínas (WU *et al.*, 2014). Embora tenha sido observada a exclusão de proteínas, a ação do detergente iônico SDS possibilitou a solubilização das proteínas remanescentes e favoreceu a posterior extração fenólica, gerando padrões de distribuição de bandas proteicas semelhantes a aqueles obtidos pelo método de extração com solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol.

O método de extração baseado na solubilização de proteínas com solução tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, inicialmente proposto por Hurkman e Tanaka (1986), é outra alternativa eficaz para tecidos que contém altos níveis de compostos interferentes. O tampão utilizado contém sacarose em sua composição, que torna a fase aquosa mais densa que a fase fenólica, facilitando a separação de fases por centrifugação (WANG *et al.*, 2008), além de componentes que minimizam a presença de compostos fenólicos, como o polivinil polipirrolidona (PVPP) (WANG *et al.*, 2006), e que atuam como inibidores de proteases e agentes redutores prevenindo a oxidação da proteína, como o ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), o phenilmethylsulfonyl fluoride (PMSF) e o 2-mercaptoetanol (2ME) (CARPENTIER *et al.*, 2005). Ademais, a presença de KCl no tampão altera a valência das ligações das proteínas, tornando-as livres (FRY *et al.*, 1991) e facilita a extração de proteínas por seu efeito salino em si (CARPENTIER *et al.*, 2005). O uso do fenol tamponado pH 8,0 faz com que após a etapa de separação os ácidos nucleicos, fenólicos, carboidratos e detritos celulares contidos na amostra fiquem retidos na fase aquosa e as proteínas permaneçam junto a fase fenólica, sendo purificadas e concentradas e pela precipitação subsequente com acetato de amônia em metanol (PUSZTAI, 1966; ISAACSON *et al.*, 2006). Além de minimizar a degradação proteica resultante da atividade proteolítica endógena (SCHUSTER; DAVIES,

1983), o fenol age como dissociador, diminuindo a interação molecular entre proteínas e outros materiais (CARPENTIER *et al.*, 2005).

De modo geral, métodos baseados no uso de fenol são mais eficazes do que aqueles baseados na precipitação com TCA/acetona. Entretanto, sua toxicidade e natureza demorada devem ser consideradas durante a elaboração de um fluxo de trabalho proteômico (WANG *et al.*, 2008). Embora o método baseado no uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol seja descrito como o mais demorado, os benefícios de visualizar um número maior de proteínas superam o investimento de tempo adicional no preparo da amostra (SARAVANAN; ROSE, 2004).

Neste estudo, altos conteúdos de compostos interferentes, presentes no tecido cambial de eucalipto, aumentaram a viscosidade dos extratos proteicos, dificultando a manipulação da amostra. Neste caso, a diluição dos extratos proteicos em uma fase aquosa antes da adição de fenol tamponado é fundamental e facilita a separação de fases anterior à extração das proteínas (AMOAKO-ANDOH *et al.*, 2014). Esta pode ter sido a razão pela qual foram obtidos extratos mais limpos, maior rendimento, bem como uma melhora da qualidade das proteínas do tecido cambial de eucalipto extraídas pelo método baseado no uso de solução tampão, fenol e acetato de amônio em metanol em comparação com demais protocolos avaliados. Esta metodologia também foi empregada com sucesso no estudo do proteoma do caule de plantas e tecidos da região cambial de *Eucalyptus* spp. (ANDRADE, 2006; CELÉDON, 2006; MEIRELES, 2006; PEREIRA, 2007; BRITTO, 2012; BUDZINSKI, 2012; COSTA, 2017).

4 CONCLUSÃO

- Os métodos de extração baseados no uso de TCA/acetona/fenol e de Tampão /fenol/acetato de amônio em metanol promovem bons rendimentos em quantidade de proteína extraída para o tecido cambial de eucalipto.
- Os extratos proteicos obtidos com os métodos TCA/acetona/fenol e Tampão /fenol/acetato de amônio em metanol apresentam boa resolução, baixa ocorrência de manchas e bandas bem definidas no gel e são satisfatórios para os estudos proteômicos.
- O extrato obtido com o método baseado no uso de Tampão/fenol/acetato de amônio em metanol apresentou melhores resultados em termos de rendimento, qualidade do gel, número e distribuição de bandas proteicas em uma maior faixa de Mr.

- Com base nos critérios estabelecidos para determinar o método mais adequado para a extração de proteínas totais do tecido cambial de espécies de eucalipto, constatou-se que o protocolo que tem como base o uso de Tampão/fenol/acetato de amônio em metanol apresentou melhores resultados, mostrando-se especialmente eficiente na remoção de contaminantes e interferentes da amostra.

5 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos, Viçosa: UFV, 1998. 574p.

AMOAKO-ANDOH, F. O.; DANIELS, B.; KEULEMANS, W.; DAVEY, M. W. A systematic evaluation of protocols for a proteomics analysis of (lyophilized) fruit tissues. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1395–1405, 2014.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 120p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2006.

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

BRITTO, D. S.; PIROVANI, C. P.; GONZALEZ, E. R.; SILVA, J. F.; GESTEIRA, A. S.; CASCARDO, J. C. M. Oxidative stress proteins as an indicator of a low quality of eucalyptus clones for the pulp and paper industry. **Genetics Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 3798-3813, 2012.

BUDZINSKI, I. G. F. **Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis***. 185 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2012.

CAMARGO, Eduardo Leal Oliveira. **Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucalyptus grandis***. 94 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2008.

CARPENTIER, S. C.; PANIS, B.; VERTOMMEN, A.; SWENNEN, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; DEVREESE, B. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 4, p. 354-377, 2008.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; & PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; & PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of

different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.

CELEDON, P. A. F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas**. 112 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2006.

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

COSTA, Marília Gabriela de Santana. **Alterações no proteoma caulinar de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* em resposta a variações de temperatura**. 89p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, 2017.

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

DUNN, J. Detection of total proteins on western blots of 2-D polyacrylamide gels. In: 2-D Proteome Analysis Protocols. **Humana Press**, p. 319-329, 1999.

FOELKEL, C. 2013. Aplicações da Biotecnologia em Processos Industriais de Fabricação de Papel de Eucalipto. *Eucalyptus* online book. Disponível em: http://eucalyptus.com.br/eucaliptos/PT33_Biotecnologia_Papel.pdf. Acesso em: 01/01/2019.

FRY, S. C. Cell Wall-Bound Proteins. In: Dey, P.; HARBORNE, J. ROGERS, L. **Methods in Plant Biochemistry**, Wales: Academic Press, 1991. CA. 11, p. 307-331.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J.; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

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

HAO, R.; ADOLIGBE, C.; JIANG, B.; ZHAO, X.; GUI, L.; QU, K.; ... & ZAN, L. An Optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of Qinchuan cattle Longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0124723, 2015.

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

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C. M.; SARAVANAN, R. S.; HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; & ROSE, J. K. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 769, 2006.

JORRÍN-NOVO, J. V.; KOMATSU, S.; SANCHEZ-LUCAS, R.; & DE FRANCISCO, L. E. R. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! **Journal of proteomics**, 2018.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; CASTILLEJO, M. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2947-2962, 2007.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRIA-ZOMENO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 2009.

KHUAD, R. C; SINGH, A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 151-172, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LARSON, P. R. **The vascular cambium: development and structure**. Springer Science & Business Media, 2012.

LEV-YADUN, S.; SEDEROFF, R.; Pines as model gymnosperms to study evolution, wood formation, and perennial growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, n. 3, p. 290-305, 2000.

MALDONADO, A. M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; JEAN-BAPTISTE, S.; HERNÁNDEZ, M.; & JORRÍN-NOVO, J. V. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 4, p. 461-472, 2008.

MARCATI, C. R. MILANEZ, C. R. D.; MACHADO, S. R. Seasonal development of secondary xylem and phloem in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Trees**, v. 22, n. 1, p. 3-12, 2008.

MÉCHIN, V.; BAUMBERGER, S.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. Peroxidase activity can dictate the in vitro lignin dehydrogenative polymer structure. **Phytochemistry**, v. 68, n. 4, p. 571-579, 2007.

MEIRELES, K. G. X. **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2006.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; & EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Economic utilization of crop residues for value addition: A futuristic approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 59, p. 12-22, 2000.

PARK, K.O. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.133-138, 2004.

PEREIRA, J. L. **Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus***. 180p. Tese (Doutorado). Universidade Católica de Brasília. 2007.

PIERPOINT, W. S. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. In: **Protein Purification Protocols**. Humana Press, 2004. p. 65-74.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant physiology**, v. 127, n. 4, p. 1513-1523, 2001.

PUSZTAI, A. Interactions of proteins with other polyelectrolytes in a two-phase system containing phenol and aqueous buffers at various pH values. **Biochemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 93, 1966.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 813-829, 1996.

ROSE, J. K.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J. J.; JAHN, M. M.; SARAVANAN, R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The plant journal**, v. 39, n. 5, p. 715-733, 2004.

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

SCHUSTER, A. M.; DAVIES, E. Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls: I. The aging process. **Plant Physiology**, v. 73, n. 3, p. 809-816, 1983.

SHI, J. T.; LI, J. A method suitable for total protein extraction from wood forming tissue of *Pinus koraiensis*. In: **Advanced Materials Research**, Trans Tech Publications, 2011. p. 1199-1202.

SHIOSE, L., BALDANI, J., JESUS, E. D. C., & VIDAL, M. Seleção de método de extração de proteínas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Embrapa Agrobiologia- Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 2019.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SZEWCZYK, R.; KOWALSKI, K. Metabolomics and crucial enzymes in microbial degradation of contaminants, from: microbial biodegradation: from omics to function and application (Edited by: Długoński J.). **Caister Academic Press**, U.K., p. 43-66, 2016.

THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. (Eds.) **Plant Proteomics: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, p. 399. v. 68, p. 571-579, 2007.

VÂLCU, C. M.; SCHLINK, K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v.6, n.14, p.4166-75, 2006.

VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; POUTANEN, K.; RANUA, M. Characterization of pulps treated with hemicellulolytic enzymes prior to bleaching. In: KIRK T. K. AND CHANG H.-

M. (eds), **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. Applications and Fundamental Investigations**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. p. 145-151.

WALKER, J. C. F. Basic wood chemistry and cell wall ultrastructure. In: **Primary Wood Processing**. Springer, Dordrecht, 2006. p. 23-67.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; & CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-2375, 2003.

WANG, W.; TAI, F.; & CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of separation science**, v. 31, n. 11, p. 2032-2039, 2008.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; & CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.

WU, X.; GONG, F.; & WANG, W. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. **Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 645-658, 2014.

XIA, J.; PSYCHOGIOS, N.; YOUNG, N.; & WISHART, D. S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. 652-660, 2009.

XIE, J.; LIU, S.; QI, Q.; HOU, J.; GAI, Y.; & JIANG, X. Identification of proteins from cambium tissues of the chinese white poplar (*Populus tomentosa*) sampled during the growing season. **Pak. J. Bot**, v. 46, n. 4, p. 1269-1275, 2014.

YE, Z. H.; & ZHONG, R. Molecular control of wood formation in trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4119-4131, 2015.

CAPITULO 3 – PROTEOMA COMPARATIVO DA REGIÃO CAMBIAL DE CLONES DE *Eucalyptus* spp. E *Corymbia* spp. CULTIVADOS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS

RESUMO

Diferenças fenotípicas observadas entre árvores cultivadas em diferentes espaçamentos de plantio, no que se refere a propriedades da madeira, podem ser atribuídas a uma diferença no padrão de abundância de proteínas no xilema secundário. Para entender em nível molecular como o espaçamento afeta o crescimento e a formação da madeira de um híbrido tri-cross de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) e de um híbrido de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) K. D. Hill & L. A. Johnson, uma abordagem proteômica foi empregada neste trabalho. Para isso, amostras do tecido cambial foram coletadas de clones, com 24 meses de idade, cultivados em quatro diferentes espaçamentos (3 x 3 m, 3 x 1 m, 6 x 1,5 m e 6 x 0,5 m). As proteínas totais do tecido cambial foram extraídas a partir de uma metodologia baseada no uso de solução tampão/fenol/acetato de amônio em metanol e separadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Afim de promover um ensaio sensível e acurado, a proteômica do tipo “shotgun” (nLC-MS/MS-Orbitrap) foi a estratégia adotada. Para a identificação de proteínas, foram utilizados bancos de dados públicos de *Eucalyptus grandis*. As proteínas identificadas nos bancos de dados, quando não caracterizadas, foram funcionalmente anotadas com base na similaridade com sequências anotadas no UniRef90, usando o Sma3s. Por fim, as proteínas com diferença significativa ($p < 0,05$) diferencialmente reguladas (*fold-change* entre 2 e 0,5) foram funcionalmente categorizadas usando a ferramenta MERCATOR-MapMan. Além disso, esse grupo de proteínas foi mapeado nos processos biológicos da base de dados Kegg. A análise eletroforética unidimensional revelou alterações no perfil proteico do câmbio vascular dos clones de *Eucalyptus* e *Corymbia* submetidos a diferentes espaçamentos de plantio. A estratégia de proteômica “shotgun” identificou 2547 espécies proteicas, das quais 1484 apresentaram diferenças significativas e mudanças qualitativas ou quantitativas em resposta a clones e espaçamentos de plantio. A análise estatística das proteínas identificadas e dos processos biológicos relacionados revelaram um comportamento diferente nos clones em relação à abundância de suas proteínas indicando um possível ajuste metabólico em função das condições ambientais proporcionadas pelos espaçamentos de plantio avaliados que refletiu nas características da madeira das referidas espécies.

Palavras-chave: Espécies florestais. Biomassa lignocelulósica. Densidade de plantio. Proteômica. *Shotgun*.

CHAPTER 3 – COMPARATIVE PROTEOME OF THE CAMBIAL REGION OF *Eucalyptus* spp. AND *Corymbia* spp. CLONES GROWN AT DIFFERENT SPACINGS

ABSTRACT

The observed phenotypic differences between trees grown at different planting spacings, in wood properties, can be attributed to a difference in the pattern of protein abundance in the secondary xylem. To understand at the molecular level how the spacing affects the growth and the formation of the wood of a tri-cross hybrid of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) and a hybrid of *Corymbia citriodora* (Hook) KD Hill & LA Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) KD Hill & LA Johnson, a proteomic approach was employed in this study. For this purpose, samples of the cambial tissue were collected from 24-month-old clones cultured in four different spacings (3 x 3 m, 3 x 1 m, 6 x 1,5 m and 6 x 0,5 m). Total cambial tissue proteins were extracted using a methodology based on the use of buffer/phenol/ammonium acetate in methanol and separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In order to promote a sensitive and accurate assay, shotgun-type proteomics (nLC-MS / MS-Orbitrap) was the strategy adopted. For the identification of proteins, public databases of *Eucalyptus grandis* were used. The proteins identified in the databases, when not characterized, were functionally annotated based on the similarity with sequences annotated in UniRef90, using the Sma3s. Proteins with significantly ($p < 0.05$) differentially regulated (fold-change between 2 and 0,5) were functionally categorized using the MERCATOR-MapMan tool. In addition, this group of proteins was mapped in the biological processes of the Kegg database. The unidimensional electrophoretic analysis revealed changes in the protein profile of the cambial tissue of the *Eucalyptus* and *Corymbia* clones submitted to different planting spacings. The shotgun proteomics strategy identified 2547 protein species, of which 1484 showed significant differences and qualitative or quantitative changes in response to clones and planting spacings. Statistical analysis of identified proteins and related biological processes revealed a different behavior in the clones in relation to the abundance of their proteins indicating a possible metabolic adjustment as a function of the environmental conditions provided by the evaluated planting spacings that reflected the characteristics of the wood of said species.

Keywords: Forest species. Lignocellulosic biomass. Planting density. Proteomics. Shotgun

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por madeira levou à necessidade de se obter plantios mais homogêneos, livres de doenças e pragas e com ciclos de corte mais curtos, permitindo o aumento da produtividade dos povoamentos com o desenvolvimento da clonagem e dos programas de melhoramento florestal baseados na hibridação. Em contrapartida, o progresso das técnicas de manejo, criando ambientes adequados à expressão máxima do potencial genético dos clones, tornou-se um outro importante fator no aumento da produtividade florestal (ASSIS, 2016). Neste sentido, o melhoramento genético e o manejo florestal constituem-se importantes ferramentas capazes de garantir a continuidade do crescimento da produtividade.

Devido ao seu impacto direto sobre o desenvolvimento das árvores e, conseqüentemente, nas propriedades químicas, físicas e mecânicas da madeira, o espaçamento de plantio é um dos principais aspectos envolvidos no manejo florestal, sobretudo em florestas de ciclo curto. Neste sentido, para a formação de florestas com alta produtividade de biomassa a escolha adequada do espaçamento pode ser um diferencial ao possibilitar incrementos volumétricos superiores e a redução da idade de colheita. Tradicionalmente, florestas destinadas à produção de lenha e carvão e outras finalidades, como a produção de madeira para celulose, são implantadas em espaçamentos que vão de 3 x 3 m e 3 x 2 m, com densidades populacionais de 1111 e 1667 plantas por hectare, respectivamente, e rotações de corte de cinco a sete anos (GUERRA *et al.*, 2012). Entretanto, estudos recentes sobre sistemas florestais de curta rotação, normalmente conduzidos em espaçamentos entre plantas reduzidos, vêm exibindo resultados positivos quanto a produtividade em ciclos de um a três anos (MÜLLER *et al.*, 2005), o que é desejável sobretudo para a produção de biomassa para a queima direta e para a produção de carvão vegetal. Em consequência, pesquisas sobre o desempenho de florestas adensadas tornam-se fundamentais para a busca de novas formas de produção de biomassa em um menor período de tempo.

Ressalta-se que, com o advento da clonagem no Brasil, o conceito de florestas de curta rotação surge buscando materiais genéticos capazes de produzir biomassa em quantidade e com propriedades adequadas principalmente para o uso energético. Devido à habilidade de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* se desenvolverem bem em espaçamentos mais adensados, propriedades físicas e químicas, bem como a produção de biomassa nessas condições têm sido exploradas (LOPES, 2017; LOPES *et al.*, 2017). Embora essas análises tenham sido utilizadas para compreender as respostas de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. às condições ambientais proporcionadas por diferentes espaçamentos de plantio, não há relatos de

estudos de expressão gênica para entender esse fenômeno. Dada as diferenças na qualidade da madeira e na velocidade de crescimento destas espécies frente aos diferentes espaçamentos de plantio, possíveis genes identificados no tecido cambial podem representar bons candidatos para a manipulação genética com vistas à produção de eucaliptos portadores de características produtivas mais interessantes.

Devido a sua capacidade de fornecer informações sobre as proteínas codificadas a partir do genoma de *Eucalyptus*, uma abordagem proteômica em larga escala foi empregada neste estudo para a identificação de alterações na abundância de espécies proteicas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp., induzidas pelo plantio em diferentes espaçamentos. A identificação e o entendimento acerca de tais alterações podem contribuir para o sucesso no desenvolvimento de progênies com maior rendimento lignocelulósico e com grande potencial de uso em diferentes âmbitos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área experimental

A área experimental está localizada nas coordenadas geográficas a 17°44'22 S de latitude e 42°54'12 W de longitude e altitude de 900 m, propriedade da empresa Aperam Bioenergia, em Itamarandiba, Minas Gerais, Brasil.

O clima da região é definido como tropical de altitude, temperado úmido, com duas estações bem definidas, inverno seco e verão quente e úmido, segundo classificação de Köppen e Geiger tipo Cwa (COSTA *et al.*, 2018). A temperatura média da região é de 21,2° C, a umidade relativa média do ar anual varia entre 60 e 70 % e o índice pluviométrico médio anual histórico é de 1,132 mm (INMET, 2018).

O bioma da região é o Cerrado, com fitofisionomias que abrangem de cerradões a campos, com ocorrências de florestas semi-decíduais e decíduais (MÜLLER, 2005).

2.2 Material vegetal, densidade de plantas por hectare e espaçamento de plantio

Foram avaliados dois clones da empresa Aperam BioEnergia S/A, sendo estes, um híbrido tri-cross de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x (*E. camaldulensis* Dehn x *E. grandis* Hill ex Maiden) e um híbrido de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson x *C. torelliana* (F. Muell) K. D. Hill & L. A. Johnson, aos 24 meses de idade, cultivados em quatro

diferentes espaçamentos de plantio, 3 x 1 m; 3 x 3 m; 6 x 0,5 m e 6 x 1,5 m entre plantas, simulando dois diferentes espaços vitais de crescimento (TABELA 2).

Tabela 2 – Espaçamentos, espaços vitais de crescimento e densidade de plantas por hectare

Espaçamentos (mxm)	Espaço vital de crescimento (m²/planta)	Densidade (plantas/ha)
3x3	9	1111
6x0,5	3	3333
3x1	3	3333
6x1,5	9	1111

2.3 Desenho experimental

O experimento foi instalado no delineamento em blocos ao acaso, com três repetições, em um esquema de parcelas subdivididas, onde a parcela foi representada pelos clones e as subparcelas pelos espaçamentos de plantio. Cada parcela experimental foi composta por 4 diferentes espaçamentos, sendo que, nos espaçamentos 3 x 3 m e 3 x 1 m foram implantadas dez linhas de plantio, contendo 5 e 15 mudas por linha, respectivamente, e nos espaçamentos 6 x 1,5 m e 6 x 0,5 m foram implantadas cinco linhas de plantio, contendo 10 e 30 mudas por linha, respectivamente. Os arranjos espaciais 3 x 3 m e 6 x 1,5m, 3 x 1 m e 6 x 0,5 m compuseram uma subparcela que comportou 50 e 150 mudas, respectivamente. Para cada parcela experimental foram plantadas 400 mudas para cada clone (FIGURA 9).

O plantio foi realizado no mês de setembro de 2014, utilizando os procedimentos silviculturais operacionais da empresa. O preparo da área de plantio foi feito por meio de subsolagem em linha e adubação de base empregando 450 Kg/ha de NPK (10-20-14) + 1,4 % Ca; 3 % S; 0,3 % B; 0,4 % Cu; 0,4 % Zn. A irrigação foi mecanizada, utilizando cerca de 10 L de água/cova em cada irrigação (3 vezes). Dez dias após o plantio foi feito o replantio das mudas e seis meses depois foi realizada calagem em área total, com a aplicação de 2000 Kg/ha de Agrosilício S[®] e 180 Kg de Magnesita[®]. Aos 18 meses, foi realizada uma adubação de cobertura aplicada na linha de plantio, utilizando 250 Kg/ha de NPK (10-00-35) + 0,6 % B + 0,2 % Cu + 0,3 % Zn. Além disso, foi realizado o controle de formigas cortadeiras e uma capina química inicialmente e oito meses após o plantio.

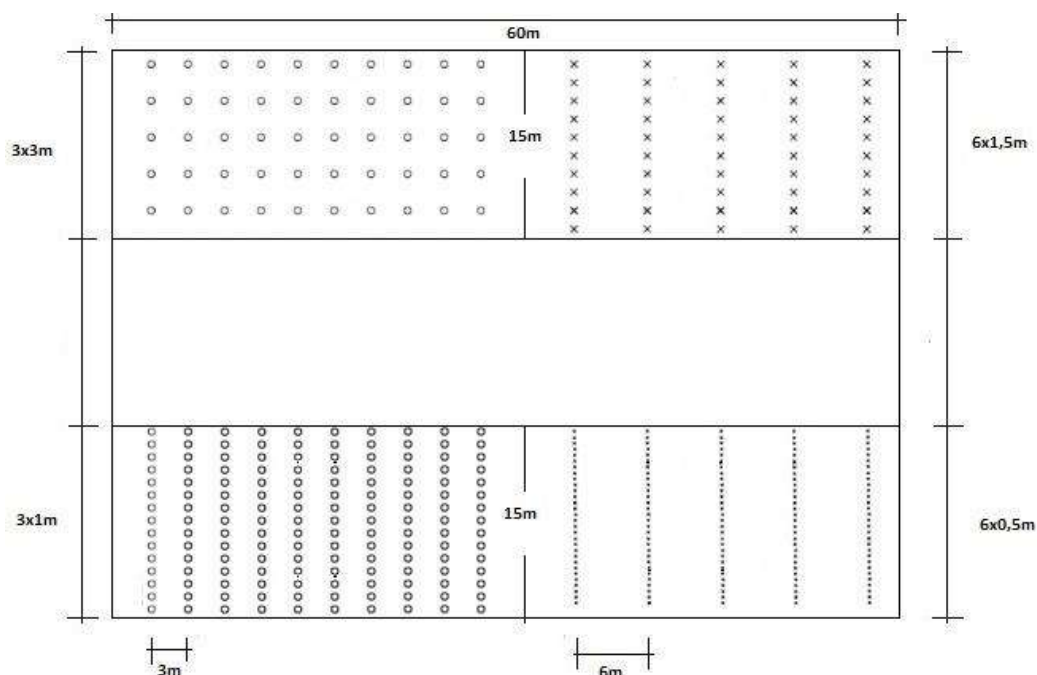


Figura 9 – Croqui de instalação das parcelas experimentais.

2.4 Coleta do material vegetal

O tecido cambial, ou xilema em desenvolvimento, usado nas análises proteômicas, foi coletado a partir da retirada da casca de uma área retangular de 10 x 20 cm, localizada a 10 cm acima e 10 cm abaixo do DAP (Diâmetro a altura do peito ou a 1,30 m do solo), e da raspagem, com auxílio de uma lâmina de bisturi, de todo o tecido jovem existente entre a casca e o xilema lignificado (FIGURA 10). Para cada tratamento foi coletada a região cambial de nove árvores, três em cada bloco (repetição), com diâmetro igual ao DAP médio previamente obtido para aquele tratamento, distribuídas igualmente em três *bulks*, perfazendo três réplicas biológicas.



Figura 10 – Detalhe da coleta de tecido cambial. (A) Retirada da casca. (B) Raspagem do tecido depositado na parte interna da casca e no xilema lignificado. (C) Deposição do tecido coletado em tubos para posterior congelamento em nitrogênio líquido.

As amostras de tecido cambial foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para transporte até o Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, onde foram submetidas a liofilização seguida de pulverização. Posteriormente, as amostras foram enviadas ao laboratório de Bioquímica, Proteômica e Biologia de Sistemas Vegetal e Agroflorestal da Universidade de Córdoba, Espanha, onde foram realizadas todas as análises proteômicas descritas no próximo item.

2.5 Análises proteômicas

2.5.1 Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo baseado na solubilização de proteínas com tampão, extração subsequente com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, descrito por Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações.

Para o desenvolvimento do protocolo, inicialmente, 0,3 g de tecido cambial liofilizado e pulverizado foram pesados e distribuídos em três tubos de 2 mL (0,1 g em cada tubo). A extração consistiu em homogeneizar 0,1 g de tecido cambial de eucalipto, previamente liofilizado, em 1 mL de tampão de extração constituído de 1 % (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP), 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M de sacarose, 2 % (p/v) β -mercaptoetanol e 1 % mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) em um tubo de 2 mL do tipo Eppendorf. Foram realizadas 3 réplicas técnicas da amostra. Após

homogeneização das amostras por 30 min e a 4° C, acrescentou-se o mesmo volume de fenol saturado em Tris pH 8,1 em cada tubo e, novamente, o material foi submetido a homogeneização nas mesmas condições, seguida de centrifugação por 30 min a 12000 rpm, a 4° C. A fase fenólica recuperada após a centrifugação foi transferida para um novo tubo e re-extraída com a adição de volumes iguais de tampão de extração e, em seguida, de fenol, sendo homogeneizada a cada acréscimo e, posteriormente, centrifugada nas mesmas condições anteriores, por 3 vezes para remoção de possíveis resíduos. A fase fenólica recuperada na última re-extração foi transferida para tubos de 5 mL e precipitadas por 16 h a -20° C pelo acréscimo de 4 volumes de tampão de precipitação, composto por 0,1 M de acetato de amônio em metanol 100 %, conservado a -20° C. No dia seguinte, a fase fenólica em tampão de precipitação foi centrifugada por 30 min a 12000 rpm a 4° C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet recuperado em cada um dos tubos foi lavado três vezes com tampão de precipitação e uma vez com acetona 80 %, sendo que, em cada etapa as proteínas foram precipitadas por 30 min a -20° C e centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. O pellet final foi seco por 30 min e ressuspendido em 100 µL de tampão de solubilização, composto por 7 M de úreia, 2 M de tioúreia, 4 % (p/v) CHAPS, 2 % (v/v) Triton-X 100, 100 mM ditiotretol (DTT) e, em seguida, homogeneizado por 2 hrs em agitação constante a 4° C.

2.5.2 Quantificação de proteínas

Após a obtenção dos extratos proteicos, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para isso, foi preparada uma curva de calibração para a quantificação de proteínas, utilizando albumina de soro bovino como padrão. A partir de uma solução estoque de BSA (10 mg/mL) foram feitas 5 diluições em água destilada deionizada, com as concentrações 0, 2, 4, 6 e 8 mg/mL. Para a leitura de absorbância foram aplicados 1 µL das amostras de proteína, 499 µL de água destilada deionizada e 500 µL de reagente Bradford nas cubeta e em triplicata. As cubetas foram incubadas por cerca de 5 min em temperatura ambiente e, em seguida, o valor de absorbância foi obtido em espectrofotômetro (Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometers), através do software InSight (Thermo Scientific™), usando o comprimento de onda de 595 nm. Os dados de absorbância encontrados foram plotados no Excel e a curva de calibração foi construída, obtendo-se a equação de ajuste linear $y = 0,589 * x$, ($R^2 = 0,997$).

Para a quantificação dos extratos proteicos obtidos, inicialmente, 1 µL do tampão empregado para a solubilização dos extratos proteicos foi diluído em 499 µL de água destilada

deionizada e 500 µL de reagente de Bradford em uma cubeta para o preparo do branco. Para o preparo das amostras, adicionou-se 500 µL de reagente de Bradford, 499 µL de água destilada deionizada e 1 µL do extrato proteico em cada cubeta. Para cada amostra foram preparadas 3 réplicas técnicas para leitura de absorbância a 595 nm, conforme citado anteriormente. Do valor médio de absorbância de cada réplica da amostra foi subtraído o valor da absorbância do branco e o valor de absorbância final obtido foi plotado na equação, onde x representou a massa de proteínas na alíquota (1 µL). A massa de proteínas para a alíquota foi convertida para a concentração de proteínas (µg/µL) e para quantidade de proteína total (µg) em meio de solubilização e, em seguida, calculou-se o rendimento, considerando o peso fresco das amostras igual a 0,1 g.

2.5.3 SDS-PAGE

A análise da qualidade dos extratos proteicos foi realizada mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O sistema eletroforético foi composto por um gel de empilhamento e um gel de separação, preparados a 4 % e a 12 % de acrilamida, respectivamente em uma placa de vidro de 16 x 20 cm e 1,5 mm de espessura. Após a polimerização do gel, a placa foi transferida para uma cuba vertical (PROTEAN II XI Cell, Bio Rad) contendo tampão de corrida 1 x (0,192 M de glicina, 0,025 mM de Tris base e 0,1 % SDS), e carregada com volumes de extratos proteicos equivalentes a 80 µg de proteína diluídos em buffer Laemmli (4% dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% glicerol, 10 % 2-mercaptoethanol 0,004 % azul de bromofenol e 0,125 de M Tris HCl), na proporção 1:1. Antes de serem aplicadas nos poços do gel, juntamente com o marcador de peso molecular (gTPbio, bíoBLU Prestained Protein Ladder), as amostras foram submetidas a 95° C por 5 min. Para a regulação do sistema, aplicou-se uma corrente constante de 20 mA, interrompendo-se a eletroforese quando o azul de bromofenol chegou ao final do gel. Foram realizadas três réplicas biológicas para cada amostra.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram visualizadas através da coloração do gel com azul de Coomassie Brilhante G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988). Primeiramente, o gel foi submetido a solução de fixação (10 % v/v de ácido acético e 40 % v/v de metanol) por 60 min, lavado duas vezes com água destilada deionizada por 10 min e, posteriormente, mantido por 16 h em solução de coloração composta por 0,1 % p/v de Coomassie Brillante Blue G-250, 10 % v/v de ácido fosfórico, 10 % p/v de sulfato de amônio, 20 % v/v de metanol, em agitação orbital. Depois de corado, o gel foi lavado com 0,1 M de Tris H₃PO₄ pH 6,3 por 3 min com metanol 25

% e com sulfato de amônio por 1 min cada e com água destilada deionizada até a eliminação do corante excedente.

As imagens dos géis foram obtidas por meio de um scanner GS-900 Calibrated Densitometer (Bio Rad) e analisadas através do programa Image Lab 5.2.1 (BioRad). Os valores de densidade ótica obtidos pelo programa foram normalizados em relação ao total detectado para cada uma das amostras e, em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e ao teste de comparações múltiplas de Tukey dos dados. As bandas obtidas foram representadas em um heatmap (*Heatmap*), obtido através do programa *Metaboanalyst* 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (XIA *et al.*, 2009) considerando-se a distância euclidiana como medida de similaridade e o algoritmo de agrupamento Ward's Linkage. Para estas análises, foram usados os valores médios de densidade ótica (OD) dos extratos proteicos das três réplicas biológicas de cada amostra de tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp., cultivados nos diferentes espaçamentos de plantio avaliados.

2.5.4 Pré-fracionamento e digestão *In-gel* de proteínas

Previamente à realização das análises por espectrometria de massas, os extratos de proteínas foram submetidos a uma etapa de pré-fracionamento por SDS-PAGE, conforme descrito por Valledor *et al.* (2014). Nesta etapa, alíquotas contendo 100 µg de proteínas, diluídas em *buffer* Laemmli e previamente aquecidas durante 5, min a 95° C, foram carregadas em géis, compostos por um gel de empilhamento e um gel de separação, preparados a 4 % e a 12 % de acrilamida, respectivamente, em uma placa de vidro de 20 x 16 cm e 1,5 mm de espessura e submetidos a uma corrente constante de 15 mA por gel, em cuba de eletroforese vertical (PROTEAN II XI Cell, Bio Rad). A corrida foi interrompida assim que as amostras impetraram uma fração do gel de separação, resultando em bandas únicas de proteínas de aproximadamente 0,5 cm. Para visualização das bandas, os géis foram submetidos a tincão com azul de Coomassie brilhante G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988).

As bandas únicas de proteínas adquiridas para cada uma das amostras foram manualmente excisadas, descoradas e digeridas conforme descrito por Castillejo *et al.* (2015). Para isso, os pequenos fragmentos de gel obtidos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e descoloridos pela adição de 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM em acetonitrilo 50%, em agitação constante e temperatura de 37° C, durante 30 min., por duas vezes cada. O sobrenadante foi eliminado e adicionou-se 50 µL de acetonitrilo aos fragmentos de gel, que permaneceram em temperatura ambiente durante 5 min.

Para a redução e alquilação das proteínas, após a remoção do acetonitrilo, os fragmentos de gel foram incubados durante 30 min, primeiramente, em solução de diotretol (DTT) 20 mM em bicarbonato de amônio 100 mM e, após a remoção do sobrenadante, em iodoacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, no escuro. Os fragmentos de gel foram lavados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM e em solução de bicarbonato de amônio 25 mM em acetonitrilo 50%, durante 15 min, por duas vezes cada e, em seguida, incubados em acetonitrilo durante 5 min em temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos de gel foram incubados *overnight*, a 37° C e em agitação, em uma solução de tripsina (Sequencing grade, Promega) a uma concentração final de 12,4 ng/μL em solução de bicarbonato de amônio 25 mM, acetonitrilo 50% e cloreto de cálcio 5 mM, para promover a digestão das proteínas.

Após a digestão, para a dessalinização dos peptídeos resultantes da hidrólise, as amostras foram submetidas por duas vezes a colunas de fase reversa C18 (Scharlau, C18100-O1C), previamente ativadas com acetonitrilo 70 % e ácido trifluoroacético 0,1 % e lavadas com ácido trifluoroacético 0,1 %. Os peptídeos retidos em cada amostra foram eluídos com acetonitrilo 70 % em novos microtubos e secos em um sistema de vácuo (SpeedVac). O extrato seco foi armazenado a -20° C.

2.5.5 nLC-MS/MS

Os peptídeos procedentes da digestão com tripsina foram analisados em um sistema nLC-MS/MS (Nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry), disponível na *facility* para Proteômica UCO-SCAI (Serviço Central de Apoio a Investigação (SCAI) da Universidade de Córdoba (UCO), Espanha.

Uma alíquota de cada amostra foi injetada para separação cromatográfica dos peptídeos no equipamento nano-LC (Dionex Ultimate 3000 nano UPLC, Thermo Scientific), equipado com uma pré-coluna (300 μm x 5 mm Acclaim Pepmam (Thermo Scientific)) e uma coluna analítica C18 (75 μm x 50 Acclaim Pepmap (Thermo Scientific)). Primeiramente, os analitos foram injetados na pré-coluna, em tampão composto por acetonitrilo 2 % em ácido trifluoroacético 0,05 %, a um fluxo de 5 μL min⁻¹, durante 5 min. A separação foi realizada na coluna analítica C18, sobre vazão de 300 nL min⁻¹ e temperatura de 40° C. A fase móvel A foi constituída de ácido fórmico 0,1 % em água e a fase móvel B por ácido fórmico 0,1 % em acetonitrilo 20 %. O gradiente linear de eluição para os peptídeos na coluna iniciou-se com 4 – 35 % da fase móvel B, por 60 min; aumentando para 35 – 55 % B, por 3 min; 55 – 90 % B, por

3 min, seguido de 8 min de lavagem a 90% e 15 min de reequilíbrio a 4 % B. O tempo total da cromatografia foi de 85 min.

Os íons eluídos foram convertidos a fase gasosa por ionização *nano-electrospray* e analisados em espectrômetro de massas Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific), operado em modo positivo. A varredura dos peptídeos precursores de 400 a 1500 m/z foi realizada a uma resolução de 120 K (a 200 m/z), com um alvo de contagem de íons de 4×10^5 . A MS (mass spectrometry – espectrometria de massas) em tandem foi realizada por isolamento a 1,2 Da com o quadrupolo, fragmentação CID (collision-induced dissociation – dissociação induzida por colisão) com energia de colisão normalizada de 35 % e modo de análise de MS em varredura rápida no íon trap. O alvo da contagem de íons AGC foi ajustado para 2×10^3 e o tempo máximo de injeção foi de 300 ms. Apenas os precursores com o estado de carga variando de 2 - 5 foram amostrados para MS². A duração de exclusão dinâmica foi configurada para 15 s, com uma tolerância de 10 ppm em torno do precursor selecionado e seus isótopos. A seleção de precursores monoisotópicos foi ativada e o equipamento foi executado no modo *top 30* com ciclos de 3 s, ou seja, o equipamento executou eventos de MS² continuamente até um máximo de 30 precursores não excluídos ou 3 s, o que fosse menor.

Os extratos proteicos das amostras de tecido cambial dos clones cultivados nos espaçamentos 3 x 3 m e 6 x 0,5 m, representativos do maior e menor espaço vital de crescimento de plantas, respectivamente, foram escolhidos para a etapa de identificação de proteínas por espectrometria de massas.

2.5.6 Análise dos espectros de massas, identificação e quantificação de proteínas

A interpretação dos espectros MS² dos peptídeos foi realizada pela ferramenta de busca SEQUEST (ENG *et al.*, 1994), contida no ambiente virtual do programa Proteome Discoverer (Versão 2.1.0.81, Thermo Scientific). Para a identificação de proteínas, esta ferramenta correlaciona espectros do tipo MS², obtidos do espectrômetro de massas, com as sequencias de peptídeos de um banco de dados específico ou de interesse. Assim, foi possível contrastar os espectros processados com bancos de dados, cujas sequencias proteicas foram derivadas do genoma do *Eucalyptus grandis*, disponíveis em Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), UniProt (<https://www.UniProt.org/>) e NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para garantir a precisão da identificação das proteínas, foram estabelecidos os seguintes parâmetros de busca: a geração dos peptídeos foi realizada por digestão trípica, com

no máximo uma clivagem perdida; a carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação fixa e a oxidação da metionina como modificação variável; admitiu-se tolerância de massa de 10 ppm para os íons precursores e de 0,8 Da para os íons fragmentos. Além disso, as correspondências espectrais de peptídeos (PSM – *peptide spectrum matches*) obtidas foram filtradas e validadas considerando apenas as identificações que possuísem uma taxa de descoberta falsa (FDR – *false discovery rate*) igual a 5% (JORRÍN-NOVO, 2014).

A quantificação relativa das proteínas foi realizada com base nos valores de área de pico, resultantes da média da intensidade do sinal MS dos três peptídeos trípticos mais intensos de cada proteína (SILVA *et al.*, 2006), normalizados pelo somatório de todos os valores em cada amostra. Apenas as identificações que apresentavam como parâmetros de confiança valor de *score* maior que 2, porcentagem de cobertura maior que 10 % e a identificação de, no mínimo, 2 peptídeos. Ademais, somente proteínas consistentes nas três réplicas foram consideradas.

2.5.7 Análise dos dados de proteômica e proteínas diferencialmente reguladas

A análise dos dados de proteômica foi realizada por meio de análises de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico das proteínas com diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$) entre clones e espaçamentos de plantio, considerando-se a distância euclidiana como medida de similaridade e o algoritmo de agrupamento Ward's Linkage, por meio do programa *Metaboanalyst* 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (XIA *et al.*, 2009).

Para a observação de padrões de regulação e tendências dos grupos de proteínas diferencialmente regulados, foi realizada a identificação de proteínas com regulação diferencial no tecido cambial dos genótipos de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados nos espaçamentos 3 x 3 m ou 6 x 0,5 m, utilizando o critério de “*fold-change*” entre 2 e 0,5 e com diferença significativa a 5 % de acordo com a análise de variância (ANOVA). As análises comparativas foram realizadas entre os 2 tratamentos (espaçamento de plantio mais e menos adensado) e os 2 genótipos (clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.) detalhadas abaixo:

Clone de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3);

Clone de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m (Eu6x0,5);

Clone de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3);

Clone de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m (Cor6x0,5).

As análises comparativas desenvolvidas foram: (i) clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m *versus* clone de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m (Eu3x3 *vs* Eu6x0,5), (ii) clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m *versus* clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (Cor3x3 *vs* Cor6x0,5), (iii) clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m *versus* clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3 *vs* Cor3x3), (iv) clone de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m *versus* clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (Eu6x0,5 *vs* Cor6x0,5), (v) clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m *versus* clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (Eu3x3 *vs* Cor6x0,5), (vi) clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m *versus* clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu6x0,5 *vs* Cor3x3).

Após esta etapa, proteínas identificadas, porém anotadas como “não caracterizadas” ou “hipotéticas” nas bases de dados empregadas foram funcionalmente anotadas com base na similaridade com sequências anotadas na base de dados UniRef90, considerando a taxonomia de plantas. Para isso, a ferramenta Sma3s (<http://www.bioinfocabd.upo.es/node/11>) (CASIMIRO-SORIGUER *et al.*, 2017) foi utilizada para a obtenção das sequências anotadas com o provável nome do gene através de uma busca restritiva do BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com três etapas de significância para a recuperação progressiva de anotações de sequências anotadas existentes, sequências ortólogas e grupos de sequências que compartilharam um padrão estatisticamente significativo (MUÑOZ-MÉRIDA *et al.*, 2013).

Para uma interpretação biológica efetiva das modificações observadas nos perfis proteicos do tecido cambial de clones cultivados em diferentes espaçamentos, as proteínas identificadas foram categorizadas funcionalmente pela ferramenta MERCATOR (LOHSE *et al.*, 2013) (<http://www.plabipd.de/portal/mercator-sequence-annotation>); selecionando TAIR 10, proteínas vegetais SwissProt-UniProtKB, clusters de banco de dados de genes eucarióticos ortólogos (KOG) e varredura InterPro, com um valor de corte de 80; e examinadas, quanto as suas funções biológicas, usando informações obtidas na base de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (KANEHISA *et al.*, 2014) e no MAPMAN (<http://www.gabipd.org/projects/MapMan/>) (THIMM *et al.*, 2004), uma ferramenta orientada pelo usuário que fornece informações de caminho e processos biológicos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração, quantificação e separação de proteínas

O procedimento de extração baseado no uso de tampão de extração combinado com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol resultou na obtenção de grande quantidade de proteínas a partir das amostras avaliadas. Os resultados de rendimento e concentração de proteínas totais dos extratos proteicos estão apresentados na Tabela 3. Quando comparados com os valores encontrados na literatura, verificou-se que a concentração de proteínas do tecido cambial dos clones corrobora com os valores publicados para este tecido em eucaliptos (5 µg/µL de proteína) (MEIRELES, 2006).

Tabela 3 – Quantificação de proteínas do tecido cambial clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp., cultivados em diferentes espaçamentos, pelo método Bradford, mediante uma curva padrão ($Y = 0.0589 \times X$; ($R^2 = 0,997$)). As proteínas extraídas pelo método de solubilização com solução tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol. O peso fresco das amostras correspondeu a 0.1 g

Clone	Espaçamento de plantio	Concentração (µg/µL)	Rendimento (µg/g)
<i>Corymbia</i> spp.	3 x 1 m	4,87	4868,89
	3 x 3 m	4,66	4661,38
	6 x 1,5 m	4,59	4594,04
	6 x 0,5 m	4,65	4648,18
<i>Eucalyptus</i> spp.	3 x 1 m	5,05	5053,76
	3 x 3 m	5,03	5033,01
	6 x 1,5 m	5,62	5615,54
	6 x 0,5 m	5,52	5520,66

A partir destes resultados não foi possível identificar quais proteínas foram extraídas em maior ou menor quantidade, tampouco o tipo de proteínas extraídas ou não das amostras de tecido cambial, dependendo do clone ou espaçamento de plantio avaliado. Entretanto, inferiu-se que os extratos proteicos obtidos a partir do tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. apresentaram maiores rendimentos de proteína (em média 5305,74 µg de proteína/g de tecido vegetal) quando comparados com os extratos proteicos obtidos a partir do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. (em média 4693,12 µg de proteína/g de tecido vegetal). Estes rendimentos de proteínas representaram, respectivamente, 0,53 % e 0,46 % m/m da composição das amostras de tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.. Via de regra, proteínas compõem cerca de 1 % das células parenquimáticas da madeira e são encontradas, principalmente, nas partes não lenhosas do tronco, como a casca interna e o câmbio (KLOCK; ANDRADE, 2013). Portanto, os resultados obtidos para a concentração de proteínas totais estão em concordância com os valores esperados.

Para verificar a integridade das proteínas extraídas, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE (1-DE) antes de iniciar a análise por espectrometria de massas.

As Figuras 11 e 12 mostram os resultados da eletroforese dos extratos proteicos obtidos a partir do tecido cambial dos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp., respectivamente, utilizados neste trabalho.

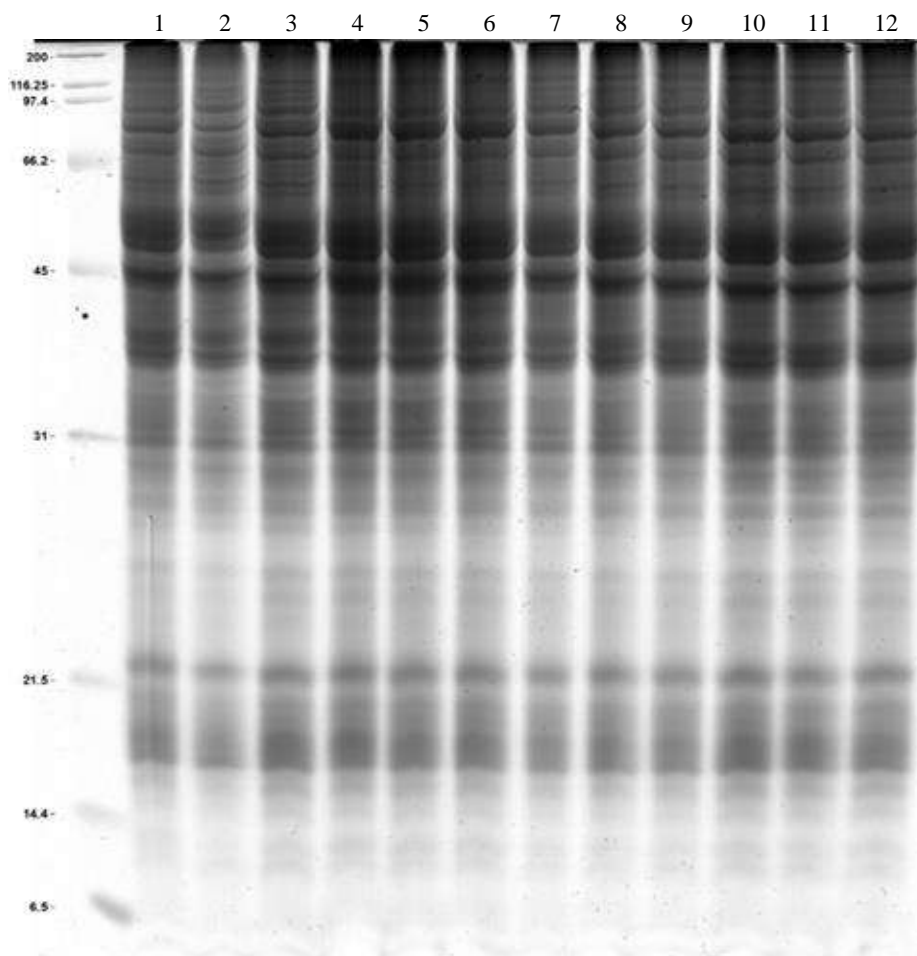


Figura 11 – Perfil proteico do tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. Eletroforese 1-D (SDS-PAGE; 12% gel). Linhas 1-3: espaçamento de plantio 3 x 3 m; Linhas 4-6: 6 x 0,5 m; Linhas 7-9: 3m x 1m; Linhas 10-12: 6 x 1,5 m. Os extratos proteicos foram obtidos por solubilização com solução tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol.

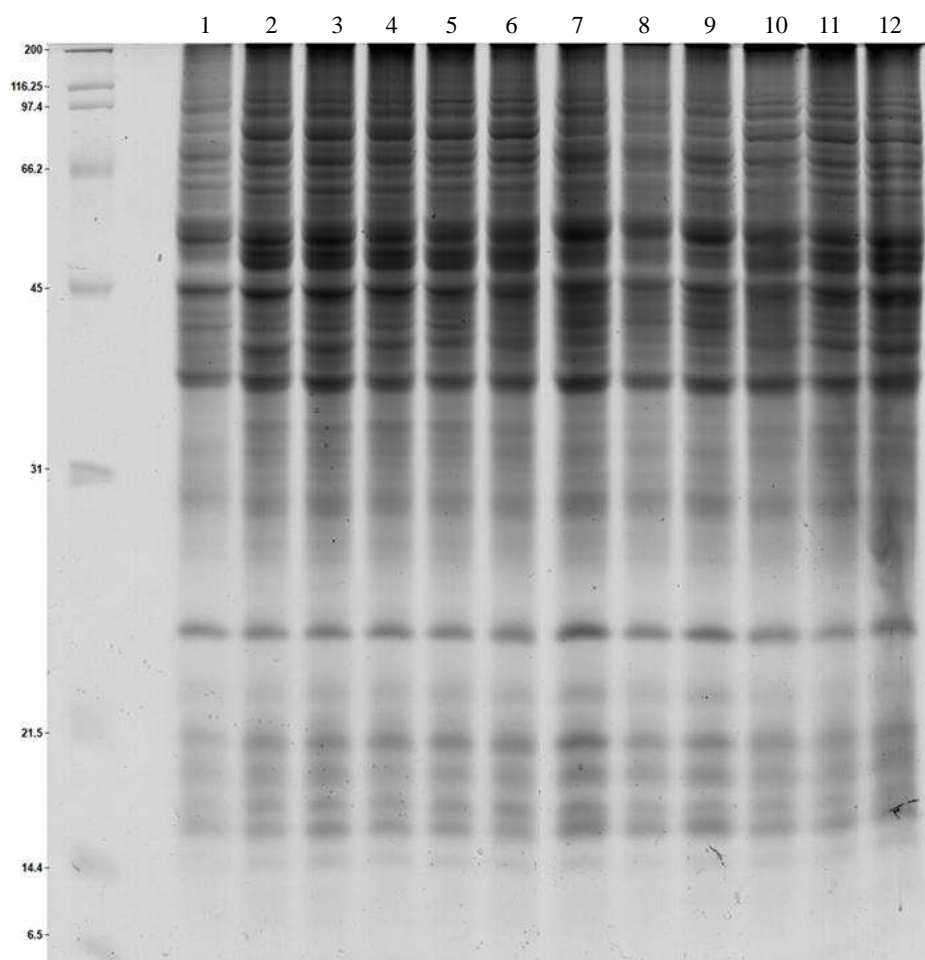


Figura 12 – Perfil proteico do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. Eletroforese 1-D (SDS-PAGE; 12% gel). Linhas 1-3: espaçamento de plantio 3 x 3 m; Linhas 4-6: 6 x 0,5 m; Linhas 7-9: 3m x 1m; Linhas 10-12: 6 x 1,5 m. Os extratos proteicos foram obtidos por solubilização com solução tampão, extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol.

Utilizando o programa *Image Lab 5.2.1* (BioRad), cada gel foi analisado quanto ao número e intensidade de bandas de proteínas. Uma quantificação foi gerada a partir dos valores de densidade óptica (OD) das bandas reveladas em cada gel. Os extratos proteicos do tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. apresentaram 42 bandas de proteínas em um intervalo de 6.5-200 kD, enquanto os extratos proteicos do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. apresentaram 38 bandas neste mesmo intervalo. A análise de variância (ANOVA) (FIGURA 13, FIGURA 14) e o teste de Tukey (TABELA 4, TABELA 5) realizados entre o conjunto de dados de cada clone identificaram 26 e 15 bandas proteicas com diferença significativa entre os diferentes espaçamentos de plantio para amostras de tecido cambial dos clones de *Corymbia* spp. e *Eucalyptus* spp., respectivamente, em relação à intensidade de bandas. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

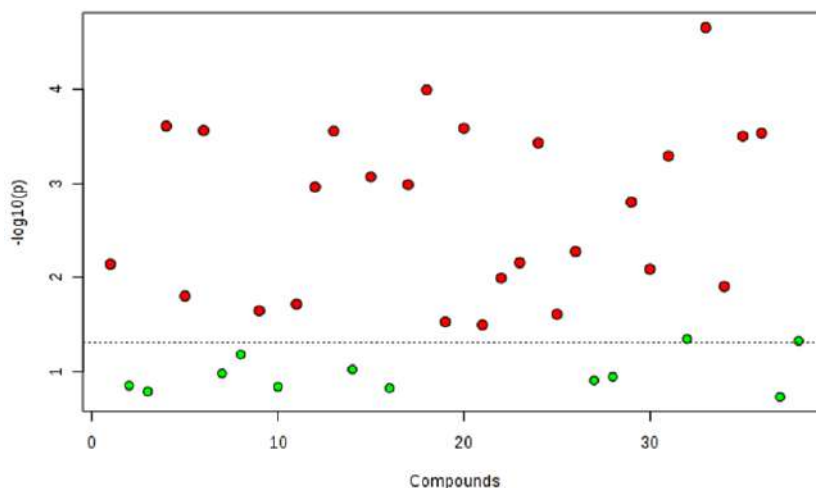


Figura 13 – Análise de variância (ANOVA). Os pontos vermelhos representam bandas de proteínas do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os espaçamentos de plantio avaliados e os pontos verdes representam as bandas de proteína sem diferenças significativas.

Tabela 4 – Bandas de proteína do tecido cambial de clones de *Corymbia* spp. com diferenças significativas pela ANOVA e pela análise *post-hoc* (Tukey) ($p < 0,05$), identificadas entre os espaçamentos de plantio 3 x 3 m, 6 x 0,5 m, 3 x 1 m e 6 x 1,5 m

Banda	f,value	p,value	-log10(p)	FDR	Tukey's HSD
33	46,02	0,00	4,66	0,00	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
18	30,44	0,00	4,00	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
4	23,79	0,00	3,61	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
20	23,44	0,00	3,59	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5
6	23,08	0,00	3,57	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
13	22,99	0,00	3,56	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
36	22,66	0,00	3,54	0,00	6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
35	22,18	0,00	3,51	0,00	3x1-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
24	21,17	0,00	3,43	0,00	3x1-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
31	19,29	0,00	3,29	0,00	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5
15	16,63	0,00	3,07	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
17	15,70	0,00	2,99	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
12	15,43	0,00	2,96	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
29	13,81	0,00	2,80	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
26	9,41	0,01	2,28	0,01	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5
23	8,58	0,01	2,16	0,02	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
1	8,48	0,01	2,14	0,02	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3
30	8,13	0,01	2,09	0,02	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3
22	7,54	0,01	1,99	0,02	6x1,5-3x3; 6x1,5-6x0,5
34	7,00	0,01	1,90	0,02	6x1,5-3x3
5	6,44	0,02	1,80	0,03	6x0,5-3x3; 3x1-3x3
11	5,98	0,02	1,71	0,03	3x1-6x0,5
9	5,61	0,02	1,64	0,04	6x1,5-6x0,5
25	5,44	0,02	1,61	0,04	6x1,5-3x3
19	5,05	0,03	1,53	0,05	6x0,5-3x3
21	4,90	0,03	1,49	0,05	6x1,5-3x3

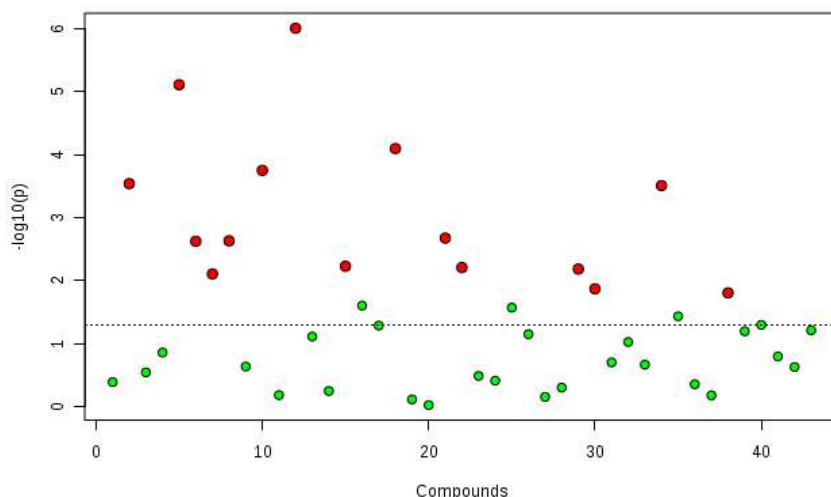


Figura 14 – Análise de variância (ANOVA). Os pontos vermelhos representam bandas de proteínas do tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os espaçamentos de plantio avaliados e os pontos verdes representam as bandas de proteína sem diferenças significativas.

Tabela 5 – Bandas de proteína do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. com diferenças significativas pela ANOVA e pela análise *post-hoc* (Tukey) ($p < 0,05$), identificadas entre os espaçamentos de plantio 3 x 3 m, 6 x 0,5 m, 3 x 1 m e 6 x 1,5 m

Banda	f.valor	p.valor	$-\log_{10}(p)$	FDR	Tukey HSD
12	103,20	0,00	6,009	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
5	60,41	0,00	5,112	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
18	32,41	0,00	4,099	0,00	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
10	26,00	0,00	3,752	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
2	22,70	0,00	3,541	0,00	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5
34	22,24	0,00	3,510	0,00	6x1,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
21	12,63	0,00	2,676	0,01	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5
8	12,25	0,00	2,634	0,01	6x0,5-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-3x1
6	12,19	0,00	2,626	0,01	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3; 6x1,5-3x1
15	9,09	0,01	2,230	0,02	6x0,5-3x3; 3x1-3x3; 6x1,5-3x3
22	8,95	0,01	2,209	0,02	6x1,5-3x3; 6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
29	8,79	0,01	2,186	0,02	3x1-6x0,5
7	8,27	0,01	2,108	0,03	6x1,5-6x0,5; 6x1,5-3x1
30	6,83	0,01	1,871	0,04	3x1-3x3; 3x1-6x0,5; 6x1,5-3x1
38	6,48	0,02	1,808	0,04	6x0,5-3x3; 6x1,5-3x3

Adicionalmente, as análises de componentes principais (FIGURA 15) e de agrupamento hierárquico (FIGURA 16) possibilitaram uma maior compreensão acerca dos dados, revelando padrões de subgrupos entre as bandas de proteína identificadas nos géis.

Pelas análises de componentes principais observou-se que nenhum dos dados amostrais apresentou-se fora da tendência geral e que houve uma nítida diferenciação entre os espaçamentos de plantio tanto para os clones de *Corymbia* spp. (FIGURA 15 A), quanto para

os clones de *Eucalyptus* spp. (FIGURA 15 B). Para o clone de *Eucalyptus* spp., o primeiro eixo da componente principal (PC1) explicou 42,1% e o segundo eixo (PC2) explicou 16,8%, variabilidade entre os espaçamentos de plantio avaliados, totalizando 58,9% da variabilidade total. Para o clone de *Corymbia* spp., o primeiro eixo da componente principal (PC1) explicou 41,9% e o segundo eixo (PC2) explicou 22,3%, variabilidade entre os espaçamentos de plantio avaliados, totalizando 64,2% da variabilidade total.

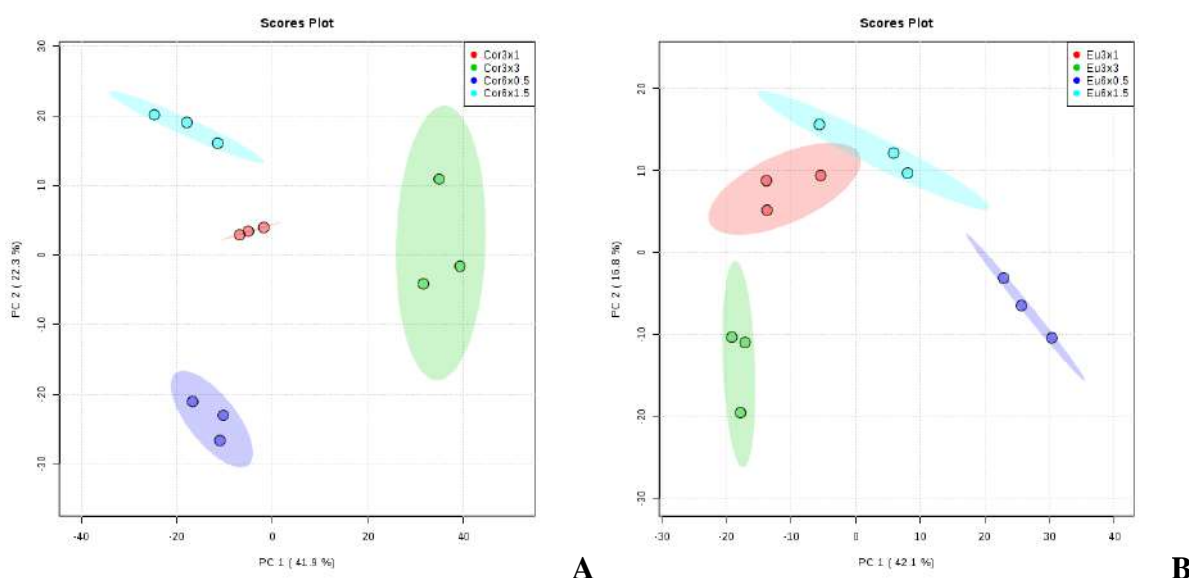


Figura 15 – Análise de componentes principais (PCA) da intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5) (FIGURA A) e do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) (FIGURA B). Os géis foram obtidos por eletroforese 1-D (SDS-PAGE, gel 12%).

Os *heatmaps* representando a intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial dos clones de *Corymbia* spp. (FIGURA 16 A) e *Eucalyptus* spp. (FIGURA 16 B), gerados pelas análises de agrupamento confirmaram esta observação. Neles, os dados amostrais foram classificados em diferentes categorias. A primeira categoria foi representada pelas bandas de proteínas identificadas nas amostras de tecido cambial de árvores cultivadas no espaçamento 3 x 3 m, correspondente a 9 m²/planta, enquanto a segunda categoria englobou aquelas identificadas nas amostras de tecido cambial de árvores cultivadas nos espaçamentos 6 x 1,5 m, que também corresponde a 9m²/planta, e nos espaçamentos 3 x 1 m e 6 x 0,5 m, correspondentes a 3m²/planta, que por sua vez se reuniram em um subgrupo dentro desta mesma categoria.

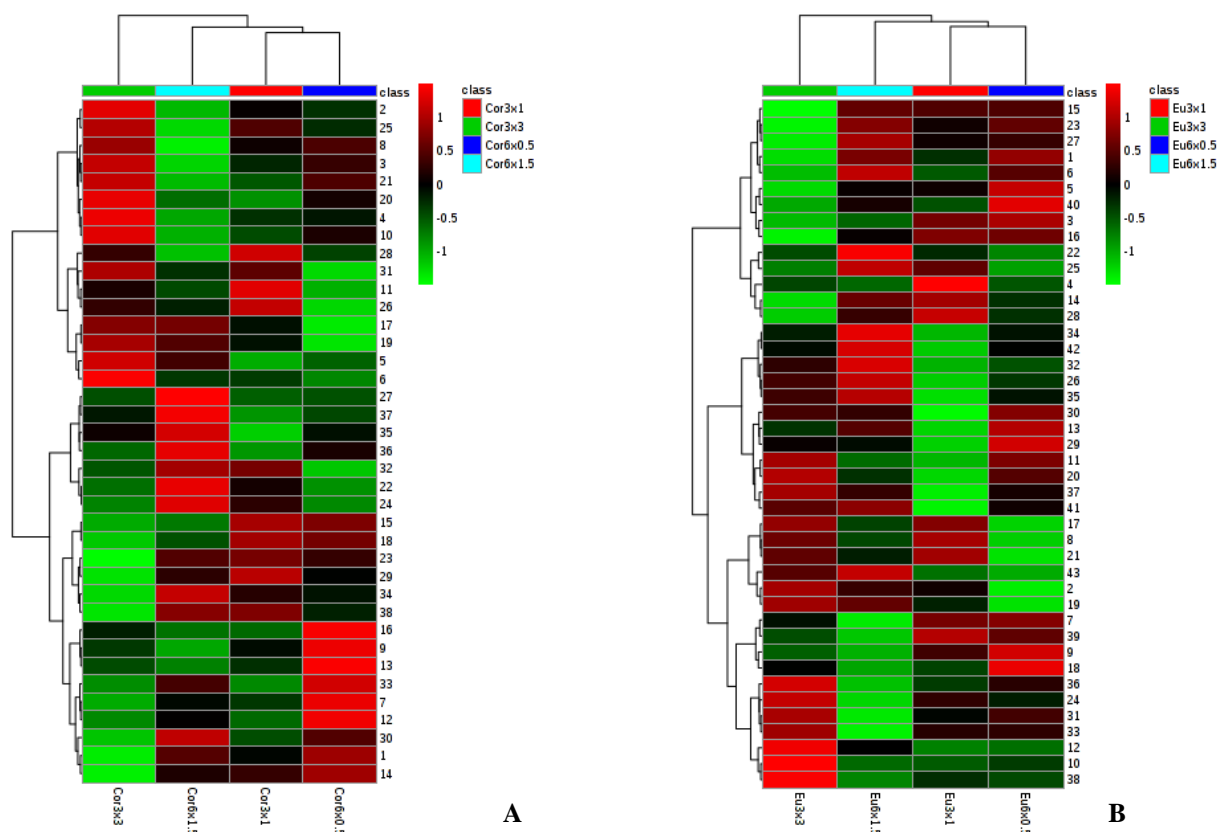


Figura 16 – *Heatmaps* da intensidade de bandas de proteínas do tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5) (FIGURA A) e do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) (FIGURA B). Geis obtidos por eletroforese 1-D (SDS-PAGE, gel 12%). Proteínas agrupadas considerando-se a distância euclidiana como medida de similaridade e o algoritmo de agrupamento ward. D. A barra à direita indica aumento (vermelho), redução (verde) e níveis sem mudanças significativas (preto) na intensidade das bandas de proteínas.

De modo geral, os extratos proteicos do tecido cambial dos clones cultivados nos espaçamentos 3 x 1 m e 6 x 0,5 m (3 m²) revelaram um maior número de bandas de proteína com menores intensidades. Logo, as bandas proteicas identificadas nas amostras de tecido cambial de clones cultivados nestes espaçamentos foram agrupadas, em relação às suas intensidades, em uma mesma categoria. Em contrapartida, um maior número de bandas com maiores intensidades foi observado nos espaçamentos 3 x 3 m e 6 x 1,5 m (9 m²). Embora apresentem a mesma área (m²), estes espaçamentos de plantio diferiram entre si em termos de distribuição espacial das árvores. Provavelmente, a proximidade entre as plantas na linha de plantio gerou uma alteração no ambiente e, consequentemente, uma maior competição entre as árvores por fatores ambientais em relação ao espaçamento 3 x 3 m. Neste sentido, o espaço mais reduzido entre clones pode estar relacionado ao fato de as bandas de proteínas identificadas nas amostras de tecido cambial de clones cultivados no espaçamento 6 x 1,5 m

terem sido agrupadas em uma categoria diferente daquelas identificadas nas amostras do tecido cambial de clones cultivados no espaçamento 3 x 3 m.

Estes resultados revelam que em resposta às alterações ambientais promovidas pelos diferentes espaçamentos de plantio, as árvores parecem ter adaptado seus processos fisiológicos às condições ambientais disponíveis, com reflexos na atividade cambial e na síntese de proteínas desta região. Como cada clone apresenta a mesma constituição genética e mesma idade, o fator ambiental, determinado pelos espaçamentos de plantio, possivelmente, promoveu agrupamento observado para as bandas de proteínas. Deste modo, para se ter uma visão aprofundada do proteoma das condições estudadas e uma melhor interpretação dos resultados, os extratos proteicos das amostras de tecido cambial dos clones cultivados nos espaçamentos 3 x 3 m e 6 x 0,5 m, representativos do maior e menor espaço vital de crescimento de plantas, respectivamente, foram escolhidos para a etapa de identificação de proteínas por espectrometria de massas.

3.2 Identificação das proteínas

Neste estudo, o proteoma do tecido cambial dos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados nos espaçamentos 3 x 3 m e 6 x 0,5 m foi analisado mediante uma aproximação proteômica do tipo *shotgun*. Para isso, os peptídeos derivados da digestão trípica das bandas únicas de proteínas no gel de acrilamida (1-DE) foram submetidos a nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT). Este tipo de aproximação proteômica representa um dos mais recentes avanços no estudo de proteínas e tem sido amplamente empregada em sistemas biológicos como espécies modelos e cultivos agrônômicos (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009), contudo, foi pouco explorada em trabalhos com espécies florestais em geral, sendo quase inexistente para eucaliptos. A evolução desta técnica junto com o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas representa uma alternativa às aproximações proteômicas convencionais (CARMO *et al.*, 2016) e permite a identificação de um grande número de proteínas, sendo utilizada principalmente em espécies que possuem genoma sequenciado (CHAMPAGNE; BOUTRY, 2013).

Recentemente, algumas espécies do gênero *Eucalyptus* foram reclassificadas no novo gênero *Corymbia*. Devido ao pouco conhecimento acerca deste novo gênero e a sua semelhança com o gênero *Eucalyptus* ambos são comumente denominados “eucaliptos” (HILL; JOHNSON, 1995). Por sua vez, o genoma de *Eucalyptus grandis*, além de apresentar um tamanho de moderado a pequeno para plantas em geral, conta com uma sequência completa de

alta qualidade (MYBURG *et al.*, 2014) e representa um importante recurso genético para estudos de expressão gênica. Segundo Chin & Tan (2018) a disponibilidade de informações genômica facilita a identificação de proteínas. Dada a proximidade entre os gêneros e a existência deste referencial genômico, neste trabalho, optou-se por empregar o genoma de *Eucalyptus grandis* como referência para a identificação de proteínas do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp..

A realização das identificações por comparação dos dados de MS² obtidos em relação às três bases de dados específicas de *Eucalyptus grandis* favoreceu a obtenção e a exploração do proteoma dos clones estudados. No total, foram identificadas 4409 espécies proteicas, das quais 2547 se ajustaram aos parâmetros de confiança previamente estabelecidos (*score* maior que 2, porcentagem de cobertura maior que 10 % e a identificação de, no mínimo, 2 peptídeos).

A figura 17 representa o diagrama de Venn das 2547 proteínas identificadas, compartilhadas e exclusivas, nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* empregadas. Deste total, 2202 proteínas foram identificadas nas três bases de dados utilizadas, sendo que a base de dados do NCBI foi a que exibiu o maior número de proteínas exclusivas (324 proteínas), seguida da base de dados do Phytozome, com apenas 1 proteína exclusiva. Não foram identificadas proteínas exclusivas da base de dados do UniProt.

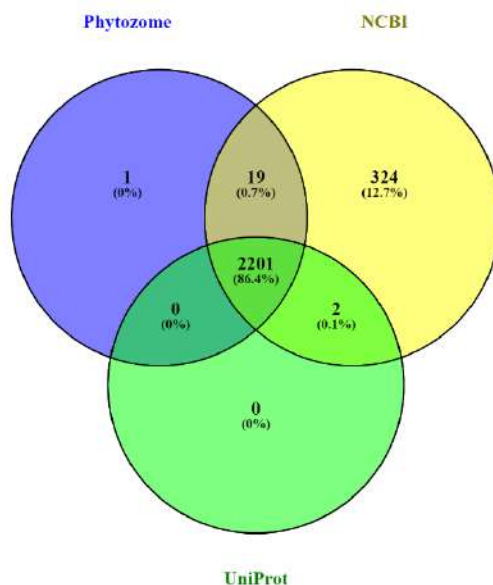


Figura 17 – Diagrama de Venn das 2547 proteínas do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em dois espaçamentos de plantio (3 x 3 m e 6 x 0,5 m) identificadas em três bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt). Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST. Os diagramas foram traçados usando Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

De modo geral, as bases de dados do Phytozome e do UniProt identificaram praticamente o mesmo número de proteínas. Entretanto, 19 proteínas identificadas nas bases de dados do Phytozome e outras 2 proteínas identificadas na base de dados do UniProt também foram identificadas na base de dados do NCBI, sendo este o banco de dados mais representativo para a identificação de proteínas do tecido cambial dos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.

Outro diagrama de Venn foi construído considerando-se o número total de proteínas identificadas individualmente no tecido cambial de cada clone cultivado em cada espaçamento de plantio empregando-se as três bases de dados de *Eucalyptus grandis* (FIGURA 18). O número de proteínas do tecido cambial identificadas foi igual a 1949 para o clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m, 1923 para o clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m, 2261 para o clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m e 2153 para o clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m.

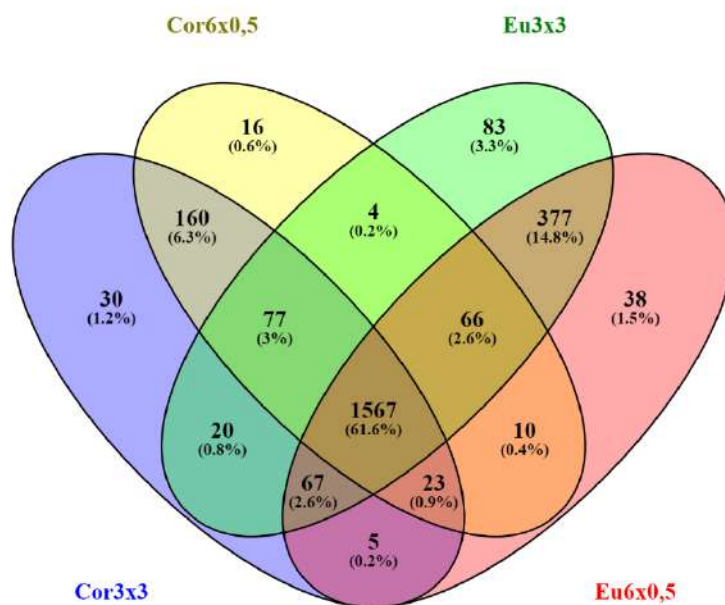


Figura 18 – Diagrama de Venn das 2547 proteínas do tecido cambial, compartilhadas e específicas, de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio. Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt). Os diagramas foram traçados usando Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Grande parte das proteínas identificadas em cada amostra de tecido cambial avaliada foi compartilhada entre os tratamentos (clones e espaçamento de plantio). No entanto, 206 proteínas foram identificadas exclusivamente no tecido cambial dos clones de *Corymbia*

spp.. Deste total, 16 proteínas foram identificadas no tecido cambial do clone cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m e 30 proteínas foram identificadas no tecido cambial do clone cultivado no espaçamento 3 x 3 m. Em relação aos clones de *Eucalyptus* spp., 498 proteínas foram identificadas unicamente no tecido cambial deste genótipo, sendo que, deste total, 38 proteínas foram identificadas no tecido cambial do clone cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m e 83 proteínas foram identificadas no tecido cambial do clone cultivado no espaçamento 3 x 3 m.

De modo geral, os resultados revelaram um maior número de proteínas identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m, indicativo da provável influência de um maior espaço vital para crescimento de plantas sobre a regulação de proteínas. Ademais, foi identificado um maior número de proteínas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp., independente do espaçamento de plantio adotado.

3.3 Análise global das proteínas

Do total de 2547 espécies proteicas identificadas, a análise de variância (ANOVA) realizada, detectou 1731 proteínas com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em relação aos clones e aos espaçamentos de plantio avaliados.

A modelagem de variações espaciais em sistemas biológicos possibilita a compreensão de respostas a perturbações externas e/ou processos endógenos relacionados ao desenvolvimento (RANTALAINEN *et al.*, 2008; LANDER, 2014). Neste estudo, a semelhança intergrupar entre as proteínas diferenciais encontradas foi verificada através das análises de componentes principais e de agrupamento hierárquico com base nas suas abundâncias. Os resultados indicaram que existiu uma modulação diferencial da abundância de proteínas identificadas em função dos clones e dos espaçamentos de plantio avaliados.

Na primeira etapa de avaliação dos dados, a análise de componentes principais revelou que o primeiro componente (PC1) claramente separou o grupo de proteínas identificadas no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. daquele identificado no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. e correspondeu a 76% da variabilidade experimental. Já o segundo componente principal (PC2) separou o grupo de proteínas identificadas em cada clone em diferentes espaçamentos de plantio e correspondeu a 11% da variabilidade experimental. Ambos os componentes explicaram 87% da variabilidade total do experimento (FIGURA 19). As amostras de tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. foram agrupadas nos quadrantes esquerdos, enquanto as amostras do clone de *Eucalyptus* spp. foram agrupadas nos quadrantes

direitos. Simultaneamente, amostras de tecido cambial de clones cultivados no espaçamento 3 x 3 m agruparam-se nos quadrantes inferiores, enquanto amostras de tecido cambial de clones cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m agruparam-se nos quadrantes superiores.

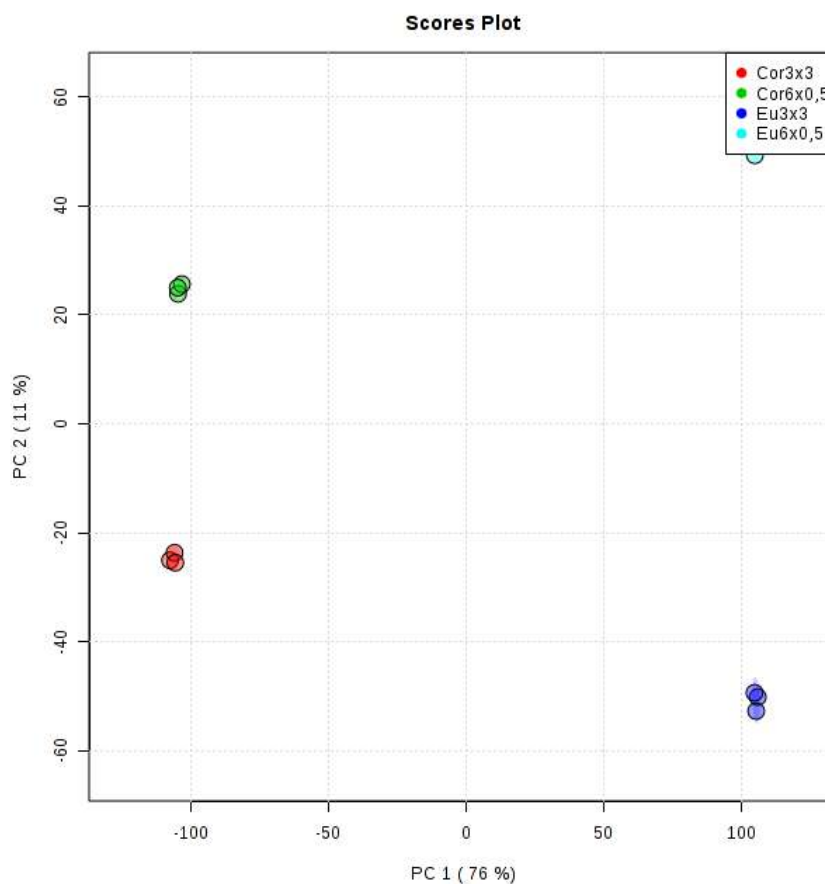


Figura 19 – Análise de componentes principais do proteoma do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio. Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5).

O dendrograma (FIGURA 20), gerado pela análise de agrupamento hierárquico, separou as proteínas identificadas em dois grupos, diferenciados pelos materiais genéticos avaliados. Em cada grande grupo, as proteínas foram divididas em subgrupos, definidos pelos espaçamentos de plantio. Ressalta-se que o padrão de dados das réplicas biológicas para cada uma das condições experimentais avaliadas indicou a reprodutibilidade do ensaio e revelou tendências claras de agrupamento em função de clones e espaçamentos de plantio.

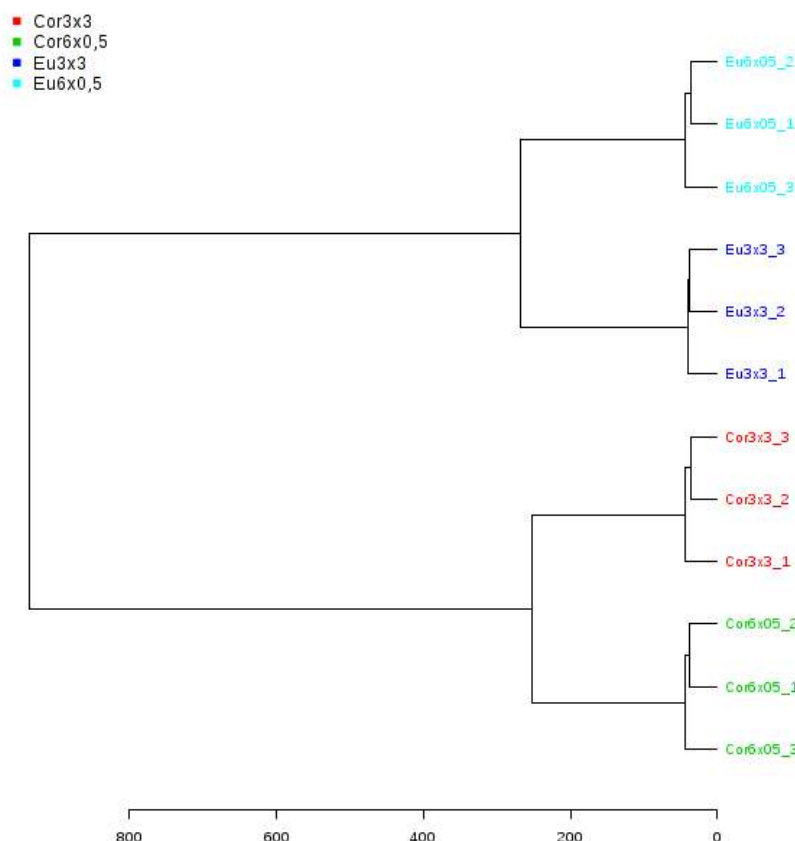


Figura 20 – Dendrograma representando o agrupamento hierárquico do proteoma do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio. Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). As proteínas foram agrupadas de considerando-se a distância euclidiana, como medida de similaridade, e o algoritmo de agrupamento ward D.

Os resultados do agrupamento hierárquico também foram observados através do *heatmap*, que evidenciou a abundância das espécies proteicas entre os clones e os diferentes espaçamentos de plantio (FIGURA 21). De modo geral, o clone de *Eucalyptus* spp. apresentou um perfil de regulação proteica diferente daquele observado para o clone de *Corymbia* spp., indicativo da existência de diferenças genéticas entre os clones. Simultaneamente, observou-se que tanto o clone de *Eucalyptus* spp. quanto o clone de *Corymbia* spp., quando cultivados no espaçamento mais reduzido demonstraram um perfil de regulação proteica diferente do que quando cultivados no espaçamento mais amplo.

Pelo *heatmap* foi possível verificar a existência de subgrupos específicos de proteínas que apresentaram alterações significativas em suas abundâncias em função dos espaçamentos de plantio, considerando-se o agrupamento principal, definido pelos materiais genéticos. A análise destes subgrupos revelou a ocorrência de genes *up* e *down* regulados

codificantes de proteínas exclusivamente em clones de *Eucalyptus* spp. e/ou *Corymbia* spp. cultivados em um determinado espaçamento frente aos demais tratamentos. Como os clones apresentam a mesma constituição genética e mesma idade, o fator ambiental, definido pelos espaçamentos de plantio, foi determinante para a regulação diferencial das proteínas identificadas no tecido cambial de cada genótipo avaliado.

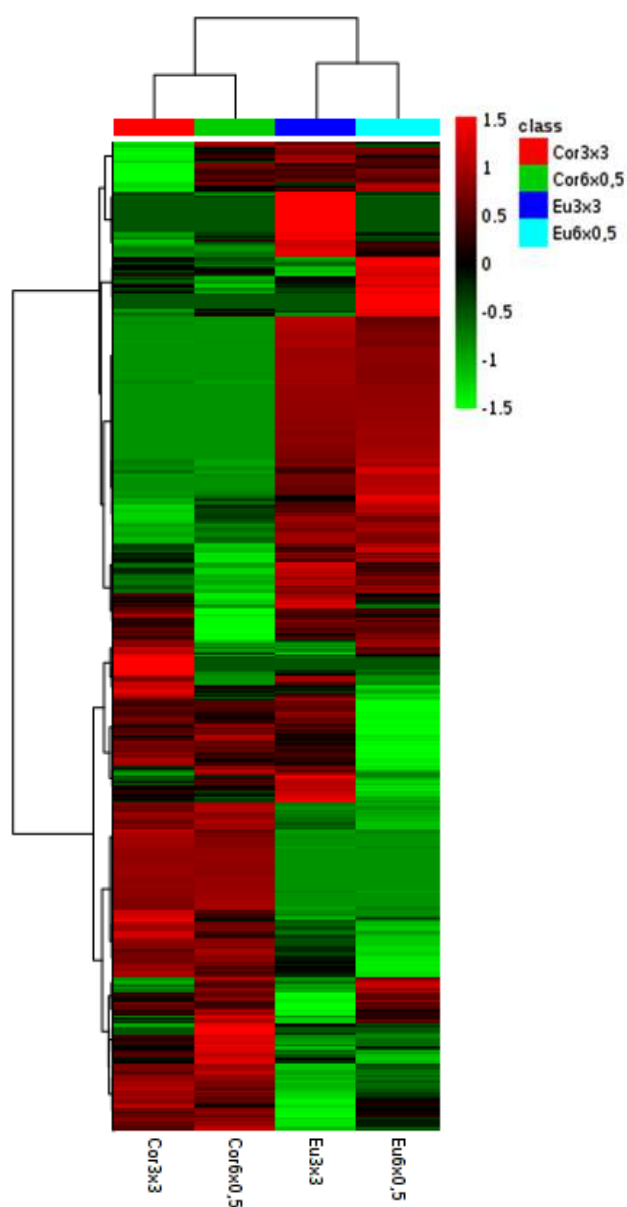


Figura 21 – Heatmap representando o agrupamento hierárquico do proteoma do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio. Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). As proteínas foram agrupadas segundo a distância euclidiana, como medida de similaridade, e o algoritmo ward. A cor vermelha indica aumento da expressão gênica e a cor verde indica redução, enquanto os tons escuros indicam níveis de expressão semelhantes.

O crescimento de uma árvore ocorre em resposta a processos naturais de vida e aos estímulos ambientais (HUSCH *et al.*, 1982) sendo, portanto, dependente de fatores como temperatura, umidade, vento, luz e nutrientes, espaço físico, fatores edáficos e topográficos, além de características genética das mesmas e fatores de competição (POORTER; BANGERS, 1993; ZANON; FINGER, 2010). Tais elementos refletem na atividade cambial e, conseqüentemente, no crescimento da árvore e na formação da madeira.

Trabalhando na mesma área experimental onde foi coletado o tecido cambial usado nestas análises proteômicas, Lopes (2017) observou que o cultivo dos clones em espaçamentos menos adensados resultou em valores de diâmetro a altura do peito (DAP) superiores em relação ao cultivo nos espaçamentos mais adensados aos 24 meses de idade. O autor também registrou uma relação inversamente proporcional entre os valores de volume por hectare e o aumento do espaçamento de plantio. Já a altura das plantas não sofreu influência da redução dos espaçamentos de plantio. De modo geral, o clone de *Eucalyptus* spp. apresentou maiores valores para estas características dendrométricas (TABELA 6, TABELA 7).

Tabela 6 – Valores do diâmetro à altura do peito (DAP), altura total (Ht) e volume com casca de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. aos 24 meses, em função dos espaçamentos.

Variáveis	Espaçamentos (m x m)		
	3 x 3	3 x 1,5	3 x 1
DAP 24 meses	7,96	6,52	6,01
Altura 24 meses	9,72	9,76	9,74
Volume/hectare 24 meses	29,58	42,12	54,72

Fonte: LOPES, 2017.

Tabela 7 – Valores do diâmetro à altura do peito (DAP), altura total (Ht) e volume com casca de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. aos 24 meses, em função dos clones. (LOPES, 2017).

Variáveis	Clones	
	<i>Eucalyptus</i> spp.	<i>Corymbia</i> spp.
DAP 24 meses (cm)	7,13	6,63
Altura 24 meses (m)	10,19	9,81
Volume/hectare 24 meses	47,97	42,19

Fonte: LOPES, 2017.

Em relação às propriedades físicas e químicas da madeira, foi verificado o efeito da interação clone vs. espaçamento de plantio para algumas variáveis analisadas, demonstrando sua influência na qualidade da biomassa florestal. Quanto ao teor de celulose da madeira, observou-se que no espaçamento 3 x 1 m os clones apresentaram valor superior para esta variável, principalmente o clone de *Eucalyptus* spp. Para o teor de hemicelulose, o maior valor foi registrado para os clones cultivados no espaçamento 3 x 1 m, destacando-se o clone de *Corymbia* spp. Do mesmo modo, maior valor para o teor de holocelulose foi observado para

este clone, cultivado no espaçamento mais adensado. Em relação ao teor de lignina da madeira, observou-se o efeito de clone dentro dos espaçamentos, sendo as maiores médias atribuídas ao clone de *Eucalyptus* spp., cultivado nos espaçamentos menos adensados. O clone de *Corymbia* spp. apresentou valores superiores aos observados no clone de *Eucalyptus* spp. para a densidade básica. Quanto às estimativas de massa seca, de carbono, de lignina e quantidade de energia disponível por unidade de área foi observado um aumento destas variáveis com o adensamento dos espaçamentos de plantio, sendo os maiores valores observados para o clone de *Corymbia* spp., exceto em relação á lignina, cujos maiores valores foram registrados para o clone de *Eucalyptus* spp. (TABELA 8). De modo geral, estes resultados indicaram que clones cultivados em espaçamentos de alta e média densidade de plantio apresentam características desejáveis principalmente para uso energético, sobretudo o clone de *Corymbia* spp..

Tabela 8 – Valores médios de algumas características da madeira de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. aos 24 meses, cultivados em diferentes espaçamentos.

Variável	Clones	Espaçamentos (m x m)		
		3 x 3	3 x 1,5	3 x 1
Celulose da madeira (%)	<i>Eucalyptus</i> spp.	39,92	41,33	42,29
	<i>Corymbia</i> spp.	36,12	38,81	39,35
Holocelulose da madeira (%)	<i>Eucalyptus</i> spp.	67,33	68,35	69,91
	<i>Corymbia</i> spp.	65,00	69,67	70,39
Lignina da madeira (%)	<i>Eucalyptus</i> spp.	23,11	23,14	21,47
	<i>Corymbia</i> spp.	17,72	17,21	17,28
Densidade básica da madeira (g.cm ⁻³)	<i>Eucalyptus</i> spp.	0,4451	0,4487	0,4528
	<i>Corymbia</i> spp.	0,6195	0,5998	0,5766
Massa seca da madeira (t.ha ⁻¹)	<i>Eucalyptus</i> spp.	14,54	18,56	22,27
	<i>Corymbia</i> spp.	13,76	20,26	26,05
Massa de carbono da madeira (t.ha ⁻¹)	<i>Eucalyptus</i> spp.	6,86	8,75	10,25
	<i>Corymbia</i> spp.	6,31	9,29	11,93
Massa de lignina da madeira (t.ha ⁻¹)	<i>Eucalyptus</i> spp.	3,34	4,28	4,76
	<i>Corymbia</i> spp.	2,42	3,47	4,48
Energia da madeira (kW.h. ha ⁻¹)	<i>Eucalyptus</i> spp.	74748	97353	115722
	<i>Corymbia</i> spp.	72613	108119	135215

Fonte: LOPES, 2017.

As proteínas identificadas no tecido cambial dos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. podem ter sido reguladas em função das características genéticas, bem como dos espaçamentos entre plantas (3 e 0,5 m) e entre linhas (3 e 6 m) e da densidade de plantio, definida como sendo a quantidade de árvores por área (árvores/ha). Neste sentido, diferentes condições ambientais, determinadas pelo espaçamento e pela densidade, parecem ter contribuído para a indução da ativação de mecanismos adaptativos e aclimatativos, que provocaram a reorganização do proteoma em função destas variantes. Comportamentos produtivos diferenciados são observados em função do uso de espaçamentos mais ou menos

adensados em uma determinada área devido à competição por espaços, água, luminosidade e nutrientes (ZANINE; SANTOS, 2004). Esta reorganização pode ter influenciado os processos fisiológicos, celulares e moleculares que resultaram na obtenção de diferentes características dendrométricas e propriedades da madeira para cada clone cultivado em determinado espaçamento de plantio, conforme observado. Tais resultados corroboram com a hipótese de que a expressão gênica modula a formação do lenho quando *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. são cultivados em diferentes espaçamentos.

Diversos estudos destacam o papel de proteínas na atividade cambial dos eucaliptos em função de diferentes condições ambientais (ANDRADE, 2006; CELÉDON, 2006; MEIRELES, 2006; PEREIRA, 2007; BRITTO *et al.*, 2012; BUDZINSKI, 2012; COSTA, 2017). Análises como essas permitem uma interpretação mais holística dos perfis e processos envolvidos no desenvolvimento do câmbio, o que é essencial para compreensão de como ocorre a formação da madeira. As indicações das proteínas com regulação diferencial entre os diferentes clones e espaçamentos de plantio avaliados, bem como das diferentes funções biológicas dos vários grupos de proteínas identificados neste trabalho que parecem participar dos processos de formação da madeira foram discutidas mais detalhadamente nas seções seguintes.

3.4 Proteínas com regulação diferencial

Para a determinação de alterações na regulação de proteínas foram realizadas seis análises comparativas pareadas (Eu3x3 vs Eu6x0,5, Cor3x3 vs Cor6x0,5, Eu3x3 vs Eu6x0,5, Cor3x3 vs Cor6x0,5, Eu3x3 vs Cor6x0,5; Cor3x3 vs Cor6x0,5). A análise quantitativa das 1731 proteínas com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos identificou 1484 proteínas não redundantes e diferencialmente reguladas, considerando-se aquelas com *fold-change* entre 2 e 0,5. Todas estas proteínas, bem como a categorização funcional e a regulação de cada uma delas frente a um determinado contraste estão descritas no Apêndice A, nas Tabelas 1 a 16. Nas tabelas, o valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador”. Já o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Desse total, 540 proteínas estavam devidamente anotadas nas bases de dados de *E. grandis* e tiveram suas sequências recuperadas do Uniprot através da ferramenta RetrieveID. As demais, 944 proteínas, estavam anotadas como “não caracterizadas” ou “hipotéticas”. Para

a identificação de possíveis homólogos, as sequências destas proteínas foram submetidas ao programa Sma3s e, utilizando-se uma estratégia de busca de similaridade contra a base de dados não redundantes UniRef90, retiradas do servidor UniProt, foram encontrados *hits* com a espécie *Arabidopsis thaliana* (QUADRO 1, APÊNDICE A).

Via de regra, o uso de base de dados específicas melhora a qualidade da identificação de proteínas (ROMERO RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Ressalta-se que o repertório de proteínas do tecido cambial identificadas apresentou um grande número de sequências comuns entre os clones avaliados. Entretanto, embora tenha sido encontrado um número razoável de proteínas com regulação diferencial entre os tratamentos e com anotação disponível, a maior parte delas encontravam-se apenas descritas nas bases de dados. Este problema pode ser compreendido se consideramos que até fevereiro de 2019, cerca de 146.000.000 de sequências de proteínas anotadas automaticamente e não revisadas foram depositadas na base de dados mais completa e melhor anotada da atualidade (UniProtKB), enquanto cerca de 560.000 foram manualmente anotadas e revisadas. Para *Eucalyptus*, apenas 113 sequências de proteínas foram revisadas, enquanto 54.113 permanecem sem revisão, sendo que parte delas não apresenta anotação.

As informações das anotações das proteínas permitem a compreensão das suas funções moleculares e biológicas (SHEKHAR *et al.*, 2016) e foram fundamentais para a caracterização funcional das proteínas do tecido cambial que apresentaram regulação diferencial em função dos clones e dos espaçamentos de plantio avaliados neste estudo.

3.4.1 Categorização funcional das proteínas com regulação diferencial

A escolha do espaçamento de plantio apropriado é um dos principais aspectos considerados no manejo de povoamentos florestais dada a sua influência no crescimento individual e em conjunto das plantas (STAPE, 2010). Sabe-se que modificações no padrão de crescimento de uma árvore podem provocar alterações na qualidade da madeira. Geralmente, a adoção de espaçamentos de plantio mais amplos impede a ocorrência de mudanças severas nas condições de luminosidade, umidade e competição entre as árvores, evitando alterações bruscas nas características da madeira (ZOBEL, 1992). Ao passo que as condições ambientais para o crescimento das árvores divergem daquelas consideradas ótimas, uma série de respostas adaptativas, incluindo modificações fisiológicas, celulares e moleculares, se iniciam no interior da planta a fim de garantir o desenvolvimento mínimo esperado em uma condição considerada estressante, como as observadas em espaçamentos de plantio mais adensados.

Pesquisas genéticas com espécies florestais estão concentradas, especialmente, no estudo de marcadores moleculares possivelmente relacionados ao crescimento, produtividade e resposta das árvores a fatores ambientais. De modo complementar, a proteômica tem sido empregada para a melhoria no entendimento das bases moleculares relacionadas a estes processos, contribuindo para o subsequente desenvolvimento de programas de melhoramento genético (ABRIL *et al.*, 2011; CÁNOVAS *et al.*, 2004; JORRÍN-NOVO *et al.*, 2007). Entretanto, conclusões biológicas de dados proteômicos são restritas e especulativas, sendo necessário fornecer um significado biológico aos resultados, bem como destacar o subconjunto de proteínas de interesse para a validação funcional (CARMO *et al.*, 2016).

A fim de se obter uma visão geral do proteoma do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos, bem como uma melhor interpretação biológica dos resultados encontrados, as sequências das 1484 proteínas com regulação diferencial e diferença significativa entre os tratamentos foram classificadas de acordo com as categorias funcionais do programa MERCATOR. A partir do arquivo de mapeamento gerado pelo MERCATOR, as proteínas identificadas foram atribuídas aos 16 processos biológicos principais da base de dados KEGG (FIGURA 22). É importante ressaltar que o grande número de proteínas identificadas foi, possivelmente, devido ao uso do poderoso instrumento analisador de massas LQT-Orbitrap (KALLI *et al.*, 2013) e a pesquisa em bancos de dados específicos de *Eucalyptus* realizada neste estudo.

Os grupos funcionais mais representativos estavam relacionados aos processos biológicos de transcrição e tradução (234 proteínas), processos celulares (138 proteínas) e de enrolamento, direcionamento e degradação de proteínas (107 proteínas). Outras vias menos representadas foram as relacionadas ao metabolismo de carboidratos (79 proteínas), seguida de sinalização (77 proteínas), metabolismo secundário (71 proteínas), metabolismo de aminoácidos (66 proteínas), defesa e estresse (60 proteínas), metabolismo de lipídios (54 proteínas), outros metabolismos (49), reações de oxirredução (redox) (46 proteínas), metabolismo energético (27 proteínas), transporte (20 proteínas), fotossíntese (24). As demais proteínas foram atribuídas a outras funções (253 proteínas) ou não foram classificadas em nenhuma das vias consideradas (196 proteínas). A identificação, a descrição, bem como a classificação de acordo com a base de dados KEGG destas proteínas estão disponíveis nas Tabelas 1 a 16 do Apêndice A.

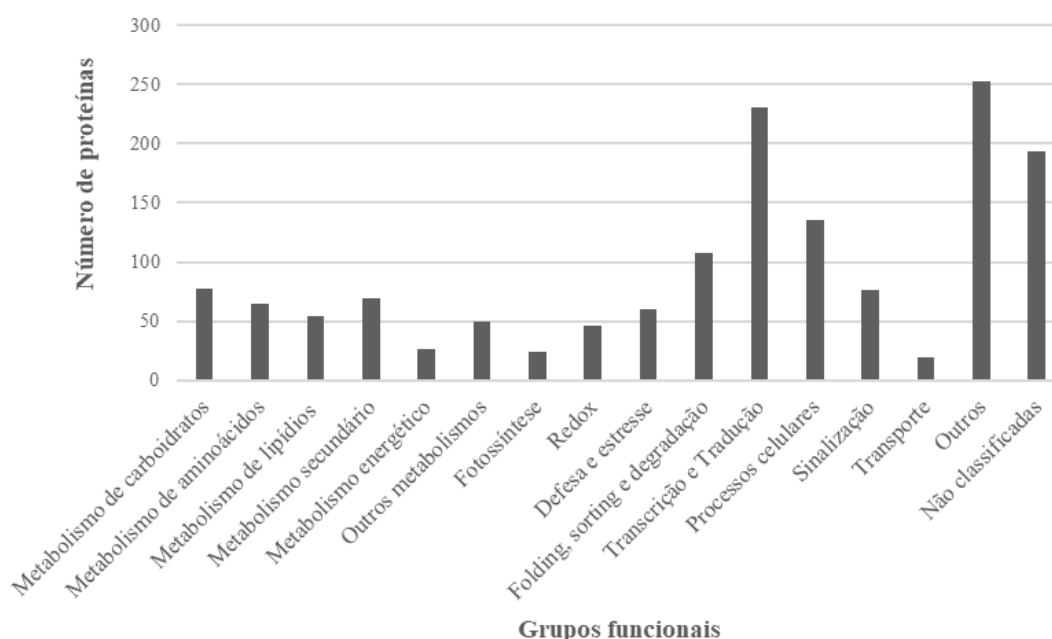


Figura 22 – Classificação funcional das 1484 proteínas do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio (3 x 3 m e 6 x 0,5 m), com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* igual a 2. Proteínas identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida na base dados KEGG.

O espaçamento de plantio pode agravar possíveis efeitos causados por condições ambientais estressantes, como o déficit nutricional e hídrico (MORAIS *et al.*, 1990). No entanto, tais condições só são consideradas desfavoráveis quando a produção de energia pela planta é insuficiente para a sua sobrevivência. Em contrapartida, podem ser importantes para o desenvolvimento vegetal considerando-se que, sem causar danos, podem intensificar o metabolismo e a atividade fisiológica da planta. Em situações como essa, para garantir o equilíbrio entre ganho e sobrevivência, diferentes processos são modificados a partir de alterações da expressão gênica vegetal. Esta estratégia molecular inclui primeiramente o reconhecimento do sinal ambiental. Em seguida, a transdução de sinais consiste em vias de sinalização da homeostase iônica e osmótica, vias de resposta a desintoxicação e vias de regulação do crescimento vegetal (ZHU, 2002).

Há crescentes evidências de que a sinalização intracelular no tecido cambial das árvores fornece novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de formação da madeira. Uma grande diversidade de propriedades como densidade, rigidez, estabilidade, presença de nós, cerne, bolsas de resina, teor de lignina, teor de extrativos e outros múltiplos outros fatores intrínsecos a esta matéria prima são caracterizadas pela alteração na expressão de múltiplos genes envolvidos na xilogênese. Em cada etapa, a

expressão ordenada de famílias de genes é regulada por sinais do ambiente e do desenvolvimento da planta, influenciando a composição e a morfologia da parede celular das células do xilema, que é o elemento mais importante na determinação da biomassa lignocelulósica (MEGRAW, 1985).

Os genes ativados em resposta a uma condição ambiental e ou a fase de desenvolvimento vegetal podem ser divididos em dois tipos principais em termos de produtos proteicos (SHAO *et al.*, 2007). Um grupo desses genes é o que codifica produtos que conferem resistência a uma condição considerada estressante, como proteínas de resposta a síntese metabólica, estabilizadoras de membrana, antioxidantes, detoxificantes e osmoprotetores (GRENNAN, 2006), promovendo o ajuste do meio celular e a tolerância da planta (LIU; BUSH, 2006). Os outros são aqueles cujos produtos codificantes desempenham um importante papel na expressão gênica e na transdução de sinais, como os fatores de transcrição (FTs).

Segundo SHAO *et al.* (2007), os FTs são definidos como proteínas combinadas com a sequência de DNA especializado de promotores eucarióticos ou com características estruturais da região de combinação de DNA conhecida, que atuam na ativação e supressão do efeito transcricional dos genes correspondentes (BEER; TAVAZOIE, 2004). Entre estes genes estão os de resposta às condições ambientais. A interação entre os FTs e os elementos regulatórios nas regiões promotoras destes genes promove o aumento da regulação da expressão e, conseqüentemente, tem-se uma maior eficiência das plantas em termos de tolerância a uma possível condição de estresse (AGARWAL; JHA, 2010). Ressalta-se que a regulação da expressão gênica por FTs controla diferentes processos biológicos, como o progresso do ciclo celular, equilíbrio metabólico e fisiológico, além de respostas a estímulos ambientais (RIECHMANN *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2011; MORENO-RISUENO *et al.*, 2012).

No proteoma dos clones avaliados foram detectados cinco FTs *up*-regulados, preferencialmente, no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (FTs das famílias *LIM*, *bZIP*, *SNF2*) e um preferencialmente *up*-regulado no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (FT *Winged-helix*). Os FTs da família *LIM* são importantes em processos relacionados a morfogênese, transdução de sinais e resposta a estresses (PENG *et al.*, 2012). Por sua vez, a família *SNF2* inclui proteínas FTs com papéis em processos celulares, manutenção da estabilidade cromossômica e diferentes aspectos do processamento de danos no DNA (EISEN *et al.*, 1995; RYAN; OWEN-HUGERS, 2011). Já os membros da família *bZIP* além de regularem processos biológicos relativos a defesa contra patógenos o controle de respostas à luz e estresse, atuam em processos como maturação de sementes e desenvolvimento floral, alongamento celular, desenvolvimento de órgãos, dentre outros

(JAKOBY *et al.*, 2002). Uma das proteínas FTs da família *bZIP* identificada neste estudo foi a *PosF21*, expressa constitutivamente em baixos níveis em mudas, raízes, caules e folhas de *Arabidopsis thaliana* (AESCHBACHER *et al.*, 1991). As FTs *Winged-helix* (WH), pertencem a um conjunto de fatores de dupla-hélice (HTH)⁴ e também são importantes na detecção e resposta a condições ambientais. Inicialmente considerados como domínios de ligação ao DNA, como o detectado neste estudo, o repertório de funções destas FTs foi expandido para as interações proteína-proteína e reconhecimento de RNA (TEICHMANN *et al.*, 2012).

Além dos fatores de transcrição, os microRNAs (miRNAs) também podem desempenhar um importante papel na resposta das plantas às condições ambientais (ZHANG *et al.*, 2006). Estas moléculas funcionam como guias no silenciamento gênico pós-transcricional, desempenhando um papel fundamental em diversas vias regulatórias que incluem o controle do tempo de desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular e desenvolvimento de órgãos (KIM, 2005). Via de regra, os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica pela degradação do RNA mensageiro (mRNA) em plantas, no entanto, esta regulação também pode ocorrer por repressão traducional (ZHANG *et al.*, 2007), dificultando a tradução do mRNA em proteínas. A literatura indica que algumas famílias de proteínas são elementos chaves na via de silenciamento mediada por mRNAs. Dentre as proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs estão as Argonautas (AGO). As AGO se ligam aos siRNA (RNA interferente pequeno) e miRNA e exibem atividade de endonuclease orientada contra a fita de mRNA complementar ao miRNA. Dez proteínas AGO já foram descritas em *Arabidopsis thaliana* e o que controla sua atividade e especificidade ao miRNA é a identificação do nucleotídeo na região 5'-terminal de pequenos RNAs. A proteína *AGO1*, que se liga à siRNAs com 5'-uracil, foi identificada proteoma dos clones avaliados e *up*-reguladas principalmente no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m. Estas proteínas estão associadas a diversas vias de regulação gênica e a AGO1 está relacionada, principalmente, no silenciamento gênico pós-transcricional.

A expressão gênica, bem como as interações entre os seus produtos proteicos conduziram a um padrão de resposta específico de cada clone frente aos espaçamentos de plantio em termos de propriedades da madeira observadas em campo.

Analisando-se as respostas dos clones obtidas em campo por Lopes (2017) e a regulação de proteínas do tecido cambial identificadas neste ensaio, foram observados indícios de alterações em importantes processos biológicos, possivelmente em função dos materiais genéticos e dos espaçamentos de plantio avaliados, que podem estar relacionadas com as propriedades da madeira dos clones estudados. Este fato pode ser confirmado através das

análises comparativas realizadas entre os diferentes tratamentos frente à cada um dos processos biológicos considerados pela classificação KEGG e pela detecção de proteínas exclusivas no tecido cambial de cada clone cultivado em um determinado espaçamento de plantio.

3.4.2 Processos biológicos das proteínas com regulação diferencial

Os processos biológicos das proteínas diferencialmente reguladas podem ser visualizados na Figura 23, nas comparações pareadas Eu3x3 vs. Eu6x0,5, Cor3x3 vs. Cor6x0,5, Eu3x3 vs. Cor3x3, Eu6x0,5 vs. Cor6x0,5, Eu3x3 vs. Cor6x0,5, Eu6x0,5 vs. Cor3x3.. As proteínas de cada processo biológico e a regulação de cada uma delas frente aos contrastes avaliados estão descritas nas Tabelas 1 a 16, do Apêndice A.

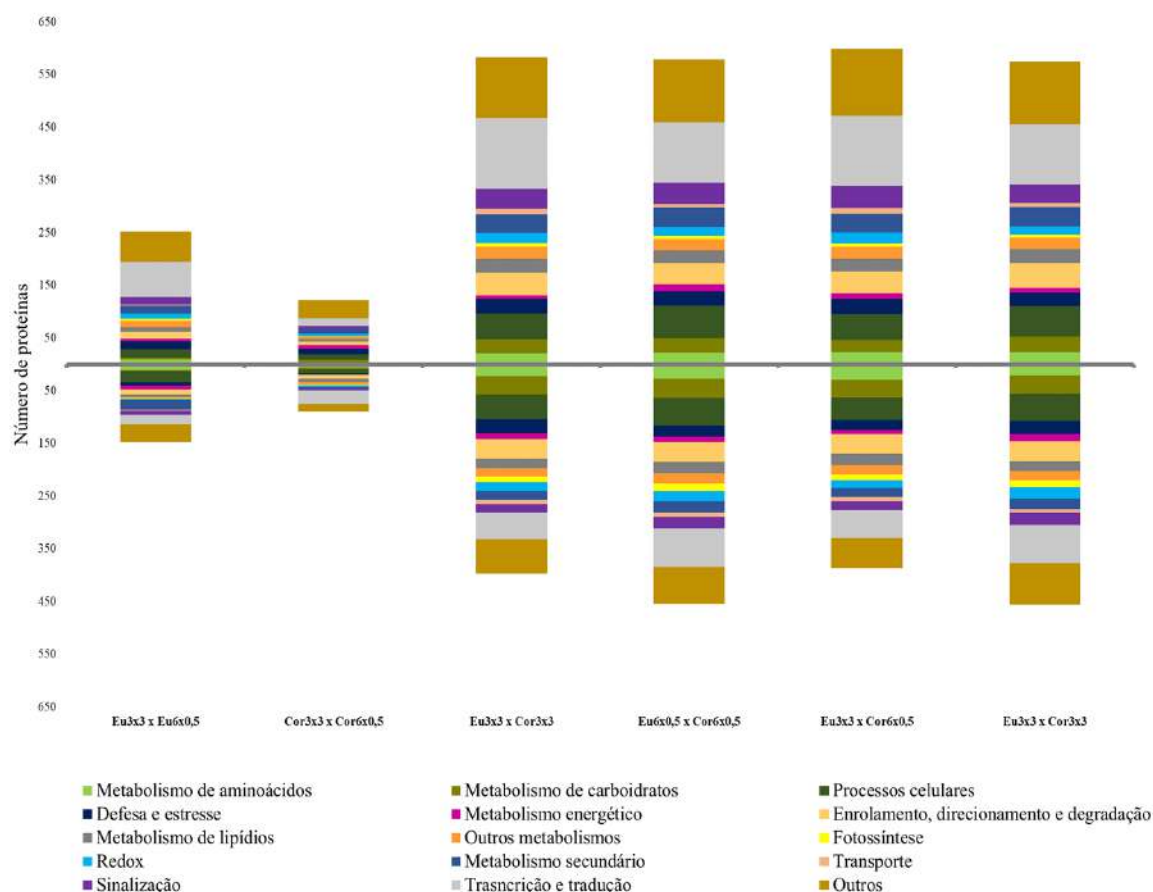


Figura 23 – Processos biológicos das proteínas do tecido cambial com regulação diferencial identificadas a partir das análises comparativas pareadas (Eu3x3 vs Eu6x0,5, Cor3x3 vs Cor6x0,5, Eu3x3 vs Cor3x3, Eu6x0,5 vs Cor6x0,5, Eu3x3 vs Cor6x0,5, Eu6x0,5 vs Cor3x3). Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* igual a 2, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida na base dados KEGG. Valores acima do eixo x representam o número de proteínas pertencentes a um determinado processo biológico *up*- reguladas no primeiro tratamento da análise comparativa e os valores abaixo do eixo x representam o número de proteínas pertencentes a um determinado processo biológico *up*- reguladas no segundo tratamento da análise comparativa.

Nas comparações Eu3x3 vs. Eu6x0,5 e Cor3x3 vs. Cor6x0,5 observou-se que o número total de proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas aumentou para clones cultivados no espaçamento 3 x 3 m, entretanto, o clone de *Corymbia* spp. apresentou um menor número de proteínas de modo geral. O número de proteínas induzidas nos tratamentos Cor3x3 e Cor6x0,5 foi igual a 149 e 107, respectivamente. Nos tratamentos Eu3x3 e Eu6x0,5 o número de proteínas induzidas foi igual a 303 e 172, respectivamente. Para Cor3x3 os processos que apresentaram um maior número de proteínas induzidas foram metabolismo de carboidratos; metabolismo energético; metabolismo secundário; defesa e estresse; redox e sinalização. Já para Cor6x0,5 destacaram-se os processos fotossíntese; metabolismo de lipídios; metabolismo de aminoácidos; processos celulares e transcrição e tradução. Para Eu3x3 os processos com um maior número de proteínas de resposta induzidas foram transcrição e tradução; sinalização; defesa e estresse; redox; enrolamento, direcionamento e degradação de proteínas; metabolismo de lipídios; metabolismo de carboidratos; outros metabolismos e fotossíntese. Finalmente, para Eu6x0,5 os processos que se destacaram foram metabolismo energético; metabolismo secundário; metabolismo de aminoácidos e processos celulares. O número de proteínas de resposta ao transporte foi igual em todos os tratamentos empregados em cada análise comparativa.

Nas comparações Eu3x3 vs. Cor3x3 e Eu6x0,5 vs. Cor6x0,5 foi possível observar que o número total de proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas diminuiu para o clone de *Corymbia* spp. em resposta ao clone de *Eucalyptus* spp. cultivados em ambos os espaçamentos. Para Eu3x3 vs. Cor3x3 foi registrada a indução de 688 proteínas em Eu3x3 e de 443 proteínas em Cor3x3. Já para Eu6x0,5 vs. Cor6x0,5 foi registrada a indução de 672 proteínas em Eu6x0,5 e de 502 proteínas em Cor6x0,5. Na comparação Eu3x3 vs. Cor3x3 registrou-se um aumento generalizado do número de proteínas induzidas nos processos de defesa e estresse; processos celulares; enrolamento, direcionamento e degradação proteica; metabolismo de lipídios; metabolismo secundário; outros metabolismos; sinalização e transcrição e tradução no clone de *Eucalyptus* spp. Os processos mais importantes para o clone de *Corymbia* spp., onde foram registrados um maior número de proteínas induzidas, foram metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, metabolismo energético e fotossíntese. Considerando-se a análise comparativa Eu6x0,5 vs. Cor6x0,5, também foi registrado um aumento na indução de proteínas de resposta aos processos de defesa e estresse; processos celulares; enrolamento, direcionamento e degradação de proteínas; metabolismo de lipídios; outros metabolismos; metabolismo secundário; sinalização e transcrição e tradução no clone de *Eucalyptus* spp.. Em adição, um maior número de proteínas de resposta ao

metabolismo energético foi observado para este clone. Os processos mais importantes para o clone de *Corymbia* spp. foram metabolismo de lipídios, de carboidratos e fotossíntese e redox.

Por fim, para as comparações Eu3x3 vs. Cor6x0,5 e Eu6x0,5 vs. Cor3x3, novamente registrou-se um maior número total de proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas no clone de *Eucalyptus* spp., independente do espaçamento de plantio adotado. Para Eu3x3 vs. Cor6x0,5 o número de proteínas induzidas foi igual a 708 em Eu3x3 e 426 em Cor6x0,5. Já para Eu6x0,5 vs. Cor3x3 foi registrada a indução de 669 proteínas em Eu6x0,5 e de 510 proteínas em Cor3x3. Na análise comparativa Eu3x3 vs. Cor6x0,5 foi observado um aumento no número de proteínas de resposta aos processos metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos e fotossíntese no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m. Já para o clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m observou-se um aumento no número de proteínas de resposta aos processos de defesa e estresse; processos celulares; metabolismo energético; enrolamento, direcionamento e degradação de proteínas, metabolismo de lipídios; metabolismo secundário; outros metabolismos; redox; transporte; sinalização e transcrição e tradução. Por outro lado, a análise comparativa Eu6x0,5 vs. Cor3x3 revelou um maior número de proteínas de resposta aos processos metabolismo de carboidratos, metabolismo energético, fotossíntese e redox no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m. Já para o clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m registrou-se um aumento no número de proteínas de resposta aos processos de defesa e estresse; processos celulares, enrolamento, direcionamento e degradação de proteínas; metabolismo de aminoácidos; metabolismo de lipídios; metabolismo secundário e outros metabolismos; transporte; sinalização e transcrição e tradução.

Os processos biológicos mais destacados nas comparações pareadas e com possíveis efeitos nas propriedades da madeira dos clones, bem como algumas vias metabólicas afins e proteínas neles identificados foram discutidos abaixo.

3.4.2.1 Defesa e estresse e reações de oxirredução (Redox)

Neste estudo, um aumento generalizado do número de proteínas do tecido cambial relacionadas aos processos de defesa e estresse e oxirredução (Redox) ocorreu para os clones cultivados no espaçamento 3 x 3 m. Esta resposta foi ainda mais destacada em clones de *Eucalyptus* spp. De modo geral, em espaçamentos mais amplos ocorre um elevado percentual de alocação de fotoassimilados para a produção de raízes (LELES, 1995). Possivelmente, o maior espaço vital de crescimento proporcionado por este espaçamento de plantio permitiu um

maior desenvolvimento radicular dos clones aos 24 meses de idade. O sistema radicular mais desenvolvido pode ter encontrado dificuldades ainda maiores dada as condições desfavoráveis típicas do sítio, com reflexos no aumento da regulação de proteínas de defesa e resposta ao estresse detectadas no tecido cambial. No caso dos clones cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m, é provável que a competição entre plantas tenha ocorrido mais precocemente devido as condições ambientais mais restritivas em função do adensamento do plantio ainda na fase inicial, levando a paralização do crescimento e ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos. Estes resultados indicam que, possivelmente, a adoção do espaçamento 6 x 0,5 m para os clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. permitiu o desenvolvimento de um sistema radicular bem distribuído em termos de volume no solo, suficientemente capaz de explorar o volume de solo disponível aos 24 meses de idade.

Ressalta-se que, em regiões de cerrado, como a em que o ensaio experimental encontra-se instalado, severas condições ambientais relativas principalmente às restrições hídricas e nutricionais são frequentemente observadas. Nestas áreas a água se torna um fator ainda mais limitante ao crescimento das árvores, refletindo na disponibilidade de nutrientes no solo, o que pode influenciar o comportamento das espécies (PEREIRA *et al.*, 1984), especialmente sobre as propriedades morfológicas e fisiológicas relacionadas aos mecanismos de resistência a seca (GONÇALVES *et al.*, 2000). Nestas condições, proteínas de resposta ao estresse e ao estímulo abiótico são comumente reguladas e garantem a resistência e a sobrevivência das plantas, agindo diretamente, ao combater um agente/fator agressor, ou indiretamente, garantindo a manutenção da estrutura e das funções celulares (MYSORE; RYU, 2004; JONES; DANGL, 2006).

Dentre as proteínas de resposta a defesa e estresse identificadas neste estudo destacaram-se as proteínas de choque térmico, conhecidas como *heat shock*. Estas proteínas atuam como chaperonas moleculares, promovendo o enrolamento adequado de proteínas o que favorece o funcionamento de células submetidas a condições estressantes (TAIZ; ZEIGER, 2002). Outras chaperonas moleculares identificadas foram as proteínas *Clp* e da família *BAG*. Estas proteínas promovem a recuperação celular pós estresse, reparando proteínas deformadas ou promovendo sua degradação (JOLLY; MORIMOTO, 2000). Também foram identificadas enzimas do tipo metiltransferases, que tem participação comprovada tanto na resposta ao estresse ambiental quanto na divisão celular (SCHAEFER *et al.*, 2008). Proteínas da família *Major latex protein* (MLP), também identificadas no proteoma do tecido cambial dos clones, estão comumente envolvidas nas respostas das plantas ao estresse (KIM *et al.*, 2005). Outra classe de proteínas de resposta ao estresse ambiental identificadas foi a das proteínas dirigentes

(DIR). Há evidências da indução da expressão de genes dirigentes por estresse, sugerindo a atuação das proteínas DIR nas respostas adaptativas das plantas, permitindo que estas se adaptem a condições ambientais dinâmicas (PANIAGUA *et al.*, 2017). Estas proteínas podem guiar a estereoquímica de um composto sintetizado por outras enzimas (TAIZ; ZEIGER, 2002). Sua associação com células lignificantes sugere que a formação da lignina depende da regulação de proteínas específicas que controlam a formação de ligações individuais. As proteínas DIR determinam o teor e tipo de monômeros fenólicos que devem ser incorporados, bem como o tipo de ligações estabelecidas pela orientação e especificidade dos seus locais (NOBREGA *et al.*, 2005). Neste sentido, genes codificantes de proteínas dirigentes são de interesse pois, possivelmente, associam-se com o início da formação da lignanas e ligninas no cerne, além disso, são ferramentas potenciais para a melhora da resistência das plantas ao estresse.

Via de regra, diferentes tipos de estresse, frequentemente, ocorrem de maneira simultânea e podem provocar o estresse oxidativo, que é caracterizado como sendo o desbalanço na relação entre a produção de compostos antioxidantes e oxidantes. A alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) prejudica a homeostase celular devido às reações que ocorrem entre estas moléculas e diferentes metabólitos, enzimas e ácidos nucleicos (CASSELLS; CURRY, 2001). Neste contexto, as plantas desenvolvem um complexo mecanismo de defesa antioxidante, composto por enzimas e metabólitos, que promove o reajuste do equilíbrio redox celular baseado na eliminação das ROS (DEWIR *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos sugerem que as moléculas ROS também podem atuar como sinalizadoras nos processos de desenvolvimento e crescimento celular (HUNG *et al.*, 2005; DEL RÍO *et al.*, 2006).

Uma das proteínas de resposta à reações de oxiredução (redox) identificadas neste estudo foi a *thioredoxin*, enzima antioxidante encontrada em vários organismos. Estas enzimas participam como redutase no controle redox (HOLMGREN, 1985) e em diversos outros processos celulares e várias vias biossintéticas (KUMAR *et al.*, 2004), conferindo as plantas capacidade para suportar diferentes estresse ambientais. Também há evidências da atuação destas proteínas como fator de crescimento (POWIS *et al.*, 2000). A *glutaredoxin*, também identificada neste estudo, atua de modo semelhante à *thioredoxin* controlando o potencial redox celular. Seu mecanismo de ação protege as células da inativação além de atuarem na sinalização redox (HOLMGREN, 2000; LILLIG *et al.*, 2008). Outras enzimas antioxidantes identificadas foram a *catalase* e a *peroxidase*, fundamentais para a redução de espécies reativas de oxigênio nas células submetidas às condições estressantes. As peroxidases, de modo particular, estão

envolvidas em diferentes processos fisiológicos, incluindo a lignificação da parede celular e a regulação da elongação celular (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). Também foram identificadas algumas proteínas da família *protein disulfide isomerase* (PDI), que além da atividade redox, desempenham funções como chaperonas moleculares (CAI *et al.*, 1994) e atuam particularmente no retículo plasmático.

3.4.2.2 Metabolismo secundário

O metabolismo secundário tem importância fundamental nos processos interativos entre as plantas e o ambiente. Os mecanismos de adaptação e defesa da planta incluem modificações no metabolismo celular vegetal, relacionados com alterações na atividade de enzimas importantes nos metabolismos primário e secundário. Diversos estudos sugerem que o metabolismo secundário é dominante nos processos relacionados a diferenciação celular do xilema, através do fornecimento de substrato para a biossíntese de substâncias secundárias, como ligninas e fenólicos da parede celular (FUJII *et al.*, 2012).

Um maior número de proteínas de resposta ao metabolismo secundário foi encontrado no clone de *Eucalyptus* spp., sobretudo quando cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m. Pode se esperar em consequência um incremento na biossíntese de lignanas e ligninas o que também consubstancia a suposição de que estas últimas participam do sistema de defesa vegetal (GOTTLIEB; YOSHIDA, 1989). De fato, um maior teor de lignina foi detectado na madeira do clone de *Eucalyptus* spp. avaliados a campo aos 24 meses de idade. Os lignóides estão entre os principais metabolitos secundários vegetais e atuam na parede celular de tecidos condutores e de suporte, atribuindo hidrofobicidade e resistência mecânica e a estresses bióticos e abióticos às plantas (VANCE *et al.*, 1980; LEWIS; YAMAMOTO, 1990; RAES *et al.*, 2003). Além disso, o teor de lignina na biomassa florestal está diretamente relacionado com seu poder calorífico, sendo um dos principais contribuintes do potencial energético dos biocombustíveis sólidos, graças a sua característica resistência térmica (LOPES, 2017). Sua composição e quantidade são influenciadas, dentre outros fatores, por condições ambientais e estágio de desenvolvimento (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). A modificação genética da biossíntese de lignina por meio da biologia molecular é de grande interesse, sendo a identificação da regulação diferencial destas proteínas no tecido cambial, possivelmente, um alvo chave para a engenharia genética com foco nos processos de formação das ligninas.

Dentre as proteínas identificadas no tecido cambial dos clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. está a *Phenylalanine ammonia lyase*, fundamental na biossíntese de

fenilpropanóides e relacionadas com a síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides. Esta enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em amônia e ácido *trans*-cinâmico, que pode ser incorporado a diferentes compostos fenólicos presentes na formação da lignina (STANGARLIN *et al.*, 2011), conferindo maior resistência à parede celular das plantas (NAKAZAWA *et al.*, 2001). Outra enzima essencial na via do metabolismo de compostos derivados dos fenilpropanóides identificadas neste estudo foi a *4-coumarato CoA ligase* (4-CL) (YUAN *et al.*, 2014). Também foi verificada a presença da álcool cinamílico desidrogenase (CAD) e da *cinnamoyl-CoA reductase*, enzimas chave na biossíntese de lignina (FEUILLET *et al.*, 1994) e da (+)-*pinoresinol reductase*, que atua na biossíntese de lignanas (NAKATSUBO *et al.*, 2008).

Outra proteína envolvida na biossíntese de lignina identificada foi a enzima *hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase* (HCT), que teve sua abundância aumentada em clones cultivados no espaçamento mais adensado. Além destas proteínas, também foram detectadas enzimas Cafeoil-CoA-o-metiltransferase (CCoAOMT) e ácido cafêico/ácido 3-hidroxiferúlico-o-metiltransferase (COMT), envolvidas na metilação da via de lignificação dos eucaliptos. A CCoAOMT, particularmente, também está envolvida na defesa de plantas. Os dados de proteoma obtidos também indicaram um acúmulo da enzima ácido ferúlico-5-hidroxilase (F5H) em clones cultivados no menor espaçamento. A F5H é importante na catalização da hidroxilação do ácido ferúlico, coniferaldeído e álcool coniferil, promovendo a biossíntese da lignina siringil (S) (KIM *et al.*, 2006).

A biossíntese de compostos de defesa e desenvolvimento vegetal também está associada ao metabolismo secundário. Além dos lignanos, os isoflavonóides participam ativamente destes processos. Isoflavonas redutases possuem um importante papel na sobrevivência e defesa vegetal (GANG *et al.*, 1999) e foram identificadas nesta via metabólica, principalmente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp..

3.4.2.3 Fotossíntese

Ainda que a resposta fotossintética não seja esperada em tecidos caulinares, caules jovens são fotossinteticamente ativos (COSTA, 2017). A região localizada entre o câmbio vascular e os tecidos constituintes da casca é rica em CO₂ (GARTNER, 1996; BUDZINSKI, 2012) e a presença de cloroplastos funcionais no clorênquima e nas camadas celulares mais internas permitem que espécies lenhosas utilizem o CO₂ para realizar fotossíntese (PFANZ *et*

al., 2002; BUDZINSKI, 2012). A assimilação do CO₂ ocorre por meio do ciclo de Calvin que funciona como ponto inicial para o metabolismo de carbono em plantas.

Neste estudo, proteínas relacionadas a fotossíntese foram identificadas como diferencialmente reguladas em função dos clones e do espaçamento de plantio. Um maior número de proteínas de resposta à fotossíntese, observado no clone de *Corymbia* spp., particularmente quando cultivados no espaçamento 6 x 0,5 m em comparação com todos os demais tratamentos, forneceu indícios de um maior estímulo do funcionamento do aparato fotossintético destes clones. Adicionalmente, o maior número de proteínas de resposta ao metabolismo de carbono (fotossíntese e metabolismo de carboidratos) indicou uma maior eficiência do fotossistema II (FSII) nestas condições.

Conforme observado por Lopes (2017), a quantidade de massa seca e de carbono aumentou com a diminuição do espaço vital de crescimento proporcionado pelo espaçamento 6 x 0,5 m, sendo os maiores valores observados para o clone de *Corymbia* spp. Estes resultados estão relacionados com o maior número de árvores por hectare e com a massa específica da madeira, cuja multiplicação pelo volume sólido fornece como resultado a massa seca. Neste sentido, os maiores valores de densidade básica da madeira atribuídos a estes clones refletiram diretamente na maior produção de massa seca. A variação observada para esta variável em função do espaço vital também pode ser verificada em função do espaçamento entre linhas (GOULART *et al.*, 2003). Possivelmente, o maior espaçamento entre linhas proporcionou melhores condições de luminosidade, favorecendo a atividade fotossintética dos clones. Ressalta-se que a atividade fotossintética resulta na conversão de energia solar em energia química que é fundamental para a produção vegetal, sendo a fotossíntese um processo primário na produção de biomassa. A quantidade de massa seca produzida depende do percentual de absorção e da eficiência do uso da energia absorvida durante este processo, influenciado, dentre outros fatores, pela fração de carbono fixado e também pela temperatura e radiação (GALLAGHER; BISCOE, 1978). A quantidade de energia produzida está diretamente relacionada com a massa seca, sendo que quanto maior a massa de madeira produzida, maior a quantidade de energia fornecida (STAMM, 1964; GOULART, 2003).

A melhora da capacidade fotossintética pode ser associada a acréscimos coordenados na atividade de várias enzimas do ciclo de Calvin identificadas, como a *fructose-bisphosphate aldolase*, a *phosphoglycerate kinase* e a *ribulose bisphosphate carboxylase*, importantes na assimilação do carbono, o que pode ter contribuído para o aumento da biossíntese de sacarose e da quantidade de fosfato disponível para o metabolismo das plantas. Também foram identificadas as proteínas *ATP synthase* e fator *HCF136* de estabilidade e

montagem do fotossistema II, do cloroplasto, o que sugeriu uma preservação da maquinária fotossintética. Outras proteínas relacionadas com a fotorrespiração identificadas e também diferencialmente reguladas principalmente no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento mais adensado foram a *glycine dehydrogenase* e as proteínas *P* e *H* do sistema *glycine cleavage*, atuantes em reações de descarboxilação, além da *aminomethyltransferase* e da *serine hydroxymethyltransferase*. Ainda em relação às proteínas envolvidas na via do carbono na fotorrespiração foi observado o acúmulo da enzima *glyoxylate/hydroxypyruvate reductase* no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m. O glioxilato, importante em células vegetais, pode desativar a rubisco e inibir sua ativação (CAMPBELL; OGREN, 1990), portanto, possui papel fundamental na regulação fotossintética (GIVAN *et al.*, 1992).

3.4.2.4 Metabolismo de carboidratos

A densidade básica da madeira é uma das características mais importantes das árvores e fornece indícios de suas estratégias de mecânicas e fisiológicas de desenvolvimento. Sua variação está ligada, dentre outros fatores, às variações na taxa de crescimento diametral da planta (CARLQUIST, 1975 ; PUTZ *et al.*, 1983), que por sua vez é influenciada por fatores ambientais característicos do local de crescimento. Neste sentido, diferenças edafoclimáticas possivelmente irão influenciar a densidade básica da madeira.

Geralmente, espécies de alta densidade apresentam comportamento fisiológico comum de áreas com recursos ambientais restritos como reflexo do uso de uma estratégia conservativa (WRIGHT *et al.*, 2004; DONOVAN *et al.*, 2011). Via de regra, a densidade da madeira elevada possibilita o fornecimento de suporte mecânico para a árvore como um todo (TER STEEGE; HAMMOND, 2011). Ressalta-se que a variação na densidade da madeira reflete a alocação diferencial da produção metabólica (SWENSON; ENQUIST, 2007). Comumente, madeiras mais densas apresentam um maior conteúdo de carbono e energia por unidade de volume do que as madeiras menos densas (ENQUIST *et al.*, 1999). Isso ocorre devido à necessidade do aumento da resistência do caule com vistas a garantia da condutividade hidráulica e à não ocorrência de cavitação, levando ao aumento do gasto energético para a construção de paredes de vasos mais espesas. Como consequência, têm-se um uso mais elevado de carbono e uma redução da produção metabólica reservada para o crescimento vertical (SWENSON; ENQUIST, 2007).

Neste estudo, o clone de *Corymbia* spp. apresentou, de modo geral, um maior número de proteínas de resposta ao metabolismo de carboidratos. Já o clone de *Eucalyptus* spp. apresentou um maior número destas proteínas quando cultivados no espaçamento mais fechado. Efetivamente, a análise da densidade básica da madeira destes mesmos clones revelou maiores valores para esta variável no clone de *Corymbia* spp.. A variação na densidade da madeira observada entre os clones pressupõe particularidades inerentes aos materiais genéticos frente aos espaçamentos de plantio, sendo este um importante parâmetro a ser considerado diante de uma possível escassez de recursos. Neste sentido, o clone de *Corymbia* spp. parece estar bem adaptado às condições ambientais disponíveis para seu crescimento, usufruindo de ajustes anatomorfofisiológicos que favorecem seu desenvolvimento, ainda que em um espaçamento mais adensado. Ressalta-se que a densidade básica reflete diretamente na produção de biomassa seca do indivíduo e, por isso, pode ser utilizada como ferramenta com vistas à seleção de genótipos com melhores taxas de conversão energética (TRUGILHO *et al.*, 2010).

Dada a sua ampla disponibilidade e características bioquímicas, os carboidratos são fundamentais para o metabolismo e influenciam diretamente todos os processos celulares ao prover esqueletos para a síntese de diferentes compostos e energia para reações bioquímicas (ARIAS *et al.*, 2014; HELLMANN; SMEEKENS, 2014; LJUNG *et al.*, 2015). Juntos, o amido, a sacarose, a glicose e a frutose representam aproximadamente 80% do total de carboidratos sem função estrutural de espécies arbóreas (ARIAS *et al.*, 2014). Quantidades consideráveis destes fotoassimilados são encontradas em caules (VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2015) e destinam-se à formação da madeira, cujo principal componente é a parede celular. A parede celular pode comprometer até 30% do carbono total fixado e é o constituinte da biomassa mais sensível à disponibilidade de recursos ambientais (VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2005).

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos identificadas, foi encontrado um grupo de enzimas diretamente envolvidas em reações de catalização no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), sendo elas a *malato desidrogenase*, a *aconitato hidratase*, a *succinil CoA ligase*, a *piruvato desidrogenase* e as *ATP citrato liase*, *ATP citrato sintase* e a *isocitrato desidrogenase*. Ressalta-se que a reação catalisada pela *citrato sintase* e *isocitrato desidrogenase* são, particularmente pontos fundamentais da taxa de regulação do ciclo TCA (POPOVA; CARVALHO, 1988). O aumento da regulação destas proteínas em clones cultivados no espaçamento mais adensado fornece indícios de ajustes dos níveis de carboidrato celular a fim de manter o crescimento de acordo com a energia disponível. Com este mesmo padrão de regulação, também foram identificadas as proteínas *serina hidroximetiltransferase*, *formato desidrogenase*, *metilenotetrahidrofolato*, *folipoliglutamato sintase*, *formato*

desidrogenase, *C-1 tetrahidrofolato sintase* e *S-formilglutathione hidrolase* do metabolismo C1. As enzimas *fosfoenolpiruvato carboxiquinase* e *citrato sintase*, que participam da gliconeogênese, também foram identificadas no xilema em desenvolvimento dos clones, apresentando regulação diferencial, sobretudo, no clone de *Corymbia* spp.

Um número considerável de enzimas da via glicolítica também foi indentificado. A glicólise é o principal processo de uso energético da glicose, sendo natural a presença de um grande número de proteínas em tecidos de requerimento energético elevado com o meristema cambial (CELEDON, 2006). Dentre as enzimas identificadas e relacionadas a esta via estão as proteínas *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2*, *enolase-like*, *phosphoglucosamine mutase*, *ATP-dependent 6-phosphofructokinase*, *NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *phosphoenolpyruvate carboxylase triosephosphate isomerase*, *phosphoglucomutase*, *pyruvate linase* e *phosphoglycerate mutase*, sendo esta última independente do co-fator *2,3-bisphosphoglycerate*, como é peculiar em plantas (HUANG *et al.*, 1993).

Ainda pertencentes ao metabolismo de carboidratos, foram identificadas a *fructokinase*, a *alpha-glucan phosphorylase*, a *phosphotransferase* e a *sucrose synthase*. A sacarose é um dos principais carboidratos translocáveis nas plantas e sua hidrólise pode ser catalisada por duas enzimas, a invertase e a sacarose sintase. A atividade da enzima sacarose sintase tem sido associada ao desenvolvimento e deposição de xilema secundário do câmbio vascular em árvores (HAUCH; MAGEL, 1998) e ao aumento no conteúdo de celulose na parede celular. Como resultado, espera-se um aumento na espessura da parede celular e, conseqüentemente, um aumento da densidade da madeira (COLEMAN *et al.*, 2009). Apenas dois tipos de enzimas fosforilantes de glicose e frutose foram identificadas em plantas, entre elas a *frutoquinase*, fundamental para o metabolismo orgânico vegetal (GRANOT *et al.*, 2013). Diversos estudos evidenciam que esta enzima é importante para o desenvolvimento vascular das plantas e a diminuição da sua regulação está associada à ocorrência de fibras de xilema mais finas e parede celular com menor conteúdo de celulose (DAMARI-WEISSLER *et al.*, 2009; ROACH *et al.*, 2012). Esta proteína teve sua ocorrência registrada no clone de *Eucalyptus* spp., sendo *up*-reguladas, principalmente, em clones cultivados no espaçamento mais adensado. Este mesmo padrão de regulação foi observado para a enzima *alfa-glucano fosforilase*, do tipo H, com afinidade por vários glucanos, como o glicogênio (GERBRANDY, 1974). Já a enzima *fosfotransferase* foi identificada no clone de *Corymbia* spp..

Outras enzimas pertencentes ao metabolismo dos carboidratos foram a *aldose 1-epimerase*, a *aldo-keto redutase*, que atua no metabolismo de esteroides, açúcares, carbonilas

e, também, compostos tóxicos em condições de estresse (SIMPSON *et al.*, 2009) e a *inositol*, encontrada apenas no clone de *Eucalyptus* spp. e fundamentais em processos de sinalização e no fornecimento de substratos básicos para açúcares implicados na tolerância ao estresse e no transporte de carboidratos (LOEWUS; DICKINSON, 1982; NELSON *et al.*, 1998).

3.4.3 Proteínas com regulação diferencial exclusivas em cada tratamento

O diagrama de Venn apresentado na Figura 24 representa as 1484 proteínas com regulação diferencial e diferença significativa entre os tratamentos (clones e espaçamento de plantio), identificadas individualmente no tecido cambial de cada clone cultivado em cada espaçamento de plantio e classificadas de acordo com a base de dados KEGG.

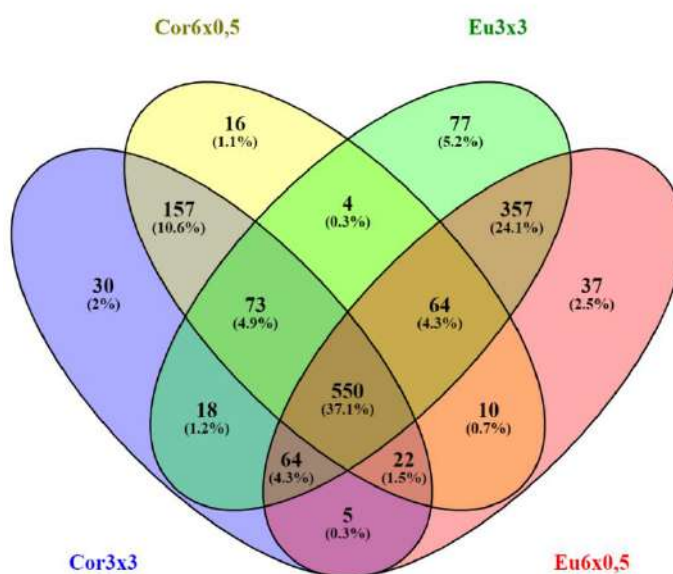


Figura 24 – Diagrama de Venn das 1484 proteínas do tecido cambial, compartilhadas e específicas, de clones de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. cultivados em diferentes espaçamentos de plantio. Clones de *Eucalyptus* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clones de *Corymbia* spp. cultivados no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt). Os diagramas foram traçados usando Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

A maior parte das proteínas identificadas em cada amostra de tecido cambial avaliada foi compartilhada entre os tratamentos. No entanto, 16 proteínas foram identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (QUADRO 2, APÊNDICE A), 37 proteínas foram identificadas apenas no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m (QUADRO 3, APÊNDICE A), 30 proteínas foram identificadas apenas no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (QUADRO 4, APÊNDICE A) e 77 proteínas foram identificadas

somente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (QUADRO 5, APÊNDICE A).

Tendo em vista as características registradas por Lopes (2017) para os clones de *Corymbia* spp. e *Eucalyptus* spp. cultivados em espaçamentos de alta, baixa e média densidade de plantio (TABELA 6, TABELA 7, TABELA 8), algumas destas proteínas tiveram sua função destacada quanto as propriedades químicas, físicas e dendrométricas da madeira destas árvores e foram descritas nos próximos itens.

3.4.3.1 Proteínas identificadas exclusivamente no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m

Entre as proteínas identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m está a *flavonoid 3'-hydroxylase*. Esta proteína, assim como outros compostos provenientes da via dos fenilpropanóides, do metabolismo secundário, está envolvida no desenvolvimento da planta e nas suas interações com o ambiente (PETERSEN *et al.*, 2010). Via de regra, a síntese de flavonóides é rigidamente controlada por sinais ambientais (WINKEL-SHIRLEY, 2002). A literatura sugere uma correlação entre o acúmulo de flavonoides, a inibição do transporte de auxina e a redução do crescimento das plantas (TAYLOR; GROTEWOLD, 2005). Por sua vez, a auxina influencia diretamente a diferenciação do tecido vascular (FRIML, 2003; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005). Neste sentido, o acúmulo de flavonoides pode provocar alterações no tamanho e forma das células xilemáticas, bem como uma diminuição do tamanho das células da medula, o que sugere uma possível relação entre a acumulação destes componentes e a redução do diâmetro do tronco destas plantas. A diminuição do rendimento de lignina na madeira também pode estar relacionada com a acumulação de flavonoides, como taninos na parede celular (BESSEAU *et al.*, 2007).

Para este tratamento, também foi registrado o acúmulo da proteína *GDP-mannose-dependent alpha-mannosyltransferas*, do metabolismo de lipídeos. Estes compostos são utilizados pelas plantas principalmente para a reserva de carbono e energia química em sementes e frutos, embora possam ser encontrados em todos os tecidos vegetais. Esta proteína é responsável pela síntese de sulfolipídeos (DONG *et al.*, 2016) e sua ocorrência no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 pode indicar que possivelmente o adensamento de plantio modulou a montagem de lipídeos em membranas de células vegetais deste genótipo.

A proteína *fructose-bisphosphate aldolase*, também encontrada neste clone, atua nas vias da glicólise/gliconeogênese e no metabolismo de frutose e manose, mais precisamente na conversão de gliceraldeído-3-fosfato em frutose-1,6- fosfato isomerase. Representa a via metabólica da fotossíntese, segundo a classificação KEGG. A presença desta proteína no tecido cambial do clone cultivado no espaçamento mais adensado indica uma melhora da capacidade fotossintética deste genótipo sob esta condição. Ressalta-se que a atividade de várias enzimas do ciclo de Calvin, incluindo a *fructose-bisphosphate aldolase*, favorece a assimilação do carbono e contribui para o aumento da biossíntese de sacarose e da quantidade de fosfato disponível para o metabolismo vegetal. Outra proteína da via metabólica da fotossíntese identificada neste tratamento foi a *Serine hydroxymethyltransferase* (SHMT), que catalisa a conversão de serina em glicina e vice-versa. Esta enzima atua na via fotorrespiratória e nas respostas das plantas às condições estressantes, desempenhando um papel importante nas vias celulares do carbono. Entretanto, pouco se sabe sobre sua função nos processos da parede celular vegetal. Avaliando plantas de *populus* transgênicas com superexpressão de um gene SHMT, o *PtSHMT2*, Zhang *et al.* (2019) observou o aumento do rendimento de biomassa e a diminuição do teor de lignina, sugerindo que genes SHMT podem representar candidatos promissores para a engenharia genética com vistas a melhoria de características da matéria prima para a conversão de biocombustíveis e redução do custo de biocombustíveis lignocelulósicos.

Pertencente ao metabolismo de carboidratos, a proteína *methylenetetrahydrofolate reductase*, que também catalisa a conversão de serina em glicina, foi observada unicamente nas amostras de tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m. Assim como a *Serine hydroxymethyltransferase*, esta enzima tem um papel importante na biossíntese de lignina ao participar das vias que fornecem S-adenosilmetionina (SAM) para as reações de metilação durante a biossíntese de álcoois coniferil e sinapil, sendo que alguns de seus genes codificadores já identificados estão associados a concentrações reduzidas de lignina na planta (VILLALOBOS *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2014).

As proteínas *histidinol dehydrogenase* e *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase* também tiveram suas ocorrências registradas exclusivamente no clone de *Corymbia* spp. cultivado neste espaçamento de plantio. Segundo a classificação proposta pela base de dados KEGG, estas proteínas fazem parte do metabolismo de aminoácidos. Estes compostos desempenham importantes funções na regulação do crescimento das plantas (LESS *et al.*, 2010), atuam na síntese de proteínas e também como armazenadores de nitrogênio (MEDICI *et al.*, 2004). O nitrogênio, por sua vez, é o principal macronutriente

necessário para o desenvolvimento das plantas e acúmulo de biomassa. No entanto, em excesso pode provocar uma redução na deposição de lignina. A enzima *histidinol dehydrogenase* cataliza a reação final na biossíntese de histidina em plantas, onde são reguladas como um precursor nuclear que é exportado aos cloroplastos. Sua presença no tecido cambial do clone em questão sugere a atuação da histidina para melhorar o fluxo de nitrogênio da raiz para a parte aérea das árvores cultivadas no espaçamento mais adensado. Já a enzima *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase* catalisa a reação final na biossíntese de metionina, precursora do etileno, que é um dos hormônios emissores de sinais bioquímicos vinculados à xilogênese. Neste contexto, o acúmulo desta enzima no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5, implica na influência do etileno sob diferentes aspectos da formação da madeira deste genótipo quando cultivado no espaçamento mais adensado, dentre eles o crescimento diametral, a lignificação e a formação do lenho de reação.

3.4.3.2 Proteínas identificadas exclusivamente no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m

Entre as proteínas identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m se destacaram aquelas relacionadas a diferentes processos biológicos, entre eles o metabolismo de lipídeos, de aminoácidos, de carboidratos e secundário, processos celulares, fotossíntese, defesa e estresse e redox.

Pertencentes ao metabolismo de lipídeos, foram identificadas neste clone as proteínas *Acetyl-coa carboxylase carboxyltransferase beta subunit* (ACC) e a *Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase*, ambas do cloroplasto. A Acetil-CoA carboxilase catalisa a carboxilação irreversível de acetil-CoA para produzir malonil-CoA através de sua atividade catalítica carboxiltransferase (CT). Trata-se de uma enzima com múltiplas subunidades nos cloroplastos da maioria das plantas. Sua principal função é fornecer o substrato malonil-CoA para a biossíntese de ácidos graxos, que representam a principal classe de componentes apolares na fração lipofílica dos extrativos presentes na madeira. A enzima *Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase* está envolvida na via metabólica dos ácidos graxos insaturados, que não apenas servem como uma importante fonte de energia de reserva, mas também constituem lipídeos complexos que são componentes essenciais das membranas celulares. Além disso, diversos estudos descrevem o papel chave dos ácidos graxos insaturados na resposta de defesa das plantas às condições estressantes, principalmente como precursor de moléculas

sinalizadoras (FARMER, 1994). Via de regra, a ocorrência de extrativos, entre eles os ácidos graxos, pode acarretar uma diferenciação nas características energéticas da madeira, como o aumento do poder calorífico. Portanto, estes compostos são recomendados como um dos critérios a serem determinados para seleção de clones com vistas a produção de madeira para energia (ZANUNCIO *et al.*, 2013). Em que pese não tenha sido observada diferenças expressivas para o poder calorífico da madeira dos clones frente aos espaçamentos de plantio avaliados, a presença destas enzimas no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento mais adensado pode representar uma vantagem deste material genético sob esta condição de cultivo frente aos demais tratamentos estudados para esta variável.

Para este clone, também foram identificadas proteínas relacionadas a processos celulares, entre elas a *CIP-like protein*, a *isoflavone reductase*, a *MOR1-like*, a *alpha-L-fucosidase 1*, a *SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1* e a *tubulin alpha-1 chain*. Este grupo funcional reúne proteínas que atuam na divisão e regulação celular, bem como em mecanismos de defesa contra estresse (XIAO *et al.*, 2009). O maior número de proteínas classificadas neste grupo funcional foi registrado nestas plantas quando cultivadas no espaçamento mais adensado, indicativo de uma resposta mais eficiente do clone de *Eucalyptus* spp. frente às condições ambientais disponíveis para o seu desenvolvimento.

A síntese de proteínas de defesa e estresse e de proteínas envolvidas em reações de oxirredução é bastante comum em plantas em resposta à uma determinada condição ambiental. No clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m, foi registrado o acúmulo exclusivo de duas das proteínas de defesa e estresse e de reações de oxirredução identificadas neste ensaio, sendo elas a *dirigent protein 23* e a *superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform*, respectivamente. Proteínas dirigentes têm sido frequentemente associadas à modulação dos níveis de lignificação após a exposição a estresses bióticos e abióticos (ARASAN *et al.*, 2013). Também há indícios de que estas proteínas possam mediar o controle espacial da deposição de lignina durante o desenvolvimento e defesa vegetal, o que as tornaria um elemento essencial na manutenção da integridade da parede celular (PANIAGUA *et al.*, 2017). É razoável supor que a proteína dirigente identificada no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento mais adensado pode estar relacionada com os maiores teores de lignina observados para este genótipo em campo. Já a *superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform*, proteína evolutivamente conservadas nos cloroplastos, é uma das enzimas responsáveis pela remoção eficiente de superóxidos formados durante o transporte de elétrons fotossintetizantes e atuam no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de EROs é comum em plantas sobre estresse abiótico e em alguns casos pode

prejudicar o metabolismo celular. Portanto, sua neutralização é fundamental para a redução de possíveis danos nas células vegetais. Enzimas catalizadoras de EROs, entre elas a superóxido dismutase são comuns em plantas e estão bem descritas na literatura (APEL; HIRT, 2004). Diante do exposto, tanto a *Dirigent protein 23* quanto a *Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform* podem representar um alvo potente em várias aplicações biotecnológicas com vistas à melhora da resistência destas plantas ao estresse por adensamento de plantio.

Outras proteínas identificadas unicamente no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m foram a *tryptophan synthase alpha chain*, a *acetolactate synthase small subunit* e a *3-hydroxyisobutyryl-coa hydrolase*, ambas do metabolismo de aminoácidos. A *Tryptophan synthase alpha chain* atua na biossíntese do triptofano. Este aminoácido é o precursor do mais importante hormônio de crescimento radicular e da parte aérea das plantas, a auxina. Já a *Acetolactate synthase small subunit* catalisa a primeira etapa da biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), dentre eles a valina, a leucina e a isoleucina. Ressalta-se que o interesse da pesquisa sobre a biossíntese de BCAAs em plantas tem sido impulsionado especialmente pelo papel de algumas enzimas biossintéticas como alvo para herbicidas, como no caso da *acetolactate synthase*, que é inibida por várias classes de herbicidas (SHIMIZU *et al.*, 2002). Assim como a *acetolactate synthase*, a enzima *3-hydroxyisobutyryl-coa hydrolase*, também participa das vias metabólicas da valina, leucina e isoleucina. Além de desempenhar funções estruturais, como a composição de proteínas, e de atuar na síntese de hormônios, os aminoácidos também participam da síntese de produtos do metabolismo secundário envolvidos na defesa das plantas, entre os quais a lignina. A presença de enzimas sintetizadoras de aminoácidos no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m sugere o aumento da disponibilidade destes compostos, o que pode ter relação com os maiores valores de massa de lignina da madeira para este genótipo de modo geral.

Ainda no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento mais adensado, também foram identificadas exclusivamente as proteínas *isoflavone reductase homolog* e a *phenylalanine ammonia-lyase*, ambas pertencentes ao metabolismo secundário e com funções associadas à defesa das plantas. Estas proteínas desempenham um importante papel na biossíntese de compostos derivados de fenilpropanóides, incluindo flavonóides, cumarinas, fitoalexinas e lignina. Os fenilpropanóides estão envolvidos em diversas funções vegetais e atuam fundamentalmente na interação entre as plantas e o ambiente (HELDT; PIECHULL, 2011). De fato, a biossíntese de fenilpropanóides é ativa no xilema em

desenvolvimento de plantas uma vez que é a via de síntese da lignina, fundamental para a formação da parede celular. Neste sentido, a ocorrência destas enzimas no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. também pode estar relacionada com os maiores de teor de lignina da madeira observada para este genótipo e aos maiores valores de massa de lignina da madeira das árvores cultivadas sob alta densidade.

A proteína *ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3* participa do metabolismo de carboidratos e também foi identificada unicamente no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m. A fosfofrutoquinase (PFK) é uma enzima chave na regulação da glicólise como um todo. Via de regra, tem sua atividade aumentada quando há deficiência na produção de ATP, o que comumente ocorre sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio para o desenvolvimento da planta (BERG *et al.*, 2007). Estas informações indicam um papel importante para a PFK na resposta fisiológica deste clone ao estresse oxidativo possivelmente provocado pelo adensamento do plantio e implica que análises dos padrões de ativação desta enzima podem ser úteis para programas que objetivam melhorar a consistência da produção e qualidade da madeira frente à diminuição do espaçamento de plantio.

Uma outra proteína identificada exclusivamente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m foi a *glycine cleavage system P*. A proteína P compõe o sistema de clivagem da glicina (GCS), juntamente com as proteínas H, T e L. Nas plantas, as proteínas GCS estão diretamente envolvidas na via fotorrespiratória (DOUCE *et al.*, 2001). A ocorrência desta proteína no tecido cambial deste clone evidencia um aumento na fotorrespiração, o que reduz a fotossíntese. Embora a fotorrespiração apresente efeitos fotoprotetores, contribua para a manutenção do balanço redox e do sistema imune da planta, frequentemente, é considerada um processo de desperdício do ponto de vista da fixação de carbono (EISENHUT *et al.*, 2017). Este fato poderia explicar os menores valores observados para a massa de carbono da madeira do clone de *Eucalyptus* spp. em comparação com os valores observados para o clone de *Corymbia* spp..

3.4.3.3 Proteínas identificadas exclusivamente no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m

Entre as proteínas identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m está a *xyloglucan endotransglucosylase/hidrolase* (XTH) e a *actin depolymerizing fator* (ADF), ambas relacionadas à processos biológicos, segundo a classificação KEGG. A *xyloglucan endotransglucosylase/hidrolase*

pertence a uma classe de enzimas que atuam especificamente sobre o xiloglucano (NISHITANI; VISSENBERG, 2007). Na parede celular primária das plantas, a hemicelulose xiloglucana é um glicano de função estrutural que se prende às microfibrilas de celulose formando uma importante estrutura de sustentação de cargas (FRY, 1989). A expressão de genes específicos XTH já foi detectada na região de divisão, alongamento e diferenciação de vários tipos de células, incluindo as de tecidos vasculares (BECNEL *et al.*, 2006). Já a *actin depolymerizing fator* representa um grupo de proteínas que atua na reorganização da rede de actina, que por sua vez possui um importante papel no crescimento, divisão e resposta ao estresse das células vegetais (MONDAL *et al.*, 2018). Do ponto de vista científico, existe um interesse considerável na compreensão das bases bioquímicas da síntese e modificação tanto do xiloglucano quanto da actina, uma vez que estes são considerados elementos reguladores fundamentais em processos como o crescimento e modificação e diferenciação celular. Isto justifica a importância das análises dos padrões de ativação das enzimas XTH e ADF observadas neste genótipo, sobretudo quando cultivado no espaçamento menos adensado.

A proteína *glutamine synthetase cytosolic isozyme 2* também ocorreu unicamente no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m. A glutamina sintetase (GS), relacionada ao metabolismo energético, é uma enzima chave para a assimilação de nitrogênio e desintoxicação de amônio nas plantas (GUAN *et al.*, 2016). O nitrogênio é um importante elemento para o crescimento e reprodução vegetal, contudo, pode ser limitado em alguns ambientes naturais. O amônio, por sua vez, é uma forma de nitrogênio inorgânico usado no desenvolvimento vegetal, no entanto, sua oferta excessiva pode inibir o crescimento da planta, devendo ser rapidamente assimilado em glutamina (VON WIRÈN *et al.*, 2000). Neste sentido, as plantas desenvolvem estratégias específicas para adquirir nitrogênio e assimilá-lo em compostos orgânicos. A GS catalisa uma reação que incorpora amônio para a produção do aminoácido glutamina (TOBIN; YAMAYA, 2001). A isoenzima citosólica da GS é particularmente importante para assimilação de amônio de diferentes fontes, tanto para a assimilação primária de nitrogênio quanto para a reciclagem deste elemento (BERNARD *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstraram que a disponibilidade de nitrogênio influencia a formação da madeira (PITRE *et al.*, 2007a). Há indícios de que o excesso de nitrogênio pode levar ao enriquecimento de celulose e uma diminuição dos teores de lignina (PITRE *et al.*, 2007b). Além disso, o eucalipto pode responder à nutrição nitrogenada ampliando sua área foliar e, conseqüentemente, o volume de tronco. De fato, baixos teores de lignina da madeira e maiores diâmetros de tronco foram registrados para o clone de *Corymbia* spp. cultivado sob baixa densidade de plantio nos ensaios de campo. Os diversos papéis fisiológicos desta proteína são

importantes frente às atuais questões agrícolas e ecológicas e sua ocorrência no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. representa uma estratégia potencial de adaptação ambiental deste genótipo.

As proteínas *3-isopropylmalate dehydrogenase 2, chloroplastic* e *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*, pertencentes ao metabolismo de aminoácidos, também foram identificadas no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m. A enzima *3-isopropylmalate dehydrogenase 2* participa da biossíntese de leucina e glucosinato. A ausência ou diminuição desta enzima pode desencadear um amplo espectro de alterações metabólicas, inculindo o desequilíbrio da homeostase de aminoácidos, essencial para o desenvolvimento vegetal, aumento da síntese proteica, alterações no *status* redox, bem como a diminuição da fotossíntese, provocando o retardo de crescimento da planta (HE *et al.*, 2013). Já a *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase* está envolvida na biossíntese de serina. Além de atuar como precursor de várias biomoléculas importantes, este aminoácido também desempenha um importante papel na resposta das plantas às condições ambientais disponíveis para seu desenvolvimento (TOUJANI *et al.*, 2013). A presença destas enzimas no tecido cambial amostrado indica que o cultivo deste genótipo no espaçamento 3 x 3 m favoreceu a manutenção da homeostase de aminoácidos, o que pode ter beneficiado, por exemplo, o crescimento diametral de plantas cultivadas sob baixa densidade de plantio, conforme observado neste tratamento.

A proteína *NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* participa do metabolismo de carboidratos e também foi identificada unicamente no clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m. Ativa na via da glicólise e da gliconeogênese, esta enzima é considerada essencial na partição de energia e poder redutor nas células vegetais (BUSTOS; IGLESIAS, 2003). Além disso, pode desempenhar outras funções importantes em diversos processos celulares. Sua ocorrência no tecido cambial deste clone levar a pressupor que esta enzima possivelmente tem função importante na capacidade deste genótipo em adaptar-se a algumas condições de cultivo metabolicamente desfavoráveis.

Outra proteína identificada exclusivamente no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m foi a *photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic*, relacionada à processos fotossintéticos da planta. Esta proteína está envolvida na resposta à seca (CASTILLEJO *et al.*, 2008). Além disso, ela codifica um fator de estabilidade e/ou um fator de montagem, garantindo a funcionalidade do fotossistema II (MEURER *et al.*, 1998). A ocorrência dessa proteína, fundamental para a produção energética e manutenção da integridade do aparato fotossintético, no tecido cambial do clone de *Corymbia*

spp. pode ter contribuído para uma maior eficiência fotossintética neste genótipo cultivado sob condição de baixa densidade.

Ainda no tecido cambial do clone de *Corymbia* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m, também foram identificadas exclusivamente algumas das proteínas *dirigent 21*, *mitochondrial small heat shock* e *luminal-binding 5*, do processo de defesa e estresse vegetal, e a proteína *cytochrome b5*, envolvida nas reações redox.

Sabe-se que as proteínas dirigentes desempenham um papel crucial na resposta à estresses abióticos e bióticos em plantas e que estão implicadas no processo de lignificação da madeira. Já as proteínas choque térmico (Hsps) são reguladas não somente após a exposição a condições estressantes, entre elas a alta temperatura, mas também durante estágios específicos do desenvolvimento vegetal (LUBARETZ; ZUR, 2002). O estresse térmico, em especial, afeta o metabolismo e a estrutura das membranas celulares, além de prejudicar a fotossíntese, a respiração e relações hídricas da planta (WAHID *et al.*, 2007). A proteína, *mitochondrial small heat shock* atua especialmente como uma chaperona molecular e melhora a termotolerância da planta. Sua ocorrência contribui para a manutenção da estabilidade da membrana sob condições estressantes, bem como para o aumento da eliminação de EROs nas mitocôndrias, levando a uma melhor tolerância ao estresse. Por sua vez, a proteína *luminal-binding* (BiP) é um membro da família Hsp70 com atividade no lúmen do retículo endoplasmático. Embora esteja construtivamente presente durante o crescimento normal, sua indução torna-se aguda em condições que causam o acúmulo de proteínas deformadas no lúmen do retículo endoplasmático (DENECKHE *et al.*, 1991). Tem-se demonstrado que a família de proteínas BiP de plantas exibe regulação órgão-específica e regulação diferencial em resposta à estresses fisiológicos mediante diferentes vias de sinalização intracelular (CAROLINO *et al.*, 2003). Coerente com essa observação, a ocorrência da *luminal-binding protein 5*, no tecido cambial deste clone pode promover um aumento da tolerância a agentes estressantes típicos do retículo endoplasmático durante o desenvolvimento da planta e formação da madeira. Ressalta-se que, embora este clone tenha sido cultivado em um espaçamento mais amplo, condições ambientais restritivas, típicas da região de cerrado onde o experimento foi implantado, podem ter influenciado o seu comportamento, com reflexo na ocorrência de proteínas de defesa e estresse para garantir o desenvolvimento da planta. Portanto, a análise do padrão de ativação destas proteínas é de grande interesse e pode representar uma ferramenta útil para a melhora da produtividade deste genótipo.

A proteína *cytochrome b 5* (CB5) é considerada um componente redox e está envolvida em reações biossintéticas de lipídeos e esteroides em plantas. Na sua forma livre, é

uma pequena proteína ligada à heme, encontrada ubiquamente nas membranas do retículo endoplasmático (VERGÈRES; WASKELL, 1995). Há evidências de que estas proteínas modulam positivamente o processo de divisão e alongamento celular (IKEYAMA *et al.*, 2010). Em *E. grandis*, uma proteína do domínio de ligação heme/esteroide do tipo citocromo b 5 foi negativamente regulada no caule de plantas cultivadas sob estresse térmico (frio a curto prazo). Também há relatos de que proteínas do tipo CB5 podem estar envolvidas na biossíntese de lignina em plantas, mais especificamente na formação de S-lignina (GOU *et al.*, 2019). A ocorrência da proteína CB5 no tecido cambial pode estar relacionada ao maior crescimento diametral destas árvores cultivadas sob baixa densidade de plantio.

3.4.3.4 Proteínas identificadas exclusivamente no clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m

Um grande número de proteínas relacionadas principalmente aos processos biológicos metabolismo de lipídeos, de aminoácidos, de carboidratos e secundário, processos celulares, fotossíntese, defesa e estresse e redox foram identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 6 x 0,5 m.

Duas proteínas relacionadas à processos celulares tiveram sua ocorrência destacada neste tratamento. A primeira delas, a *tubulin-folding cofactor B* está envolvida no controle da divisão celular e apresenta grande importância no desenvolvimento vegetal. Sua atividade está ligada ao controle da disponibilidade de subunidades de tubulinas e da estabilidade de microtúbulos em células eucarióticas (SZYMANSKI, 2002). Os microtubulos, por sua vez, são fundamentais para diferentes processos celulares, entre eles a separação de cromossomos, o transporte de proteínas e mRNA, motilidade celular e morfogênese (RADCLIFFE; TODA, 2000). Também foi identificada a proteína *annexin D4*, pertencente a um grupo de proteínas multifuncionais geralmente distribuídas por toda a planta e ao longo do ciclo de vida vegetal. O padrão dinâmico desta proteína sugere que ela pode ser reguladora central ou efetora do crescimento das plantas e da sinalização de estresses ambientais e, portanto, da adaptação resultante do desenvolvimento vegetal às condições ambientais (BAUCHER *et al.*, 2012). Tal fato poderia estar relacionado ao melhor desempenho deste genótipo em termos de crescimento diametral frente às condições ambientais disponibilizadas por este espaçamento de plantio.

Para este tratamento também foram identificadas exclusivamente no tecido cambial as proteínas *phenylcoumaran benzylic ether reductase*, *cinnamyl-alcohol dehydrogenase 2*, *(+)-pinoresinol reductase*. Estas proteínas estão envolvidas no metabolismo secundário das

plantas e são catalisadoras de reações em várias etapas da via biossintética da lignina, definindo sua composição estrutural (HIGUCHI *et al.*, 1977). A proteína *cinnamyl-alcohol dehydrogenase 2* catalisa a etapa final da biossíntese do monolignol, precursor monomérico da lignina (HAWKINS *et al.*, 1997). Sua baixa regulação em diferentes espécies de plantas demonstrou efeitos deletérios na lignificação em termos de suprimento dos monômeros siringil e guaiacil, bem como o acúmulo de substratos cinamaldeídos (BAUCHER *et al.*, 1998). Já proteína *phenylcoumaran benzylic ether reductase*, uma das enzimas mais abundantes na madeira, trata-se de uma enzima catalizadora de reações de redução nas vias biossintéticas dos isoflavonóides, lignanas e neolignanas. Sua ocorrência tem sido registrada principalmente no xilema em desenvolvimento, parênquima xilemático e nas fibras do floema em desenvolvimento (VANDER *et al.*, 2000). Segundo NICULAES *et al.* (2014), há evidências de que a *phenylcoumaran benzylic ether reductase* protege as células xilemáticas do ambiente oxidativo provocado pelo processo de lignificação, através do seu papel como antioxidante de um produto de acoplamento de fenilpropanóides em plantas. É possível que proteínas relacionadas, como a (+)-*pinoresinol reductase*, também identificada exclusivamente neste genótipo, desempenhem funções semelhantes às da *phenylcoumaran benzylic ether reductase* nas plantas (NICULAES *et al.*, 2014). A associação entre estas enzimas e o metabolismo ativo de fenilpropanoides associado a deposição de lignina na parede celular do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m pode estar relacionada com o maior valor para o teor de lignina da madeira observado neste tratamento.

As proteínas *HVA22-like protein*, *HVA22-like protein a* e *aldo-keto reductase 2* também tiveram sua ocorrência registrada unicamente neste tratamento. Estas proteínas estão relacionadas às vias metabólicas de lipídeos. As proteínas da família *HVA22-like* são conhecidas por seu papel na resposta das plantas às condições ambientais, em especial ao estresse hídrico e salino. Via de regra, a regulação da proteína *HVA22* é mediada por estresses ambientais, sendo o seu acúmulo induzido, particularmente, pelo ácido abscísico (ABA) (BRANDS; HO, 2002). Há indícios que alguns homólogos do tipo *HVA22-like protein* atuam no desenvolvimento reprodutivo vegetal (CHEN *et al.*, 2009). Esta proteína também representa um tipo único de genes induzidos pelo ácido abscísico (ABA) que, por sua vez, medeia diferentes processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (LEUNG; GIRAUDAT, 1998). Ressalta-se que o acúmulo de ABA na zona cambial pode estar associado ao aumento da espessura da parede de traqueídeos durante a formação do lenho tardio (ROBERTS, 1998). Já *aldo-keto reductase 2* pertence a uma superfamília que inclui a aldeído redutase e a aldose redutase, com importante papel na redução de uma variedade de copostos carbonil. Há vestígios

de que a sua ocorrência esteja associada a uma redução na peroxidação lipídica sob condições de estresse hídrico (OBERSCHALL *et al.*, 2000). Uma variedade de genes ativados em condições estressantes está relacionada á famílias de aldo/ceto redutases (BOHREN *et al.*, 1989). Neste sentido, a ocorrência destas proteínas no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. sugere seu envolvimento na detoxificação de aldeídos tóxicos gerados sob condição de deficiência hídrica neste genótipo, proporcionada pelo espaçamento de plantio em questão, e pode estar relacionada a importantes mecanismos de aclimação vegetal.

Outro grupo de proteínas identificadas exclusivamente no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m foi o das enzimas *acetyl-CoA acetyltransferase*, *cytosolic 1, 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase 1* e *S-adenosylmethionine synthase*, indicando que a condição ambiental disponibilizada levou ao redirecionamento do metabolismo de aminoácidos. A *Acetyl-CoA acetyltransferase* pertence à família das tiolases e atua em várias vias metabólicas, incluindo a via do mevalonato e biossíntese de terpenóides. A caracterização de genes para a *Acetyl-CoA acetyltransferase* sugere que esta enzima possui papel fundamental no crescimento e desenvolvimento vegetal (JIN *et al.*, 2012). Via de regra, sua baixa regulação está associada à redução das taxas de crescimento e desenvolvimento das plantas, haja vista a diminuição da oferta de acetoacetil-CoA, limitando a biogênese de isoprenóides derivados de mevalonato que dão suporte a estes processos (JIN *et al.*, 2012). Já a enzima *5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase* é componente chave na via de reciclagem de metionina, aminoácido essencial para diversos processos metabólicos, que incluem a transmetilação e a síntese de proteínas, nucleotídeos e poliaminas em bactérias e plantas (BANERJEE *et al.*, 1990). Geralmente, células em proliferação exigem altos níveis deste aminoácido, entretanto, sua disponibilidade é limitada e sua síntese *de novo* é energeticamente cara (ALBERS, 2009). Além de prover o fornecimento de metionina, esta enzima é fundamental para sustentação de altas taxas de síntese de etileno na planta (BÜRSTENBINDER *et al.*, 2007). Também relacionada a via metabólica dos aminoácidos, a proteína *S-adenosylmethionine synthase* é amplamente utilizada em uma grande variedade de reações biológicas, incluindo a sintetização de S-adenosilmetionina a partir de metionina e ATP. A S-adenosilmetionina sintetizada é usada pela maioria das metiltransferases como doadora de metil em reações de metilação e é fundamental em processos como a síntese de poliaminas (FONTECAVE *et al.*, 2004), importante para funções celulares que afetam o crescimento e o desenvolvimento (PEGG; CASERO, 2011). Frequentemente, reduções na sua taxa regulatória estão associadas a bloqueios do crescimento e da progressão do ciclo celular (HAYASHI *et al.*, 2018). Diante do exposto, a ocorrência destas enzimas no tecido cambial do

clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 também pode estar relacionada às maiores taxas de crescimento em diâmetro do tronco observadas para este genótipo quando cultivado sob baixa densidade de plantio.

Também foram identificadas proteínas com grande participação em vias de sinalização, dentre elas, a *nitrogen regulatory protein P-II homolog*. Esta proteína interage e regula a atividade de duas enzimas, a *N*-acetil glutamato-quinase e a Acetil-CoA carboxilase, envolvidas na regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio (KARAKAS *et al.*, 2011). Embora atue como “regulador mestre” do crescimento, esta proteína parece ser responsável por uma sub-rede de detecção de nitrogênio em plantas (PRICE *et al.*, 2012). A descoberta do gene vegetal GLB1, condificador da *nitrogen regulatory protein P-II homolog* é indicativo de que as plantas contêm um sistema de detecção de metabólitos semelhante ao dos procariontes (RADCHENKO *et al.*, 2013). Em bactérias, é um efector alostérico que regula indiretamente a glutamina sintetase nos níveis transcricional e pós-traducional em resposta à disponibilidade de nitrogênio (HSIEH *et al.*, 1998). Via de regra, sua expressão é regulada positivamente pela disponibilidade luz e metabólitos e o seu acúmulo no tecido cambial do clone de *Eucalyptus* spp. é indicativo de que, cultivadas sob baixa densidade de plantio, este genótipo pode aumentar a sua capacidade de assimilar nitrogênio, elemento fundamental na composição de importantes moléculas.

O tecido cambial deste clone também apresentou regulação exclusiva de algumas proteínas envolvidas na defesa e na resposta a estresses no tecido cambial, as quais incluem uma *MLP-like protein 28* e uma *BAG family molecular chaperone regulator 4 isoform X1*. A *MLP-like protein 28*, “principal proteína do látex”, foi identificada inicialmente no látex do opium (*Papaver somniferum*) e, apesar de suas funções não terem sido completamente elucidadas, já foram relacionadas à resistência à estresses ambientais e ao desenvolvimento de órgãos em plantas (LYTLE *et al.*, 2009). Já as proteínas da família BAG são reguladoras de chaperonas moleculares que influenciam diversas vias celulares. Multifuncionais, participam na regulação de processos relacionados à resposta das plantas a diferentes tipos de estresse, na coordenação de sinais para o crescimento celular e indução das vias de sobrevivência celular, bem como na inibição de vias de morte celular programada em resposta a condições estressantes (KABBAGE; DICKMAN, 2008).

O desencadeamento do desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio, muito comum em resposta à determinadas condições ambientais, levou à produção de enzimas que funcionam como mensageiras secundárias na regulação do metabolismo redox no tecido cambial das plantas do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento menos adensado.

Neste tratamento, foi constatado o acúmulo exclusivo de duas proteínas antioxidantes *thioredoxin O2*, *mitochondrial* e *glutaredoxin*. A *thioredoxin* é uma enzima antioxidante encontrada em diversos organismos, desempenhando múltiplos papéis celulares, entre os quais a ação como redutase no controle redox, proteção de proteínas à agregação oxidativas, resposta celular a estresses ambientais, regulação da morte celular programada e também como um fator de crescimento (HOLMGREN, 1985; POWIS *et al.*, 2000; RAVI *et al.*, 2005; MESSENS; SILVER, 2006). Pode ser encontrada em diversos compartimentos celulares, incluindo mitocôndrias (XU *et al.*, 2008). Já as Glutaredoxinas são pequenas oxirredutases dependentes de glutathione que também pertencem à superfamília da Tiorredoxina. A análise de regulação desta enzima sugere seu papel no ajuste do crescimento e desenvolvimento da planta ao longo do seu ciclo de vida e seu acúmulo é induzido por diferentes estímulos ambientais, incluindo hormônios e condições de estresse (GARG *et al.*, 2010). No caso do tecido cambial de clones de *Eucalyptus* spp., enzimas dos processos de defesa e estresse vegetal e do metabolismo redox responderam ao espaçamento de plantio 3 x 3 m contribuindo para a adaptação destas plantas às condições ambientais disponíveis para o seu desenvolvimento e protegendo as células contra a oxidação, possivelmente, com reflexos nas melhores taxas de crescimento observadas para este genótipo de modo geral.

Também foi registrado o acúmulo de uma proteína *GDSL esterase/lipase* no tecido cambial das plantas deste tratamento. A função desta proteína está associada à manutenção do nível adequado de O-acetilação no esqueleto de xilana, fundamental para a formação da parede secundária, via desacetilação (ZHANG *et al.*, 2017). O grau e o padrão de O-acetilação têm impacto direto na configuração, nas propriedades físico-químicas e nas funções biológicas e fisiológicas da parede celular (BUSSE-WICHER *et al.*, 2014). Defeitos nesta reação podem resultar em crescimento e desenvolvimento anormal das plantas, além de gerar impactos no uso da biomassa (LEE *et al.*, 2011; GILLE *et al.*, 2011). Há indícios de que mutantes deficientes na biossíntese de xilana apresentam síntese de celulose anormal, o que corrobora com a hipótese de que a O-acetilação atua nas interações entre estes polímeros. Quanto a produção de biocombustíveis, a acetilação de polissacarídeos pode causar obstáculos à degradação da biomassa vegetal, diminuindo a eficiência da fermentação na produção destes produtos (BIELY, 2012; GILLE; PAULY, 2012). Considerando-se a importância do controle da O-acetilação em polímeros de parede na pesquisa de plantas, a proteína *GDSL esterase/lipase* representa um alvo potencial que pode ser geneticamente modificado para a melhora da biomassa vegetal do clone de *Eucalyptus* spp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m.

Dado o alto número de proteínas identificadas, este é um dos estudos proteômicos mais abrangentes realizados com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*. Os resultados encontrados sugerem a existência de expressão gênica e mecanismos de resposta diferencial entre os clones avaliados em função do cultivo em diferentes espaçamentos, revelando características fisiológicas e moleculares que os distinguem em diferentes níveis de adaptação ao espaço vital de crescimento disponível. De modo geral, foi possível detectar um grande número de proteínas relacionadas a todos os processos biológicos considerados. Não obstante, chamou a atenção a resposta em nível de proteínas à homeostase redox, defesa e resposta ao estresse, fotossíntese, metabolismo secundário e metabolismo de carboidratos, diretamente relacionadas com as características da madeira e observadas em campo. Considerando-se os dados de quantificação de proteínas identificadas no conjunto de dados proteicos, pode-se inferir que a rota biossintética de lignina foi estimulada no clone de *Eucalyptus* spp., principalmente frente ao cultivo no espaçamento mais amplo. Já a biossíntese de carbono e produção de energia parecem ser mais estimuladas no clone de *Corymbia* spp., indicando seu potencial para utilização energética, sobretudo quando cultivado no espaçamento de alta densidade de plantio.

Análises proteômicas são reconhecidas como uma importante ferramenta para a biotecnologia e melhoramento vegetal. No entanto, ainda existem limitações relativas principalmente a complexidade das estruturas biológicas e dos processos fisiológicos envolvidos. Além disso, os recentes avanços obtidos com essa técnica têm permitido a obtenção de uma grande quantidade de informação, gerando novos desafios relativos ao processamento e análise de dados. Aliado a este fato tem-se a importância econômica e ambiental de *Eucalyptus* e *Corymbia* e a necessidade do estudo do metabolismo destas espécies florestais frente a diferentes condições de desenvolvimento. Neste sentido, este trabalho permite a compreensão das respostas emitidas por estes genótipos quando cultivados em diferentes espaçamentos de plantio, bem como a percepção sobre mecanismos moleculares relacionados.

Ressalta-se que a formação da madeira e o crescimento de árvores ainda são pouco estudados do ponto de vista metabólico. Portanto, este trabalho complementa estas pesquisas e os resultados obtidos representam um avanço nesta área do conhecimento, fornecendo novas informações e perspectivas para estudos mais detalhados acerca do processo de síntese de madeira. Análises suplementares são importantes e necessárias para explicar o comportamento das proteínas relacionadas à resposta aos diferentes espaçamentos de plantio no tecido cambial de *Eucalyptus* e *Corymbia*, visando o direcionamento dos programas de melhoramento para a aquisição de cultivares mais adaptadas ao manejo intensivo. Por fim, é importante citar que as

proteínas aqui descritas podem ser empregadas na engenharia genética vegetal, com vistas à melhora no desempenho das plantações em termos de rendimento e qualidade da madeira, principalmente no que se diz respeito ao uso energético destes clones.

4 CONCLUSÃO

- O método de extração baseado no uso de tampão, fenol e acetato de amônio em metanol promoveu bons rendimentos em termos de quantidade e qualidade de proteína extraída para o tecido cambial de eucalipto e mostrou-se satisfatório para os estudos proteômicos.
- A técnica nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) foi adequada para a identificação de um grande número de proteínas. Por meio desta estratégia proteômica foi possível identificar 2547 espécies de proteínas, das quais 1484 apresentaram alterações qualitativas ou quantitativas em resposta a genótipos e espaçamentos de plantio.
- A análise estatística das proteínas identificadas pela estratégia proteômica *shotgun* e pela função metabólica revelou um comportamento diferente nos genótipos avaliados, indicando um possível ajuste metabólico às condições ambientais proporcionadas pelos espaçamentos de plantio.
- De modo geral, proteínas pertencentes ao metabolismo de carboidratos, metabolismo secundário, processos celulares, fotossíntese, homeostase redox, defesa e resposta ao estresse se destacaram em termos de relações com as propriedades da madeira dos clones avaliados.

5 REFERÊNCIAS

ABRIL, N.; GION, J.; KERNER, R.; MULLER-STARCK, G.; CERRILLO, R. N.; PLOMION, C. RENAUT, J.; VALLEDOR, L.; JORRÍN-NOVO, J. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1219-1242, 2011.

AESCHBACHER, R. A.; SCHROTT, M.; POTRYKUS, I.; SAUL, M. W. Isolation and molecular characterization of PosF21, an *Arabidopsis thaliana* gene which shows characteristics of ab-Zip class transcription factor. **The Plant Journal**, v. 1, n. 3, p. 303-316, 1991.

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.

ALBERS, Eva. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. **IUBMB life**, v. 61, n. 12, p. 1132-1142, 2009.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 120p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARASAN, S. K. T.; PARK, J. I.; AHMED, N. U.; JUNG, H. J.; HUR, Y.; KANG, K. K.; NOU, I. S. Characterization and expression analysis of dirigent family genes related to stresses in Brassica. **Plant physiology and biochemistry**, v. 67, p. 144-153, 2013.

ARIAS, M. C.; PELLETIER, S.; HILLIOU, F.; WATTEBLED, F.; RENOU, J. P.; D'HULST, C. From dusk till dawn: the Arabidopsis thaliana sugar starving responsive network. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 482, 2014.

BANERJEE, Ruma V.; MATTHEWS, ROWENA G. Cobalamin-dependent methionine synthase. **The FASEB journal**, v. 4, n. 5, p. 1450-1459, 1990.

BAUCHER, M.; PÉREZ-MORGA, D.; EL JAZIRI, M. Insight into plant annexin function: from shoot to root signaling. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 4, p. 524-528, 2012.

BAUCHER, M.; PÉREZ-MORGA, D.; EL JAZIRI, M. Insight into plant annexin function: from shoot to root signaling. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 4, p. 524-528, 2012.

BECNEL, J.; NATARAJAN, M.; KIPP, A.; BRAAM, J. Developmental expression patterns of Arabidopsis XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. **Plant molecular biology**, v. 61, n. 3, p. 451-467, 2006.

BECNEL, J.; NATARAJAN, M.; KIPP, A.; BRAAM, J. Developmental expression patterns of Arabidopsis XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. **Plant molecular biology**, v. 61, n. 3, p. 451-467, 2006.

BEER, M. A.; TAVAZOIE, S. Predicting gene expression from sequence. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 185-198, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Glycolysis and gluconeogenesis. In: **Biochemistry**. New York: W H. Freeman and Company, 2007. Cap. 16.

BERNARD, S. M.; HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v. 182, n. 3, p. 608-620, 2009.

BESSEAU, S.; HOFFMANN, L.; GEOFFROY, P.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; LEGRAND, M. Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. **The Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 148-162, 2007.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1575-1588, 2012.

BOHREN, K. M.; BULLOCK, B.; WERMUTH, B.; GABBAY, K. H. The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 16, p. 9547-9551, 1989.

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

BRANDS, A.; HO, T. D. Function of a plant stress-induced gene, HVA22. Synthetic enhancement screen with its yeast homolog reveals its role in vesicular traffic. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1121-1131, 2002.

BRITTO, D. S.; PIROVANI, C. P.; GONZALEZ, E. R.; SILVA, J. F.; GESTEIRA, A. S.; CASCARDO, J. C. M. Oxidative stress proteins as an indicator of a low quality of eucalyptus clones for the pulp and paper industry. **Genetics Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 3798-3813, 2012.

BUDZINSKI, Ilara Gabriela Frasson. **Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalyptus grandis***. 185 p. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BÜRSTENBINDER, K.; RZEWUSKI, G.; WIRTZ, M.; HELL, R.; SAUTER, M. The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, n. 2, p. 238-249, 2007.

BUSSE-WICHER, M.; GOMES, T. C.; TRYFONA, T.; NIKOLOVSKI, N.; STOTT, K., GRANTHAM, N. J.; DUPREE, P. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, v. 79, n. 3, p. 492-506, 2014.

BUSTOS, D. M.; IGLESIAS, A. A. Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 2081-2088, 2003.

CAI, H.; WANG, C. C.; TSOU, C. L. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24550-24552, 1994.

CAMPBELL M. M.; SEDEROFF R. R. Variation in lignin content and composition (mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants). **Plant Physiol.**, v. 110, p. 3-13, 1996.

CAMPBELL, W. J.; OGREN, W. L. Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts. **Photosynthesis Research**, v. 23, n. 3, p. 257-268, 1990.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. Metodologia para a determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003. 3p. (Comunicado Técnico, 87).

CANOVAS, F. M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRÍN-NOVO, J. V.; MOCK, H. P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 285-298, 2004.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press, Berkeley, California, USA, 1975. 259 p.

CARMO, L. S.; MURAD, A. M.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; RIBEIRO, S. G.; JORRÍN-NOVO, J. V.; MEHTA, A. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 284-292, 2017.

CAROLINO, S. M. B.; VAEZ, J. R.; IRSIGLER, A. S. T.; VALENTE, M. A. S.; RODRIGUES, L. A. Z.; FONTES, E. P. B. Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 2, p. 59-66, 2003.

CASIMIRO-SORIGUER, C. S.; MUÑOZ-MÉRIDA, A.; PÉREZ-PULIDO, A. J. Sma3s: a universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. **Proteomics**, v. 17, n. 12, p. 1700071, 2017.

CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 2-3, p. 145-157, 2001.

CASTILLEJO, M.; BANI, M.; RUBIALES, D. Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. **Phytochemistry**, v. 115, p. 44-58, 2015.

CASTILLEJO, M.; MALDONADO, A. M.; OGUETA, S.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. **The Open Proteomics Journal**, v. 1, n. 1, 2008.

CELEDÓN, P. A. F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas**. 112 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M. Proteomics of nonmodel plant species. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 663-673, 2013.

CHEN, C. N. N.; CHEN, H. R.; YEH, S. Y.; VITTORE, G.; HO, T. H. D. Autophagy is enhanced and floral development is impaired in AtHVA22d RNA interference Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 149, n. 4, p. 1679-1689, 2009.

CHIN, C.; TAN, H. The Use of Proteomic Tools to Address Challenges Faced in Clonal Propagation of Tropical Crops through Somatic Embryogenesis. **Proteomes**, v. 6, n. 2, p. 21, 2018.

COLEMAN, H. D.; YAN, J.; MANSFIELD, S. D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 13118-13123, 2009.

COSTA, M. G. de S. **Alterações no proteoma caulinar de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* em resposta a variações de temperatura**. 89 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

COSTA, R. M. L.; PENA, C. A. A.; ASSIS, T. F. Variabilidade genética em progênies de polinização aberta de *Corymbia citriodora*. Disponível em: <> Acesso em: 09/12/2018.

DAMARI-WEISSLER, H.; RACHAMILEVITCH, S.; ALONI, R.; GERMAN, M. A.; COHEN, S.; ZWIENIECKI, M. A.; ... & GRANOT, D. LeFRK2 is required for phloem and xylem differentiation and the transport of both sugar and water. **Planta**, v. 230, n. 4, p. 795-805, 2009.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DENECKE, J.; GOLDMAN, M. H.; DEMOLDER, J.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **The Plant Cell**, v. 3, n. 9, p. 1025-1035, 1991.

DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and experimental botany**, v. 58, n. 1-3, p. 93-99, 2006.

DONG, C. J.; CAO, N.; LI, L.; SHANG, Q. M. Quantitative proteomic profiling of early and late responses to Salicylic acid in Cucumber leaves. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161395, 2016.

DONOVAN, L. A. et al. The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, p. 88-95, 2011.

DOUCE, R.; BOURGUIGNON, J.; NEUBURGER, M.; RÉBEILLÉ, F. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. **Trends in plant science**, v. 6, n. 4, p. 167-176, 2001.

EISEN, J. A.; SWEDER, K. S.; HANAWALT, P. C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 14, p. 2715-2723, 1995.

EISENHUT, M.; BRÄUTIGAM, A.; TIMM, S.; FLORIAN, A.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; BAUWE, H.; WEBER, A. P. Photorespiration is crucial for dynamic response of photosynthetic metabolism and stomatal movement to altered CO₂ availability. **Molecular plant**, v. 10, n. 1, p. 47-61, 2017.

ENG, J. K. MCCORMACK, A L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

ENQUIST, B. J., WEST, G. B., CHARNOV, E. L., AND BROWN, J. H. Allometric scaling of production and life history variation in vascular plants. **Nature**, v. 401, p. 907-911, 1999.

FAO. **Global forest resources assessment FRA 2015: how are the world's forests changing?** Rome, 2015. 46 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4793e.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

FARMER, Edward E. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. In: **Signals and Signal Transduction Pathways in Plants**. Springer, Dordrecht, 1994. p. 187-201.

FEUILLET, C.; LAUVERGEAT, V.; DESWARTE, C.; PILATE, G.; BOUDET, A.; & GRIMA-PETTENATI, J. Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. **Plant molecular biology**, v. 27, n. 4, p. 651-667, 1995.

FONTECAVE, M.; ATTA, M.; MULLIEZ, E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 5, p. 243-249, 2004.

FRIML, J. Auxin transport—shaping the plant. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 1, p. 7-12, 2003.

FRY, S. C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, v. 75, n. 4, p. 532-536, 1989.

FUJII, T.; SATO, K.; MATSUI, N.; FURUICHI, T.; TAKENOUCI, S.; NISHIKUBO, N.; KATAYAMA, Y. Enhancement of secondary xylem cell proliferation by Arabidopsis cyclin D overexpression in tobacco plants. **Plant cell reports**, v. 31, n. 9, p. 1573-1580, 2012.

GALLAGHER, J. N.; BISCOE, P. V. Radiation absorption, growth and yield of cereals. **The Journal of Agricultural Science**, v. 91, n. 1, p. 47-60, 1978.

GANG, D. R.; KASAHARA, H.; XIA, Z. Q.; VANDER MIJNSBRUGGE, K.; BAUW, G.; BOERJAN, W.; LEWIS, N. G. Evolution of plant defense mechanisms relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7516-7527, 1999.

GARG, R.; JHANWAR, S.; TYAGI, A. K.; JAIN, M. Genome-wide survey and expression analysis suggest diverse roles of glutaredoxin gene family members during development and response to various stimuli in rice. **DNA research**, v. 17, n. 6, p. 353-367, 2010.

GARTNER, B.L. Does photosynthetic bark have a role in the production of core vs. outer wood. **Wood and Fiber Science**, Hanover, v. 28, n. 1, p. 53-61, 1996.

GERBRANDY, S. J. Glycogen phosphorylase of potatoes purification and thermodynamic properties of the adsorption on glycogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 370, n. 2, p. 410-418, 1974.

GILLE, S., DE SOUZA, A.; XIONG, G.; BENZ, M.; CHENG, K.; SCHULTINK, A.; PAULY, M. O-acetylation of Arabidopsis hemicellulose xyloglucan requires AX4 or AX4L, proteins with a TBL and DUF231 domain. **The Plant Cell**, v. 23, n. 11, p. 4041-4053, 2011.

GILLE, S.; PAULY, M. O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 12, 2012.

GIVAN, C. V.; KLECZKOWSKI, L. A. The enzymic reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate in leaves of higher plants. **Plant Physiology**, v. 100, n. 2, p. 552-556, 1992.

GONÇALVES, M. R.; PASSOS, C. A. M. GROWTH OF FIVE SPECIES OF EUCALYPTS SUBJECTED TO THE WATER DEFICIT IN TWO LEVEL OF PHOSPHORUS. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 145-161, 2000.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Natural Products of Woody Plants. In: ROWE, J. W. **Chemicals Extraneous to the lignocellulosic Cell Wall**. Berlin: Springer Verlag, 1989. p. 439-511.

GOU, M.; YANG, X.; ZHAO, Y.; RAN, X.; SONG, Y.; LIU, C. J. Cytochrome b5 is an obligate electron shuttle protein for syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 31, n. 6, p. 1344-1366, 2019.

GOULART, M.; HASELEIN, C. R.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J. A.; & PAULESKI, D. T. Massa específica básica e massa seca de madeira de *Eucalyptus grandis* sob o efeito do espaçamento de plantio e da posição axial no tronco. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p. 167-175, 2003.

GRANOT, D.; KELLY, G.; STEIN, O.; DAVID-SCHWARTZ, R. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 809-819, 2013.

GRENNAN, A. K. Abiotic Stress in Rice. An “Omic” Approach. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1139-1141, 2006.

GUAN, M.; DE BANG, T. C.; PEDERSEN, C.; SCHJOERRING, J. K. Cytosolic glutamine synthetase Gln1; 2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1921-1933, 2016.

GUERRA, S. P. S.; SANCAS, K. P.; GARCIA, E. A.; SPINELLI, R. Bioenergia: Desenvolvimento, pesquisa e inovação. In: LEMOS, E. G. M.; STADIOTTO, N. R. (Orgs). **Eucalipto adensado: manejo para florestas energéticas**. p. 125-161. São Paulo: Editora Cultura Acadêmica, 2012.

HAUCH, S.; MAGEL, E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. **Planta**, v. 207, n. 2, p. 266-274, 1998.

HAWKINS, S.; SAMAJ, J.; LAUVERGEAT, V.; BOUDET, A.; GRIMA-PETTENATI, J. Cinnamyl alcohol dehydrogenase: identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar. **Plant Physiology**, v. 113, n. 2, p. 321-325, 1997.

HAYASHI, T.; TERUYA, T.; CHALECKIS, R.; MORIGASAKI, S.; YANAGIDA, M. S-Adenosylmethionine Synthetase Is Required for Cell Growth, Maintenance of G0 Phase, and Termination of Quiescence in Fission Yeast. **iScience**, v. 5, p. 38-51, 2018.

HE, Y.; DAI, S.; DUFRESNE, C. P.; ZHU, N.; PANG, Q.; CHEN, S. Integrated proteomics and metabolomics of Arabidopsis acclimation to gene-dosage dependent perturbation of isopropylmalate dehydrogenases. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57118, 2013.

HELDT, H. W.; PIECHULL, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. **Plant biochemistry**, v. 4, p. 446-447, 2011.

HELLMANN, H. A.; SMEEKENS, S. Sugar sensing and signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 113, 2014.

HERNANDEZ, M. L.; SICARDO, M. D.; ALFONSO, M.; MARTÍNEZ-RIVAS, J. M. Transcriptional Regulation of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase Genes in Response to Abiotic Stresses Leads to Changes in the Unsaturated Fatty Acids Composition of Olive Mesocarp. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 251, 2019.

HIGUCHI, T.; SHIMADA, M.; NAKATSUBO, F.; rTANAHASHI, M. Differences in biosyntheses of guaiacyl and syringyl lignins in woods. **Wood Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 153-167, 1977.

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. Systematic studies in the eucalyptus 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v. 6, n. 2/3, p. 185-504, 1995.

HOLMGREN, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxidants & redox signaling**, v. 2, n. 4, p. 811-820, 2000.

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

HSIEH, M. H.; LAM, H. M.; VAN DE LOO, F. J.; CORUZZI, G. A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13965-13970, 1998.

HUANG, Y.; PLAKELEY, S. D.; MCALEESE, S. M.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; DENNIS, D. T. Higher-plant cofactor-independent phosphoglyceromutase: purification, molecular characterization and expression. **Plant molecular biology**, v. 23, n. 5, p. 1039-1053, 1993.

HUNG, S. H.; YU, C. W.; LIN, C. H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 1-10, 2005.

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

HUSCH, B.; MILLER, C. I.; BEERS, T. W. Forest mensuration 3rd ed. **John Wiley and Sons, New York**, 1982. 402p.

IKEYAMA, Y.; TASAKA, M.; FUKAKI, H. RLF, a cytochrome b5-like heme/steroid binding domain protein, controls lateral root formation independently of ARF7/19-mediated auxin signaling in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 62, n. 5, p. 865-875, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Chuva acumulada mensal e número de dias com chuva Itamarandiba - MG. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Gráficos>>. Acesso em: 03/07/2018.

JAKOBY M.; WEISSHAAR B.; DRÖGER-LASER W.; VICENTE-CARBAJOSA J.; TIEDEMANN J.; KROJ T. AND PARCY F. BZIP transcription factors in *Arabidopsis*, **Trends Plant Sci.**, v. 7, p. 106–111, 2002.

JIN, H.; SONG, Z.; NIKOLAU, B. J. Reverse genetic characterization of two paralogous acetoacetyl CoA thiolase genes in *Arabidopsis* reveals their importance in plant growth and development. **The Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 1015-1032, 2012.

JOLLY, C.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, No. 19, p. 1564-1572, 2000.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; CASTILLEJO, M. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2947-2962, 2007.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRIA-ZOMENO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 2009.

JORRÍN-NOVO, J. V. Plant proteomics methods and protocols. In: **Plant Proteomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 3-13.

KABBAGE, M.; DICKMAN, M. B. The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 9, p. 1390-1402, 2008.

KALLI, A.; SMITH, G. T.; SWEREDOSKI, M. J.; & HESS, S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3071-3086, 2013.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; KAWASHIMA, S.; OKUNO, Y.; & HATTORI, M. The KEGG resource for deciphering the genome. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D277-D280, 2004.

KARAKAS, E.; SIMOROWSKI, N.; FURUKAWA, H. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 249, 2011.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, 376, 2005.

KIM, Y. J.; KIM, D. G.; LEE, S. H.; LEE, I. Wound-induced expression of the ferulate 5-hydroxylase gene in *Camptotheca acuminata*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 2, p. 182-190, 2006.

KLOCK, V.; MUÑUZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. Química da madeira 3.ed. Manual didático. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. Disponível: <http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/Quimica%20da%20Madeira%202013.pdf>. Acesso em: 20/12/2018.

KUMAR, J. K.; TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. Proteomic analysis of thioredoxin targeted proteins in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Boston, v. 101, n. 11, p. 3759-3764, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LANDER, A. D. Making sense in biology: an appreciation of Julian Lewis. **BMC Biology**, v. 12, n. 57, 2014.

LEE, C.; TENG, Q.; ZHONG, R.; YE, Z. H. The four Arabidopsis reduced wall acetylation genes are expressed in secondary wall-containing cells and required for the acetylation of xylan. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 8, p. 1289-1301, 2011.

LELES, P. S. S. **Crescimento, alocação de biomassa e distribuição de nutrientes e uso de água em *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus pellita* sob diferentes espaçamentos**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

LESS, H.; ANGELOVICI, R.; TZIN, V.; GALILI, G. Principal transcriptional regulation and genome-wide system interactions of the Asp-family and aromatic amino acid networks of amino acid metabolism in plants. **Amino acids**, v. 39, n. 4, p. 1023-1028, 2010.

LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Absciscic acid signal transduction. **Annual review of plant biology**, v. 49, n. 1, p. 199-222, 1998.

LEWIS, N.G.; Yamamoto, E. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 455-496, 1990.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1304-1317, 2008.

LIU, X.; BUSH, D. R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. **Amino acids**, v. 30, n. 2, p. 113-120, 2006.

LJUNG, K.; NEMHAUSER, J. L.; PERATA, P. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 130-137, 2015.

LOEWUS, F. A.; DICKINSON, D. B. Cyclitols. In: **Plant Carbohydrates I**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1982. p. 193-216.

LOHSE, M.; NAGEL, A.; HERTER, T.; MAY, P.; SCHRODA, M.; ZRENNER, R.; USADEL, B. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 5, p. 1250-1258, 2014.

LOPES, E. D. **Avaliação de clones de *Eucalyptus* spp e *Corymbia* spp em diferentes espaçamentos visando à produção de bioenergia**. 120 f. Tese (doutorado). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

LOPES, E. D., DE LAIA, M. L., DOS SANTOS, A. S., SOARES, G. M., LEITE, R. W. P., & DE SOUZA MARTINS. Influência do espaçamento de plantio na produção energética de clones de *Corymbia* e *Eucalyptus*. **Floresta**, v. 47, n. 1, p. 95 - 104, 2017.

LUBARETZ, O.; ZUR NIEDEN, U. Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. **Planta**, v. 215, n. 2, p. 220-228, 2002.

LYTLE, B. L.; SONG, J.; DE LA CRUZ, N. B. Structures of Two Arabidopsis thaliana Major Latex Proteins Represent Novel Helix-Grip. **Folds Proteins**, v. 76, n. 1, p. 237-243, 2009.

MEDICI, L. O.; PEREIRA, M. B.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 142, n. 5, p. 535-541, 2004.

MEIRELES, K. G. X. **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa**. 117 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

MEURER, J.; PLÜCKEN, H.; KOWALLIK, K. V.; WESTHOFF, P. A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in Arabidopsis thaliana. **The EMBO journal**, v. 17, n. 18, p. 5286-5297, 1998.

MONDAL, H. A.; LOUIS, J.; ARCHER, L.; PATEL, M.; NALAM, V. J.; SAROWAR, S.; SIVAPALAN, V.; ROOT, D. D.; SHAH, J. Arabidopsis ACTIN-DEPOLYMERIZING FACTOR3 is required for controlling aphid feeding from the phloem. **Plant physiology**, v. 176, n. 1, p. 879-890, 2018.

MORENO-RISUENO M. A.; VAN NORMAN J.M.; BENFEY P. N. “Transcriptional switches direct plant organ formation and patterning”. **Curr Top Dev Biol.**, v. 98, p. 229-257, 2012.

MÜLLER, M. D.; COUTO, L.; LEITE, H. G.; BRITO, J. O. Avaliação de um clone de eucalipto estabelecido em diferentes densidades de plantio para produção de biomassa e energia. **Biomassa & Energia**, v. 2, n. 3, p. 177-186, 2005.

MUÑOZ-MÉRIDA, A.; GONZÁLEZ-PLAZA, J. J.; CANADA, A.; BLANCO, A. M.; GARCÍA-LÓPEZ, M. D. C.; RODRÍGUEZ, J. M.; BELAJ, A. De novo assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. **DNA research**, v. 20, n. 1, p. 93-108, 2013.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; MERWE, K.; SINGH, P.; JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T. J.; YE, C-Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M. M.; CLEMENTE, H. S.; SAIDI, N.; CASSANWANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C. A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A. R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSE, J.; BOYD, A. E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J. W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; LHEIM, C.K.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R. C.; STEANE, D. A.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS JR, JG. J.; STRAUSS, S. H.; JAISWAL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J. J.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSAR, D. S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-362, 2014.

MYSORE, K. S.; RYU, cNonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9, n.2, p. 97-104, 2004.

NAKATSUBO, T.; MIZUTANI, M.; SUZUKI, S.; HATTORI, T.; & UMEZAWA, T. Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinorensinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15550-15557, 2008.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H.; TAKEBA, G.; & KUBO, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 3, p. 323-328, 2001.

NELSON, D. E.; RAMMESMAYER, G.; BOHNERT, H. J. Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. **The Plant Cell**, v. 10, n. 5, p. 753-764, 1998.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; & EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988.

NICULAES, C.; MORREEL, K.; KIM, H.; LU, F.; MCKEE, L. S.; IVENS, B.; FROMM, J. Phenylcoumaran benzylic ether reductase prevents accumulation of compounds formed under oxidative conditions in poplar xylem. **The Plant Cell**, v. 26, n. 9, p. 3775-3791, 2014.

NISHITANI, K.; VISSENBERG, K. Roles of the XTH protein family in the expanding cell. In: **The expanding cell**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 89-116.

NISHITANI, K.; VISSENBERG, K. Roles of the XTH protein family in the expanding cell. In: **The expanding cell**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 89-116.

NÓBREGA, F.; VIDAL, R.; SARDINHA, R.; DE SOUSA, R. B. Estratégia, Baseada em Sequências, para Rastreamento e Identificação de Proteínas Dirigentes em *Quercus suber*. **Actas das Comunicações (Online)**, 2005.

OBERSCHALL, A.; DEÁK, M.; TÖRÖK, K.; SASS, L.; VASS, I.; KOVÁCS, I.; HORVÁTH, G. V. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. **The Plant Journal**, v. 24, n. 4, p. 437-446, 2000.

PANIAGUA, C., BILKOVA, A., JACKSON, P., DABRAVOLSKI, S., RIBER, W., DIDI, V.; HOUSER, J.; GIGLI-BISCEGLIA, N.; WIMMEROVA, M.; BUDISKA, E.; HAMANN, T.; HEJATKO, J. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 13, p. 3287-3301, 2017.

PANIAGUA, C., BILKOVA, A., JACKSON, P., DABRAVOLSKI, S., RIBER, W., DIDI, V.; HOUSER, J.; GIGLI-BISCEGLIA, N.; WIMMEROVA, M.; BUDISKA, E.; HAMANN, T.; HEJATKO, J. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 13, p. 3287-3301, 2017.

PEGG, A. E.; CASERO, ROBERT A. Current status of the polyamine research field. In: **Polyamines**. Humana Press, 2011. p. 3-35.

PENG X.; ZHAO Y.; CAO J.; ZHANG W.; JIANG H.; LI X.; MA Q.; ZHU S.; CHENG B. "CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments". **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40120, 2012.

PEREIRA, A. R.; DE ANDRADE, D. C.; LEAL, P. G. L.; DOS SANTOS TEIXEIRA, N. C. Produção de biomassa e remoção de nutrientes em povoamentos de *Eucalyptus citriodora* e *E. saligna* cultivados na região de cerrado de Minas Gerais. **Floresta**, v. 15, n. 1/2, 1984.

PEREIRA, J. L. **Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus***. 180 p. Tese (Doutorado). Universidade Catolica de Brasilia, Brasilia, 2007.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. de O.; ABREU, H. S. Os fitohormônios na formação da madeira. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 40-47, 2004.

PETERSEN, M.; HANS, J.; MATERN, Ulrich. Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. **Annual plant reviews**, v. 40, p. 182-257, 2010.

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

PITRE, F. E.; COOKE, J. E. K.; MACKAY, J. J. Short-term effects of nitrogen availability on wood formation and fibre properties in hybrid poplar. **Trees**, v. 21, n. 2, p. 249-259, 2007a.

PITRE, F. E.; POLLET, B.; LAFARGUETTE, F.; COOKE, J. E.; MACKAY, J. J.; LAPIERRE, C. Effects of increased nitrogen supply on the lignification of poplar wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10306-10314, 2007b.

POORTER, L.; BONGERS, F. Ecology of tropical forests. Wageningen: Agricultural University, 1993. 223 p.

POPOVA, T. A.; CARVALHO, M. A. A. P. de. Citrate and isocitrate in plant metabolism, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1364, p. 307-325, 1998.

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

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

PRICE, M. B.; JELESKO, J.; OKUMOTO, S. Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 235, 2012.

PUTZ, F. E., COLEY, P. D., LU, K., MONTALVO, A., AND AIELLO, A. Uprooting and snapping of trees: structural determinants and ecological consequences. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 13, p. 1011-1020, 1983.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins are ATPases whose activity is regulated by 2-oxoglutarate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. 12948-12953, 2013.

RADCLIFFE, P. A.; TODA, T. Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 263, n. 5, p. 752-760, 2000.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J. H.; VAN DE PEER, Y.; & BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignifications toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; EBBELS, T. M.; LUNDSTEDT, T.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. Piecewise multivariate modelling of sequential metabolic profiling data. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 105, 2008.

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

RIECHMANN J. L.; HEARD J.; MARTIN G.; REUBER L.; JIANG C.; KEDDIE J.; ADAM L.; PINEDA O.; RATCLIFFE O. J.; SAMAHA R. R.; CREELMAN R.; PILGRIM M.; BROUN P.; ZHANG J. Z.; GHANDEHARI D.; SHERMAN B. K.; YU G. "Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes". **Science**, v. 290, p. 105-10, 2000.

ROACH, M.; GERBER, L.; SANDQUIST, D.; GORZSÁS, A.; HEDENSTRÖM, M.; KUMAR, M.; SUNDBERG, B. Fructokinase is required for carbon partitioning to cellulose in aspen wood. **The Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 967-977, 2012.

ROBERTS, L. W. Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In: ROBERTS, L. W., GAHAN, P. B., ALONI, R. **Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators (Springer series in wood science)**. Estados Unidos, Springer-Verlag, 1988, p. 22-38.

ROMERO-RODRÍGUEZ, M. C.; PASCUAL, J.; VALLEDOR, L.; JORRÍN-NOVO, J. V. Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 85-91, 2014.

RYAN, D. P.; OWEN-HUGHES, T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. **Current opinion in chemical biology**, v. 15, n. 5, p. 649-656, 2011.

SANTOS, M. D. **Efeito do espaçamento de plantio na biomassa do fuste de um clone híbrido interespecífico de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla***. 140p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, 2011.

SCHAEFER, M.; STERINGER, J. P.; LYKO, F. The Drosophila cytosine-5 methyltransferase Dnmt2 is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, p. e1414, 2008.

SHAO, H. B.; GUO, Q. J.; CHU, L. Y.; ZHAO, X. N.; SU, Z. L.; HU, Y. C.; CHENG, J. F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, p. 37-45, 2007.

SHEKHAR, S.; MISHRA, D.; GAYALI, S.; BURAGOHAIN, A. K.; CHAKRABORTY, S.; & CHAKRABORTY, N. Comparison of proteomic and metabolomic profiles of two contrasting ecotypes of sweetpotato (*Ipomoea batata* L.). **Journal of proteomics**, v. 143, p. 306-317, 2016.

SHIMIZU, T.; NAKAYAMA, I.; NAGAYAMA, K.; MIYAZAWA, T.; NEZU, Y. Acetolactate synthase inhibitors. In: **Herbicide classes in development**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. p. 1-41.

SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; VISSERS, J. P.; & GEROMANOS, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE a virtue of parallel MS acquisition. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-156, 2006.

SIMPSON, P. J.; TANTITADAPITAK, C.; REED, A. M.; MATHER, O. C.; BUNCE, C. M.; WHITE, S. A.; & RIDE, J. P. Characterization of two novel aldo-keto reductases from Arabidopsis: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. **Journal of molecular biology**, v. 392, n. 2, p. 465-480, 2009.

STAMM, A.J. **Wood and cellulose science**. New York: The Ronald Press Company, 1964. 549p.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.

STAPE, J. L.; BINKLEY, D.; RYAN, M. G.; FONSECA, S.; LOOS, R. A.; TAKAHASHI, E. N.; LIMA, A. M. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 9, p. 1684-1694, 2010.

SWENSON, N. G.; ENQUIST, B. J. Ecological and evolutionary determinants of a key plant functional trait: wood density and its community-wide variation across latitude and elevation. **American Journal of Botany**, v. 94, ed. 3, p. 451-459, 2007.

SZYMANSKI, D. Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer. **Current Biology**, v. 12, n. 22, p. R767-R769, 2002.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Plant physiology and development. **Sunderland, MA: Sinauer Associates**, 2015.

TANG, H. M.; LIU, S.; HILL-SKINNER, S.; WU, W.; REED, D.; YEH, C. T.; SCHNABLE, P. S. The maize brown midrib2 (bm2) gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. **The Plant Journal**, v. 77, n. 3, p. 380-392, 2014.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 3, p. 317-323, 2005.

TEICHMANN, M.; DUMAY-ODELOT, H.; FRIBOURG, S. Structural and functional aspects of winged-helix domains at the core of transcription initiation complexes. **Transcription**, v. 3, n. 1, p. 2-7, 2012.

TER STEEGE, H.; HAMMOND, D. S. Character convergence, diversity, and disturbance in tropical rain forest in Guyana. **Ecology**, v. 82, p. 3197-3212, 2001.

THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; STITT, M. Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.

TOBIN, A. K.; YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 356, p. 591-604, 2001.

TOUJANI, W.; MUÑOZ-BERTOMEU, J.; FLORES-TORNERO, M.; ROSA-TÉLLEZ, S.; ANOMAN, A. D.; ALSEEKH, S.; ROS, R. Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 1164-1178, 2013.

TRUGILHO, P. F.; LIMA, J. T.; & MENDES, L. M. Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de Eucalyptus saligna. **Cerne**, v. 2, n. 1, p. 94-111, 1996.

VALLEDOR, L.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. C.; JORRÍN-NOVO, J. V. Standardization of data processing and statistical analysis in comparative plant proteomics experiment. In: **Plant Proteomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 51-60.

VANCE, C. P.; KIRT, T. K.; Sherwood, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

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

VERGÈRES, G.; WASKELL, L. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. **Biochimie**, v. 77, n. 7-8, p. 604-620, 1995.

VILLALOBOS, D. P.; DÍAZ-MORENO, S. M.; SAID, E. S. S.; CAÑAS, R. A.; OSUNA, D.; VAN KERCKHOVEN, S. H.; CANTÓN, F. R. Reprogramming of gene expression during compression wood formation in pine: coordinated modulation of S-adenosylmethionine, lignin and lignan related genes. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 100, 2012.

VILLAR-SALVADOR, P.; CASTRO-DÍEZ, P.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; & MONTSERRAT-MARTÍ, G. Stem xylem features in three *Quercus* (Fagaceae) species along a climatic gradient in NE Spain. **Trees**, v. 12, n. 2, p. 90-96, 1997.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W. B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 3, p. 254-261, 2000.

WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M., FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; & HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838, 1996.

WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

WRIGHT, I. J.; REICH, P. B.; WESTOBY, M.; ACKERLY, D. D.; BARUCH, Z.; BONGERS, F.; FLEXAS, J. The worldwide leaf economics spectrum. **Nature**, v. 428, p. 822-828, 2004.

XIA, J.; PSYCHOGIOS, N.; YOUNG, N.; & WISHART, D. S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. W652-W660, 2009.

XIAO, X.; YANG, F.; ZHANG, S.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. **Physiologia plantarum**, v. 136, n. 2, p. 150-168, 2009.

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

YUAN, Y.; YU, S.; YU, J.; ZHAN, Z.; LI, M.; LIU, G.; HUANG, L. Predicting the function of 4-coumarate: CoA ligase (LJ4CL1) in *Lonicera japonica*. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2386-2399, 2014.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Competição entre espécies de plantas—Uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 11, n. 1., P. 10-30, 2004.

ZANON, M. L. B.; FINGER, C. A. G. Relação de variáveis meteorológicas com o crescimento das árvores de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em povoamentos implantados. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 467-476, 2010.

ZANUNCIO, A. J. V.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B.; CARNEIRO, A. D. C. O.; VITAL, B. R. Chemical composition of eucalipt wood with different levels of thinning. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 4, p. 755-760, 2013.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G. P.; ANDERSON, T. A. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. **Developmental biology**, v. 289, n. 1, p. 3-16, 2006.

ZHANG, B.; WANG, Q.; & PAN, X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. **Journal of cellular physiology**, v. 210, n. 2, p. 279-289, 2007.

ZHANG, B.; ZHANG, L.; LI, F.; ZHANG, D.; LIU, X.; WANG, H.; ZUOPENG, X.; CHENGCAI, C.; ZHOU, Y. Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase. **Nature plants**, v. 3, n. 3, p. 17017, 2017.

ZHANG, J.; LI, M.; BRYAN, A. C.; YOO, C. G.; ROTTMANN, W.; WINKELER, K. A.; GUNTER, L. E. Overexpression of a serine hydroxymethyltransferase increases biomass production and reduces recalcitrance in the bioenergy crop *Populus*. **Sustainable energy & fuels**, v. 3, n. 1, p. 195-207, 2019.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 247-273, 2002. ZOBEL, B. Silvicultural effects on wood properties. **IPEF International**, v. 2, p. 31-38, 1992.

APENDICE A

Tabela 1 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Defesa e Estresse”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629079945	BAG Family Molecular Chaperone Regulator 1	–	–	2.52	4.17	3.64	2.89
629080023	Heat Shock Protein 83	31816.49	–	–	0.00	–	0.00
629081887	Germin-Like Protein Subfamily 3 Member 2	2.25	–	–	0.35	–	0.28
629083580	Universal Stress Protein	9812.61	–	0.33	0.00	0.33	0.00
629086231	17.5 Kd Heat Shock Family Protein	–	–	322221.65	250241.56	322221.65	250241.56
629101263	Protein downstream of FLC	–	–	6734.29	3968.99	6734.29	3968.99
629109782	Universal Stress Protein	–	–	87011.39	118994.30	87011.39	118994.30
629112815	Mitochondrial Small Heat Shock Protein	–	8280.91	0.00	–	–	0.00
629114588	17.7 Kda Heat Shock Protein	2.56	–	6541.48	2554.91	6541.48	2554.91
629125909	Dirigent Protein 21	–	6385.85	0.00	–	–	0.00
702237858	Universal Stress Protein PHOS32	–	–	6.68	5.79	6.67	5.80
702249163	NDR1/HIN1-Like Protein 3	–	–	0.45	–	–	–
702250087	Protein SRC2 Homolog	0.39	2895.66	6.87	50925.34	19891.99	17.59
702250890	Cysteine And Histidine-Rich Domain-Containing Protein RAR1	–	–	14592.69	7781.06	14592.69	7781.06
702274292	Dirigent Protein 22	–	–	0.05	0.05	0.07	0.04
702275261	Universal Stress Protein A-Like Protein	–	–	–	0.40	–	0.41
702275279	Bnaa07g26960d Protein	–	6819.19	–	3991.03	6975.45	–
702275431	Allene Oxide Cyclase, Chloroplastic-Like	–	–	0.31	0.28	0.23	0.37
702286222	MLP-Like Protein 28	8206.15	–	8206.15	–	8206.15	–
702300648	Chaperone Protein Clpb3, Mitochondrial	–	–	0.19	0.28	0.22	0.24
702302469	17.9 Kda Class II Heat Shock Protein	–	48250.78	–	51999.04	31492.23	–
702319581	Protein heat-stress-associated 32	3276.37	–	0.16	0.00	0.27	0.00
702326016	Probable Methyltransferase PMT14	–	0.00	2534.76	–	–	1677.91
702339677	Probable Methyltransferase PMT18	2107.06	–	0.50	0.00	–	0.00
702369558	Chaperone Protein Dnaj 10	–	–	3.09	2.86	2.81	3.15
702381874	22.0 Kda Class IV Heat Shock Protein	0.00	2.54	0.00	0.21	0.00	0.08
702420333	MLP-Like Protein 28	–	2.66	0.00	0.00	0.00	0.00

							Conclusão
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702420353	MLP-Like Protein 328	3.42	—	60280.01	17618.02	60280.01	17618.02
702433245	Chitinase-Like Protein 1	8039.12	—	8039.12	—	8039.12	—
702451628	Ultraviolet-B Receptor UVR8	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
702471975	Heat Shock Cognate 70 Kda Protein 2	—	—	0.45	0.42	0.40	0.47
702480579	18.1 Kda Class I Heat Shock Protein-Like	—	—	7146.02	5115.08	7146.02	5115.08
702480853	Osmotin-Like Protein	—	—	3.54	—	3.28	—
702481452	Universal Stress Protein A-Like Protein	—	2.12	2.23	4.44	4.73	2.09
702498370	BAG Family Molecular Chaperone Regulator 4 Isoform X1	1286.10	—	1286.10	—	1286.10	—
702515977	Heat Shock 70 Kda Protein Cognate 1-Like, Partial	—	—	56209.74	63058.23	56209.74	63058.23
702520281	Probable Mediator Of RNA Polymerase II Transcription Subunit 37c, Partial	2.58	—	0.18	0.07	0.19	0.07
1091492445	Luminal-Binding Protein 5	—	1293.45	0.00	—	—	0.00
1305265599	Chaperone Protein Clpb1	—	—	0.26	0.44	0.34	0.35
A0A058ZXX4	Heat Shock Protein	3.54	—	0.29	0.08	0.29	0.08
A0A059AFF0	Dirigent Protein	—	—	36950.49	24488.19	36950.49	24488.19
A0A059AFU2	17.5 Kd Heat Shock Family Protein	0.00	—	0.00	17.67	0.00	23.78
A0A059B5F4	Chitinase-Like Protein 2	—	—	—	2.51	2.16	2.07
A0A059B9F6	Stromal 70 Kda Heat Shock-Related Protein, Chloroplastic	—	—	0.36	—	0.40	—
A0A059BEV8	Major Latex Protein Homologue	—	—	33933.21	20391.27	33933.21	20391.27
A0A059C1F3	Heat Shock Protein 90	—	—	3865.24	4428.27	3865.24	4428.27
A0A059C1L8	Reticulon-Like Protein	0.00	—	0.00	—	0.00	—
A0A059C990	Heat Shock Cognate 70 Kda Protein	—	—	10566.38	8504.33	10566.38	8504.33
A0A059D803	Bnac09g05210d Protein	5286.28	—	0.46	0.00	—	0.00
A0A059D9N8	C2 Domain-Containing Protein	—	—	2159.57	1113.41	2159.57	1113.41
A0A059DJR2	Heat Shock Protein 83	0.08	—	0.02	0.25	0.02	0.28
Eucgr.B02732.1.p	Universal Stress Protein 1	—	—	3.74	2.59	3.07	3.16
Eucgr.B03110.1.p	Heat Shock Protein 90	0.39	0.47	2.71	3.28	—	6.99
Eucgr.F00419.1.p	DNAJ Heat Shock N-Terminal Domain-Containing	1842.57	—	1842.57	—	1842.57	—
Eucgr.F03866.1.p	26.5 Kda Heat Shock Protein, Mitochondrial	2.05	2.89	0.21	0.30	—	0.10
Eucgr.G01646.1.p	Os01g0702450 Protein	—	21049.81	2.37	50964.33	49838.41	2.42
Eucgr.G02508.1.p	Probable Methyltransferase PMT2	—	—	0.39	0.29	0.31	0.36
Eucgr.J03127.1.p	Heat Shock Cognate 70 Kda Protein	—	—	0.27	0.34	0.23	0.40
Eucgr.K02521.1.p	Chaperone Protein Clpb1	—	—	0.16	0.28	0.17	0.27
Eucgr.K02890.1.p	Protein EDS1B	—	—	10912.68	9747.94	10912.68	9747.94
Eucgr.L00429.1.p	Dirigent Protein 23	0.00	—	—	14346.78	—	14346.78

Tabela 2 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Enrolamento, modificação e degradação”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629077068	Serine Carboxypeptidase II-2	5048,00	3619,38	—	—	5048,00	0,00
629082745	Vignain	0,00	—	—	2768,05	—	2768,05
629083073	Probable Proteasome Inhibitor	—	—	23677,70	31818,63	23677,70	31818,63
629086851	SKP1-Like Protein 1B	—	—	—	0,50	—	0,48
629088543	U-Box Domain-Containing Protein 4	0,41	—	1596,80	3866,33	1596,80	3866,33
629088646	Cysteine Proteinase	—	—	2,25	3,99	2,55	3,52
629090360	Proteasome Subunit Alpha Type	—	—	41606,71	37332,71	41606,71	37332,71
629090546	Xaa-Pro Aminopeptidase 2	—	—	0,46	0,47	0,42	—
629099339	Oligopeptidase B	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
629099341	Protease 2	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
629100827	Subtilisin-Like Protease	—	—	0,29	0,41	0,29	0,41
629100895	Cysteine Protease	—	—	16264,14	18886,84	16264,14	18886,84
629102076	Gamma-Glutamyl Hydrolase 2	0,00	0,00	—	—	0,00	7821,39
629102509	SKP1-Like Protein 15	7789,38	—	7789,38	—	7789,38	—
629102560	T-Complex Protein 1 Subunit Beta	—	—	0,45	0,49	0,43	0,50
629103238	Cysteine Protease-1	—	—	—	—	2,03	—
629104473	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 35	6,09	—	—	0,30	—	0,28
629105937	Metacaspase-4	—	—	—	2,40	—	2,15
629107236	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-17 Kda	—	—	2145,38	3865,66	2145,38	3865,66
629107317	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 8	—	69916,90	0,44	29333,52	30810,21	0,42
629107706	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 13	—	—	9014,17	11801,12	9014,17	11801,12
629110336	Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 2	2,39	—	—	—	—	—
629110845	Proteasome Subunit Beta Type-2-A	—	—	0,50	—	—	—
629114225	Leucine Aminopeptidase	—	—	2,29	2,26	—	2,64
629116460	Transcription Elongation Factor B Polypeptide 2	2,19	—	—	0,30	—	0,30
629123420	Plant UBX Domain-Containing Protein 11	4,13	—	943,84	228,41	943,84	228,41
702250327	Tripeptidyl-Peptidase 2 Isoform X1	—	—	—	—	—	2,14
702270847	Ubiquitin-Activating Enzyme E1 1 Isoform X1	—	—	—	—	—	2,04
702274255	Protein SSUH2 Homolog	0,28	—	0,15	—	0,16	—
702279833	Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 12 X1	—	—	0,19	0,25	0,18	0,26

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702280452	Serine Carboxypeptidase-Like 51	—	5872,20	—	9914,80	6524,85	—
702329173	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 13 Homolog B	—	0,00	19816,11	—	—	11534,98
702363330	Aspartic Proteinase A1	—	0,00	—	0,00	0,00	—
702363551	Ubiquitin Thioesterase OTU1	—	—	0,45	0,43	—	0,34
702365634	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 36	—	—	13923,66	8133,21	13923,66	8133,21
702379413	DNA Damage-Inducible Protein 1 Isoform X2	—	—	0,46	—	0,45	—
702401713	SUMO-Activating Enzyme Subunit 2	0,47	—	0,27	—	0,25	—
702422738	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 Variant 1D	—	—	0,18	0,40	0,26	0,28
702424622	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 7 Homolog A	—	—	4,22	2,94	3,39	3,65
702439220	Subtilisin-Like Protease SBT1.7	—	0,00	54704,60	2,66	—	86384,17
702444206	Proteasome Subunit Beta Type-2-B	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702466205	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit M	—	—	—	—	—	2,23
702467158	SKP1-Like Protein 1B Isoform X1	—	—	7462,65	6180,43	7462,65	6180,43
702472013	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 14 Isoform X1	4521,25	—	4521,25	—	4521,25	—
702474097	Protein Suppressor Of K(+) Transport Growth	—	—	—	2,23	—	—
702474906	Cysteine Proteinase Inhibitor A	4,24	—	—	0,39	—	0,41
702477201	Leukotriene A-4 Hydrolase Homolog	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702483375	Subtilisin-Like Protease SBT1.4	—	—	—	2,19	2,11	—
702496920	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 27	4,74	—	11809,37	2492,49	11809,37	2492,49
702519133	Subtilisin-Like Protease SBT1.8	—	—	14592,13	9717,99	14592,13	9717,99
1091458127	Subtilisin-Like Protease SBT1.8	—	—	24251,67	15576,44	24251,67	15576,44
1091484243	Gamma-Glutamyl Hydrolase 2-Like	—	8237,79	0,00	—	—	0,00
1091503175	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RGLG1	—	—	21661,29	23380,61	21661,29	23380,61
1091504762	Probable Cytosolic Oligopeptidase A	—	—	2,55	—	—	2,26
1305212829	Proline Iminopeptidase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305220233	Atpase AAA-2 Domain Protein	0,00	—	—	10027,08	—	10027,08
1305220909	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 Variant 1D	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305226028	Proteasome Subunit Alpha Type-6	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305228508	Subtilisin-Like Protease	2,04	0,00	107387,33	—	2,26	52747,65
1305229720	T-Complex Protein 1 Subunit Alpha	—	—	0,49	0,49	0,43	—
1305246561	Serpin-ZX	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305254089	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 7 Homolog A	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305254475	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305255362	Proteasome Subunit Alpha Type-7	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1305260751	T-Complex Protein 1 Subunit Eta	—	54920,39	0,00	—	—	0,00
1305263053	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 11 Homolog	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305266613	Protein PEROXIN-4	2772,10	—	—	0,00	0,34	0,00
A0A058ZZ15	Autophagy-Related Protein 3	2054,05	—	2,01	0,00	3,91	0,00
A0A059A290	Grpe Protein Homolog	—	—	0,21	0,28	0,31	0,20
A0A059A9B2	Carboxypeptidase	0,30	—	3743,94	12623,77	3743,94	12623,77
A0A059AAA4	Cysteine Proteinase Inhibitor	—	—	—	—	—	0,37
A0A059ANI8	Fimbriata-Associated Protein	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059APP3	Ubiquitin Domain-Containing Protein DSK2b	—	—	—	—	—	2,11
A0A059AQK1	Proteasome Subunit Beta Type-7-A	—	—	15149,68	12844,92	15149,68	12844,92
A0A059AX35	ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit	—	—	2309,59	2909,29	2309,59	2909,29
A0A059B0F6	Lysosomal Pro-X Carboxypeptidase	—	—	0,25	0,46	0,30	0,38
A0A059B6T9	ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit	—	0,00	1379,82	0,47	0,28	2276,06
A0A059BDD0	Putative Papain-Like Cysteine Proteinase	—	4405,82	0,00	—	—	0,00
A0A059BHX8	Carboxypeptidase	—	—	—	2,16	—	—
A0A059BQ05	Cysteine Protease	—	—	0,41	0,31	0,49	0,26
A0A059BW35	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-17 Kda	0,45	—	—	—	—	2,18
A0A059BYC6	Proteasome Subunit Beta Type SV=1	—	—	2,43	—	—	—
A0A059CPK8	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 12 Homolog B	—	—	2,54	2,61	—	3,69
A0A059CY79	Aspartyl Aminopeptidase	—	—	0,49	0,49	0,41	—
A0A059DDR5	Putative Cathepsin B-Like Protease	—	—	5489,44	3446,86	5489,44	3446,86
Eucgr.A01109.2.p	Aspartic Proteinase	—	—	—	—	—	0,37
Eucgr.A02780.1.p	Tripeptidyl-Peptidase 2	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.B03874.1.p	Protein suppressor of K(+) transport growth defect 1	—	—	4394,68	4352,49	4394,68	4352,49
Eucgr.C02542.1.p	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 9	—	—	4493,57	4335,85	4493,57	4335,85
Eucgr.C03069.1.p	Aminopeptidase M1	0,41	—	0,41	—	0,29	—
Eucgr.C03295.1.p	20 Kda Chaperonin, Chloroplastic	—	2,30	2,13	3,77	4,90	—
Eucgr.D02202.1.p	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD8	—	—	—	0,49	—	—
Eucgr.E00356.2.p	ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit-Related Protein 4, Chloroplastic	—	—	11983,15	10077,69	11983,15	10077,69
Eucgr.F00026.3.p	Prolyl Tripeptidyl Peptidase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.F04241.1.p	At1g43690/F2J6_4	—	—	7013,53	6400,86	7013,53	6400,86
Eucgr.H00238.1.p	Methionine Aminopeptidase 2B	—	0,00	5762,53	—	—	4364,28

							Conclusão
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr.H02345.1.p	Lysosomal Pro-X Carboxypeptidase	—	—	26258,89	32655,54	26258,89	32655,54
Eucgr.H04377.1.p	Peptide-N(4)-(N-Acetyl-Beta-Glucosaminy)Asparagine Amidase	4906,22	—	4906,22	—	4906,22	—
Eucgr.H05072.1.p	Aspartic Proteinase Nepenthesin-1	—	—	13499,51	16945,65	13499,51	16945,65
Eucgr.I00183.1.p	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RGLG	—	—	19636,81	38442,07	19636,81	38442,07
Eucgr.I01305.1.p	Putative Papain-Like Cysteine Proteinase	—	—	2,92	—	2,23	2,29
Eucgr.I01402.1.p	Subtilisin-Like Protease	—	—	—	2,48	2,24	2,17
Eucgr.I01541.1.p	Aminoacylase-1	—	—	5907,29	6006,80	5907,29	6006,80
Eucgr.I02469.1.p	Xaa-Pro Aminopeptidase 2	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.I02515.1.p	Proline Iminopeptidase	—	—	2,63	2,39	2,91	2,16
Eucgr.J01907.1.p	Ubiquitin-Activating Enzyme E1 1	—	—	—	—	0,40	—
Eucgr.K00374.1.p	Dipeptidyl-Peptidase 4	—	—	0,39	0,41	0,42	0,38

Tabela 3 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Fotossíntese”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
309322456	Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit (Chloroplast)	2,18	—	—	0,33	—	0,42
442567278	ATP Synthase CF1 Beta Subunit (Chloroplast)	2,15	—	0,42	0,23	—	0,20
442568116	ATP Synthase CF1 Alpha Subunit (Chloroplast)	—	—	0,35	0,19	0,34	0,20
629107749	Glyoxylate/Hydroxypyruvate Reductase HPR3	—	—	11887,44	13503,62	11887,44	13503,62
629111640	Glycine Cleavage System H Protein 2, Mitochondrial	—	—	—	0,38	—	0,26
629114023	Ribulose Bisphosphate Carboxylase Small Chain	3627,70	—	—	0,00	—	0,00
629121291	60 Kda Chaperonin	—	—	2,27	—	2,11	—
702302319	Glycine Dehydrogenase (Decarboxylating), Mitochondrial	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702324789	Glyoxylate/Hydroxypyruvate Reductase HPR3-Like	—	—	4017,96	5410,47	4017,96	5410,47
702328087	Transketolase, Chloroplastic	—	—	0,04	0,03	0,04	0,03
702344766	Peroxisomal (S)-2-Hydroxy-Acid Oxidase Isoform X1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702516795	Aminomethyltransferase, Mitochondrial	—	—	2,44	2,21	—	2,71

Conclusão							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1091454258	Fructose-Bisphosphate Aldolase 6, Cytosolic	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
1305219194	Fructose-Bisphosphate Aldolase	–	0,00	–	0,00	0,00	–
1305225868	Fructose-Bisphosphate Aldolase	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
1305258003	Glycine Cleavage System P-Protein	0,00	–	–	1023,99	–	1023,99
A0A059A4U5	Fructose-Bisphosphate Aldolase	–	–	5,81	6,56	5,73	6,65
A0A059BUX7	Serine Hydroxymethyltransferase	–	0,00	–	0,00	0,00	–
A0A059CAL9	Glycine Cleavage System H Protein	16799,84	–	16799,84	–	16799,84	–
A0A059CB35	Aminomethyltransferase	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.C00646.1.p	Glycine Dehydrogenase (Decarboxylating), Mitochondrial	0,34	–	0,40	–	0,35	–
Eucgr.D00288.1.p	Peroxisomal (S)-2-Hydroxy-Acid Oxidase GLO5	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.F01476.1.p	Phosphoglycerate Kinase	–	–	4,94	9,66	6,78	7,03
Eucgr.J00865.1.p	Photosystem II Stability/Assembly Factor HCF136, Chloroplastic	–	2503,41	0,00	–	–	0,00

Tabela 4 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Metabolismo de aminoácidos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
444436384	SAM2-Like Protein, Partial	–	–	477090,62	631930,32	477090,62	631930,32
629084331	Mat	0,19	–	–	5,49	–	6,52
629085099	ACT Domain-Containing Protein ACR12	–	–	–	2,44	2,56	–
629088451	Cysteine Desulfurase, Mitochondrial	2,60	–	–	0,33	–	–
629096170	Alanine--Glyoxylate Aminotransferase 2 Homolog 1, Mitochondrial	–	–	0,23	0,13	0,21	0,14
629096801	Methionine S-Methyltransferase	–	–	–	–	0,46	–
629097699	Tryptophan Synthase Alpha Chain	0,00	–	–	1978,02	–	1978,02
629099631	5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Phospholyase	–	–	–	–	–	2,16
629101959	Homogentisate 1,2-Dioxygenase	0,37	–	0,21	–	0,19	–
629103972	Glutamate Decarboxylase 1	–	–	8,02	6,66	5,79	9,23
629105304	3-Isopropylmalate Dehydrogenase 3, Chloroplastic	–	–	2,02	–	–	–
629105879	Acetylornithine Aminotransferase, Mitochondrial	–	–	5,02	2,51	2,54	4,95

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629116659	Aspartate Aminotransferase, Chloroplastic	—	0,47	6,96	2,84	3,26	6,08
629117152	Alpha-Aminoadipic Semialdehyde Synthase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
629120404	Cysteine Synthase	—	—	0,08	0,14	0,12	0,09
702253961	Threonine Dehydratase Biosynthetic, Chloroplastic, Partial	—	0,00	5115,39	—	2,08	4618,37
702258922	Isoaspartyl Peptidase/L-Asparaginase 1	0,00	—	0,00	0,20	0,00	0,17
702280325	Arogenate Dehydratase/Prephenate Dehydratase 6, Chloroplastic-Like	0,28	—	0,42	2,25	—	—
702280598	Lactoylglutathione Lyase Isoform X3	—	—	—	0,47	—	0,45
702344666	Urease Accessory Protein G	—	—	—	2,05	2,21	—
702372792	Aspartate Aminotransferase	—	—	2,38	2,51	2,13	2,80
702381666	Erythronate-4-Phosphate+Dehydrogenase+Domain+Containing+Protein	2,47	—	13679,17	5546,97	13679,17	5546,97
702390519	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonate Aldolase 2, Chloroplastic	0,00	—	0,00	0,44	0,00	—
702424348	Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthase	—	—	—	0,49	—	—
702429235	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase 1, Chloroplastic, Partial	—	42629,57	—	67033,30	41986,37	—
702434675	Acetyl-CoA Acetyltransferase, Cytosolic 1-Like	—	—	2,14	—	2,09	2,03
702448550	Bifunctional 3-Dehydroquinase	—	0,00	57493,00	8,53	9,98	49164,86
702459755	Dehydratase/Shikimate Dehydrogenase, Chloroplastic Bifunctional Aspartate Aminotransferase And Glutamate/Aspartate-Prephenate Aminotransferase	—	—	—	—	0,45	—
702462384	Methylthioribose Kinase	—	—	2,67	—	2,17	2,33
702491068	Ketol-Acid Reductoisomerase, Chloroplastic	—	—	—	—	0,48	—
702492465	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702504882	Acetyl-CoA Acetyltransferase, Cytosolic 1	2866,61	—	—	0,00	0,44	0,00
702509064	Acetyl-CoA Acetyltransferase, Cytosolic 1	85627,87	—	85627,87	—	85627,87	—
1091439161	2-Isopropylmalate Synthase 2, Chloroplastic, Partial	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091449781	Cysteine Synthase Isoform X1	0,39	—	—	5,25	2,05	3,49
1091473701	Arginase 1, Mitochondrial Isoform X1	—	—	2,75	—	2,47	—
1091490056	5'-Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase 1	9166,43	—	9166,43	—	9166,43	—
1091513589	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase-Like	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00

Conclusão							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1212787758	Bifunctional 3-Dehydroquinate Dehydratase/Shikimate Dehydrogenase Variant 1 (Chloroplast)	4,25	—	0,03	0,00	0,02	0,01
1305213106	3-Isopropylmalate Dehydrogenase 2, Chloroplastic	—	15359,09	0,00	—	—	0,00
1305241469	Histidinol Dehydrogenase, Chloroplastic	—	0,00	—	0,00	0,00	—
1305245013	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305254749	Aspartate Aminotransferase	—	—	42186,88	21939,90	42186,88	21939,90
1305256387	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase	—	12,70	0,00	0,00	0,00	0,00
1305257014	Acetolactate Synthase Small Subunit	0,00	—	—	1575,92	—	1575,92
A0A058ZVR1	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase	—	0,00	—	0,00	0,00	—
A0A059A4T6	Acetolactate Synthase	—	—	0,47	0,40	0,37	—
A0A059A999	S-Adenosylmethionine Synthase	2,19	—	98809,22	45061,20	98809,22	45061,20
A0A059AL39	Aspartate Aminotransferase	—	0,00	25255,55	0,43	0,35	31178,46
A0A059BCZ3	5'-Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase 1	—	—	—	—	—	0,46
A0A059BQQ2	Ornithine Carbamoyltransferase, Chloroplastic	—	—	0,39	0,36	0,43	0,33
A0A059C4I5	3-Hydroxyisobutyryl-CoA Hydrolase 1	0,00	—	—	2979,80	—	2979,80
A0A059CBS9	Adenosylhomocysteinase	—	—	5,90	5,52	6,62	4,92
A0A059D4T0	Anthranilate Synthase Component 1	—	—	—	0,48	0,45	—
A0A059DEJ0	S-Adenosylmethionine Synthase	70984,11	—	70984,11	—	70984,11	—
A0A059DHE5	Aspartate Aminotransferase	—	—	0,49	0,27	0,43	0,31
Eucgr.A01368.1.p	Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase, Chloroplastic	2453,93	—	—	0,00	0,37	0,00
Eucgr.B02632.1.p	Glutamate Decarboxylase 4	—	—	31500,12	31539,77	31500,12	31539,77
Eucgr.C02894.1.p	Aspartate Aminotransferase 3, Chloroplastic	0,00	—	0,00	0,02	0,00	0,03
Eucgr.E00118.1.p	Cysteine Synthase	—	—	0,08	0,07	0,08	0,07
Eucgr.E00620.1.p	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	—	57184,53	0,00	—	—	0,00
Eucgr.F04303.1.p	Acetylornithine Aminotransferase, Mitochondrial	—	—	7300,52	6582,59	7300,52	6582,59
Eucgr.H04748.1.p	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonate Aldolase 2, Chloroplastic	0,14	—	0,12	—	0,19	—
Eucgr.H04748.1.p	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonate Aldolase 2, Chloroplastic	0,14	—	0,12	—	0,19	—
Eucgr.I01100.1.p	Methylthioribose Kinase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr.J00612.1.p	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase	—	—	0,14	0,20	0,12	0,25
Eucgr.K02531.1.p	Phosphoserine Phosphatase, Chloroplastic	—	—	—	2,20	—	2,25

Tabela 5 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Metabolismo de carboidratos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
473206	Mitochondrial Malate Dehydrogenase	–	–	56220.42	57236.23	56220.42	57236.23
1750380	NADP-Isocitrate Dehydrogenase	–	–	0.34	0.20	0.31	0.22
629082395	Malate Dehydrogenase	–	–	42174.36	36787.47	42174.36	36787.47
629084947	Succinyl-CoA Ligase	–	–	2.21	–	–	–
629087320	Malic Enzyme	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
629087822	ATP-Citrate (Pro-S-)-Lyase	–	–	0.44	–	0.47	–
629091897	Succinyl-CoA Ligase	–	–	–	2.83	–	–
629093959	Serine Hydroxymethyltransferase 4	–	–	–	2.06	–	2.08
629098655	ATP-Citrate Synthase	–	–	2.55	3.37	2.88	2.99
629101997	Malate Dehydrogenase, Mitochondrial	–	–	243010.11	180384.99	243010.11	180384.99
629103885	Fructokinase	–	–	3.35	4.73	4.46	3.55
629103979	UTP--Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase	–	–	0.47	0.46	0.44	0.49
629114007	Putative Glucose-6-Phosphate 1-Epimerase	2.12	–	–	0.26	–	0.29
629114493	NADP-Dependent Malic Enzyme	–	0.30	8.24	–	2.49	5.16
629114675	Sucrose Synthase 4	–	–	0.37	0.47	0.34	–
629118704	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 2, Cytosolic	–	–	2.12	3.09	–	3.61
629124923	Alpha Carbonic Anhydrase 7	2.09	–	32507.58	15526.44	32507.58	15526.44
702241361	Aconitate Hydratase, Cytoplasmic	–	–	–	2.13	–	–
702243502	Enolase-Like	–	–	–	0.45	0.46	–
702271122	Alpha-Glucan Phosphorylase, H Isozyme	–	–	4.69	3.28	2.74	5.60
702377371	Malate Dehydrogenase, Mitochondrial	–	0.00	6407.10	0.44	–	5058.87
702476999	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	–	–	0.50	–	–	0.50
702481505	Isocitrate Dehydrogenase	–	–	0.31	–	0.34	–
702486813	Formate Dehydrogenase, Mitochondrial	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
706715426	Sucrose Synthase-Like	–	–	193132.21	331269.25	193132.21	331269.25
1091439410	Aconitate Hydratase, Cytoplasmic	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
1091453828	Pyruvate Kinase, Cytosolic Isozyme	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
1091457676	NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
1091462385	Sucrose Synthase	–	–	–	2.33	–	–
1091491356	Pyruvate Kinase 1, Cytosolic	–	–	10.98	11.83	10.19	12.75

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1305213823	Isocitrate Dehydrogenase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305229439	Phosphoglycerate Mutase (2,3-Diphosphoglycerate-Independent)	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305240355	UTP--Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase 1	—	6.46	0.00	0.00	0.00	0.00
1305244559	Malic Enzyme	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305245696	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Cytosolic	—	2923.01	0.00	—	—	0.00
1305258954	Sucrose Synthase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305259943	Pyruvate Kinase	48688.03	2.36	2.14	0.00	5.05	0.00
1305260514	Serine Hydroxymethyltransferase	—	—	0.27	0.47	0.29	0.44
1305262121	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305262508	Methylenetetrahydrofolate Reductase	—	0.00	—	0.00	0.00	—
1305263630	Sucrose Synthase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305264652	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	—	—	49.84	59.23	87.33	33.80
A0A058ZYU3	Pyrophosphate--Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferase Subunit Beta OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=PFP-BETA PE=3 SV=1	—	—	0.21	0.28	0.28	0.21
A0A059AF54	Cofactor-Independent Phosphoglycerate Mutase	—	—	3.29	3.64	3.22	3.72
A0A059AGY2	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_J02288 PE=3 SV=1	—	—	0.48	0.33	0.49	0.33
A0A059AHB9	Folylpolyglutamate Synthase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_J02122 PE=3 SV=1	—	—	8910.87	9748.14	8910.87	9748.14
A0A059AHM7	Formate Dehydrogenase, Mitochondrial OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_J02207 PE=3 SV=1	—	—	—	3.12	—	2.40
A0A059ALQ0	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase	—	—	0.41	0.23	0.30	0.31
A0A059ANX6	NADPH-Dependent Mannose 6-Phosphate Reductase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059ARI2	Aconitate Hydratase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_I02307 PE=3 SV=1	—	—	—	2.03	—	2.79
A0A059AWD5	Pyruvate Kinase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_H00506 PE=3 SV=1	—	—	—	0.38	—	0.49
A0A059BC13	Xylose Isomerase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_G01193 PE=3 SV=1	—	—	—	2.32	—	2.20
A0A059BNR5	Phosphoenolpyruvate Carboxylase, Housekeeping Isozyme	—	—	0.48	0.46	0.42	—

Conclusão							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
A0A059CA91	Inositol-1-Monophosphatase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_E03917 PE=3 SV=1	—	—	2.95	—	2.37	2.19
A0A059CRL9	NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	—	10504.45	0.00	—	—	0.00
A0A059CS67	NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059CWK1	Phosphotransferase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_C03728 PE=3 SV=1	—	—	0.24	0.37	0.25	0.36
A0A059D6N7	Phosphoglucosomutase, Cytoplasmic	—	—	2.47	3.51	2.89	2.99
A0A059D6N8	Phosphoenolpyruvate Carboxylase Protein	—	—	0.40	0.40	0.35	0.46
A0A059DDF5	2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase	—	—	3.12	2.41	2.23	3.37
A0A059DKF8	ATP-Dependent 6-Phosphofructokinase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=PFK PE=3 SV=1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.A01955.1.p	Citrate Synthase	—	—	—	0.48	0.48	—
Eucgr.B00995.1.p	Aldose 1-Epimerase	—	—	—	0.42	—	0.43
Eucgr.B01499.1.p	Aldo-Keto Reductase Family 4 Member C9	0.00	—	0.00	0.17	0.00	0.18
Eucgr.B02610.1.p	C-1-Tetrahydrofolate Synthase, Cytoplasmic	—	—	—	—	—	2.08
Eucgr.C00956.1.p	ATP-Dependent 6-Phosphofructokinase 3	0.00	—	—	3458.35	—	3458.35
Eucgr.E01909.1.p	Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Beta Subunit	—	—	—	0.46	—	0.50
Eucgr.F00471.1.p	Xylulose Kinase	—	—	0.49	—	0.48	—
Eucgr.F03161.2.p	Acetyltransferase Component Of Pyruvate Dehydrogenase Complex	—	—	2.10	—	—	2.05
Eucgr.F03224.1.p	Ribokinase	—	—	2.62	2.50	2.41	2.72
Eucgr.H01421.1.p	Phosphoglucosamine Mutase Family Protein	—	—	7347.24	9762.98	7347.24	9762.98
Eucgr.H03316.1.p	Bnaa07g12540d Protein	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.J02049.2.p	Triosephosphate Isomerase, Cytosolic	—	—	—	—	2.20	—
Eucgr.K00816.1.p	Sucrose Synthase	—	—	5.42	17.76	10.55	9.13
Eucgr.K01314.1.p	Phosphoglycerate Mutase (2,3-Diphosphoglycerate- Independent)	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.K02019.1.p	S-Formylglutathione Hydrolase	—	—	79209.08	94988.76	79209.08	94988.76
Eucgr.K03506.1.p	Inositol Polyphosphate Multikinase Beta	—	—	8.58	6.28	7.40	7.29

Tabela 6 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Metabolismo de lipídeos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
108802652	Acetyl-Coa Carboxylase Carboxyltransferase Beta Subunit (Chloroplast)	0.00	–	–	4946.16	–	4946.16
545718920	Acetyl-Coa Carboxylase Beta Subunit (Chloroplast)	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
629094824	2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase	–	–	10742.28	8311.58	10742.28	8311.58
629095808	Lipoxygenase	–	–	0.50	0.50	0.42	–
629095988	3-Oxoacyl-	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
629102045	Multiprotein-Bridging Factor 1b	5.02	–	–	0.11	–	0.17
629112062	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase	–	0.00	1868.97	–	0.40	2830.26
629119088	HVA22-Like Protein A	8191.36	–	8191.36	–	8191.36	–
629119240	Glycerophosphodiester Phosphodiesterase GDPD6	69.88	–	0.02	0.00	0.01	0.00
629119573	Phosphoethanolamine N-Methyltransferase 1	–	–	38130.00	39937.69	38130.00	39937.69
629121819	Chaperone Protein DnaJ 15	–	–	2477.76	1289.17	2477.76	1289.17
629123696	GDP-Mannose-Dependent Alpha-Mannosyltransferase	–	0.00	–	0.00	0.00	–
629123712	Acyl-Coenzyme A Oxidase 4, Peroxisomal	0.29	0.00	3092.68	–	0.38	10548.77
702245301	Phospholipase A1-Iidelta	–	–	8408.09	9357.41	8408.09	9357.41
702260930	Stem-Specific Protein TSJT1	–	–	2.83	2.40	2.90	2.34
702277819	3-Oxoacyl-	–	–	18607.59	26156.46	18607.59	26156.46
702289504	Diacylglycerol Kinase 4	0.43	4667.02	–	10674.92	4584.09	2.29
702317275	Long Chain Base Biosynthesis Protein 1	–	–	0.20	0.32	0.18	0.37
702342140	Non-Specific Phospholipase C3	–	2.57	0.29	–	–	0.33
702362113	Universal Stress Protein PHOS34	–	–	16528.48	15370.82	16528.48	15370.82
702375152	12-Oxophytodienoate Reductase 2	–	–	26939.25	25612.86	26939.25	25612.86
702392479	Probable Carboxylesterase 2	–	–	0.46	0.44	0.49	0.41
702432686	Stearoyl-	0.00	–	–	3123.35	–	3123.35
702433338	Probable Aldo-Keto Reductase 2	7963.15	–	7963.15	–	7963.15	–
702442232	Glycolipid Transfer Protein 1	–	4603.90	6.36	21817.43	29265.12	4.74
702443634	Universal Stress Protein A-Like Protein Isoform X1	–	–	0.47	0.18	0.35	0.25
702448222	Probable Aldo-Keto Reductase 1	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
702462724	2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase-Like	–	–	–	0.40	–	0.41
702462729	2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase-Like	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
702463047	Probable NAD(P)H Dehydrogenase (Quinone) FQR1-Like 2	–	–	3188.92	4068.72	3188.92	4068.72

							Conclusão
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702489055	Acyl-Coa-Binding Domain-Containing Protein 2	—	—	1555.99	2552.69	1555.99	2552.69
702520305	Probable Aldo-Keto Reductase 2, Partial	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1091464696	Probable NAD(P)H Dehydrogenase (Quinone) FQR1-Like 1 Isoform X1	—	—	8954.18	13976.06	8954.18	13976.06
1091474638	3-Oxoacyl-	—	0.00	12825.80	—	—	11890.81
1091495135	Probable Aldo-Keto Reductase 2	—	—	—	2.85	2.32	2.32
1091506118	Probable NAD(P)H Dehydrogenase (Quinone) FQR1-Like 2	—	4838.98	2.72	15476.31	13171.61	3.20
1091510245	Neutral Ceramidase Isoform X2	—	—	0.13	0.16	0.21	0.10
1091520997	Probable Aldo-Keto Reductase 2 Isoform X2	—	—	17103.76	24669.60	17103.76	24669.60
A0A059AC14	Delta(24)-Sterol Reductase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059AUF5	Enoyl-Coa Delta Isomerase 2, Peroxisomal	—	6597.77	—	12786.54	12024.32	—
A0A059AUR9	Aldo/Keto Reductase	—	—	15843.63	10493.28	15843.63	10493.28
A0A059B695	Glyoxysomal Fatty Acid Beta-Oxidation Multifunctional Protein MFP-A	—	—	—	2.05	—	—
A0A059BGB3	Universal Stress Family Protein	2.73	0.00	4389.92	0.13	0.36	1607.63
A0A059BLB6	HVA22-Like Protein	4619.92	—	4619.92	—	4619.92	—
A0A059C233	Acyl-Coenzyme A Oxidase	—	—	0.41	0.38	0.35	0.45
A0A059DCP5	Probable Enoyl-Coa Hydratase 1, Peroxisomal	—	—	2.16	2.64	2.59	2.20
Eucgr.B02770.1.p	Carboxyltransferase Alpha Subunit	—	—	0.33	0.38	0.25	0.49
Eucgr.E00394.2.p	Palmitoyl Protein Thioesterase	—	—	3184.80	3662.05	3184.80	3662.05
Eucgr.E02482.3.p	187-Kda Microtubule-Associated Protein AIR9	0.49	—	0.47	—	0.48	—
Eucgr.F01710.1.p	Enoyl-Coa Hydratase 2, Peroxisomal	1260.93	—	0.29	0.00	0.32	0.00
Eucgr.F02479.1.p	Allene Oxide Cyclase	—	—	0.26	0.15	0.19	0.20
Eucgr.G02304.1.p	Chaperone Protein Dnaj 15	954.50	0.00	954.50	0.00	0.22	—
Eucgr.L03148.1.p	Aldo/Keto Reductase	—	—	8216.59	6682.59	8216.59	—

Tabela 7 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Metabolismo energético”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629079738	Probable NADH Dehydrogenase	2.55	–	–	0.37	–	0.24
629082101	NADH Dehydrogenase	11359.50	11869.99	–	–	11359.50	0.00
629089513	Cytochrome B-C1 Complex Subunit Rieske, Mitochondrial	0.34	–	–	4.33	–	4.02
629089630	Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase, Cytoplasmic Isoform 2	–	–	–	–	–	2.16
629091394	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta, Mitochondrial	–	4054.27	–	2121.15	3182.53	–
629101715	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Alpha, Mitochondrial	0.48	–	0.19	0.35	0.17	0.39
629121698	ATP Synthase Subunit Beta, Mitochondrial	–	–	266557.23	376604.17	266557.23	376604.17
629122313	NADH Dehydrogenase	4.35	–	12076.86	2774.48	12076.86	2774.48
702299223	(DL)-Glycerol-3-Phosphatase 2	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
702404893	NADH Dehydrogenase	–	–	44826.35	34943.63	44826.35	34943.63
702482029	Sulfite Oxidase Isoform X1	0.00	6755.79	0.00	3385.77	–	–
1091508701	Glutamine Synthetase Cytosolic Isozyme 2	–	27008.94	0.00	–	–	0.00
1091515759	Glyoxylate/Succinic Semialdehyde Reductase 1	–	–	2.06	2.44	2.60	–
1091517027	Mitochondrial Uncoupling Protein 1 Isoform X2	11357.70	–	0.45	0.00	–	0.00
1305230972	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 75 Kda Subunit, Mitochondrial	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059AHJ7	ATP Synthase Subunit Alpha	0.00	–	0.00	0.32	0.00	0.37
A0A059AT91	2-Hydroxy-3-Oxopropionate Reductase	–	–	5911.18	3969.44	5911.18	3969.44
A0A059BTG5	Glutamine Synthetase	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059C9K2	External Alternative NAD(P)H-Ubiquinone Oxidoreductase B2, Mitochondrial	0.00	2.78	0.00	0.47	0.00	0.17
A0A059CQI0	Cytochrome B-C1 Complex Subunit 7	–	–	13200.87	18694.77	13200.87	18694.77
A0A059DFA9	Glutamate Synthase 1	0.29	–	–	2.40	–	–
A0A059DH88	Prohibitin-1, Mitochondrial	–	–	–	2.08	2.00	–
Eucgr.A02097.5.p	Glutamate Dehydrogenase 1	0.00	–	0.00	0.18	0.00	0.16
Eucgr.B00038.1.p	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B	–	–	0.39	0.44	0.41	0.42
Eucgr.C00920.1.p	Copia-Like Retroelement Pol Polyprotein	7276.48	7831.46	–	–	7276.48	0.00
Eucgr.J01178.1.p	NADPH:Quinone Oxidoreductase	–	–	25527.03	28068.29	25527.03	28068.29

Tabela 8 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Metabolismo secundário”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
3023419	Recname: Full=Caffeoyl-Coa O-Methyltransferase	–	–	4.03	3.96	4.25	3.76
5739371	Caffeoyl-Coa O-Methyltransferase, Partial	0.21	–	19294.04	90546.52	19294.04	90546.52
255970299	Ferulate 5-Hydroxylase	0.42	–	32152.79	77261.89	32152.79	77261.89
259667060	Cinnamate Beta-D-Glucosyltransferase	0.35	–	3688.65	10589.33	3688.65	10589.33
261286637	4-Coumarate:Coa Ligase	–	13558.08	–	10275.66	8006.08	–
262474798	4-Coumarate:Coa Ligase	0.33	–	6530.60	19507.73	6530.60	19507.73
377823701	Phenylalanine Ammonia-Lyase	–	–	33961.90	67147.76	33961.90	67147.76
383081905	Phenylalanine Ammonia Lyase, Partial	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
383081911	Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductase	–	–	91756.91	97737.44	91756.91	97737.44
383081915	Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductase	53847.61	–	53847.61	–	53847.61	–
629080702	(R,S)-Reticuline 7-O-Methyltransferase	0.19	–	–	7.21	–	4.70
629087544	Cinnamoyl-Coa Reductase	–	–	12239.55	18649.90	12239.55	18649.90
629089495	Chalcone Synthase	5.74	–	–	0.12	–	0.23
629099662	Phenylalanine Ammonia-Lyase	0.10	–	2677.20	25963.18	2677.20	25963.18
629105177	Chalcone--Flavonone Isomerase	2.13	–	54.07	14.12	30.11	25.35
629119213	Flavonoid 3'-Hydroxylase	–	0.00	–	0.00	0.00	–
629119218	Flavanone 3'-Hydroxylase	–	–	16752.10	13325.22	16752.10	13325.22
629120160	MPBQ/MSBQ Methyltransferase	3768.67	–	3768.67	–	3768.67	–
629122740	Flavonoid 3'-Hydroxylase	2.24	–	0.07	0.02	0.05	0.03
629124643	Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase	–	–	361860.22	555133.45	361860.22	555133.45
629125337	4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase	3684.00	–	–	0.00	–	0.00
629125565	P-Coumarate 3-Hydroxylase	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
666787668	Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase	0.34	–	33396.33	98840.63	33396.33	98840.63
666787842	Caffeic Acid O-Methyltransferase	0.00	3.65	0.00	4.01	0.00	–
666787923	Ferulate 5-Hydroxylase	0.35	34184.33	–	78413.69	27598.63	2.29
702244604	Isopentenyl-Diphosphate Delta-Isomerase I	6160.74	–	0.20	0.00	0.14	0.00
702319593	Anthocyanidin Reductase	–	–	4.85	5.16	9.46	2.64
702335653	Isoflavone Reductase-Like Protein	–	–	12039.40	21838.17	12039.40	21838.17
702340189	Isoflavone Reductase Homolog	0.00	–	–	1359.78	–	1359.78
702380181	Inositol 4-Methyltransferase	–	–	8054.58	4125.17	8054.58	4125.17
702392108	Probable Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00

Continuação

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702400689	Probable Pinoresinol-Lariciresinol Reductase 3 Isoform X1	0.42	0.00	10079.28	5.44	2.27	24106.45
702411855	Heterodimeric Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Small Subunit, Chloroplastic	2.69	0.00	4037.76	0.30	—	1499.67
702422787	Diphosphomevalonate Decarboxylase MVD2	—	—	8624.14	6797.57	8624.14	6797.57
702423621	Phenylalanine Ammonia-Lyase	—	2.09	0.00	0.00	0.00	0.00
702443344	Probable Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase 1	—	—	8654.22	8385.76	8654.22	8385.76
702476550	Diphosphomevalonate Decarboxylase MVD2	—	—	—	—	—	2.06
702476946	Phenylalanine Ammonia-Lyase	0.37	—	39347.34	105903.73	39347.34	105903.73
702480318	UDP-Glycosyltransferase 71K1	0.45	7868.60	—	30589.93	13807.08	3.89
702482297	Naringenin,2-Oxoglutarate 3-Dioxygenase	—	—	2.04	—	—	—
702490544	(R,S)-Reticuline 7-O-Methyltransferase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
728834311	Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase	0.35	—	0.02	0.06	0.02	0.06
1091510129	Shikimate O-Hydroxycinnamoyltransferase	0.34	—	—	2.49	—	2.16
1091513971	4-Coumarate--CoA Ligase 2	2.69	—	—	0.36	—	0.48
1243914701	Phenylalanine Ammonia-Lyase	3.37	—	—	0.10	0.33	0.18
1305260377	Dihydroflavonol 4-Reductase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059AMK6	Probable 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase At3g49630	—	2449.55	8.02	23167.80	19636.31	9.46
A0A059B0U5	Putative NAD(P)H-Dependent Oxidoreductase 1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059C0X8	(+)-Pinoresinol Reductase	—	31561.81	4.33	120660.94	136640.45	3.82
A0A059C371	(+)-Pinoresinol Reductase	—	—	0.01	0.01	0.01	0.01
A0A059C3F6	Glycosyltransferase	—	—	14152.62	15868.59	14152.62	15868.59
A0A059CHC6	Leucoanthocyanidin Dioxygenase	2.37	—	3.01	—	2.14	—
A0A059CZ10	Leucoanthocyanidin Reductase	—	—	45942.20	33274.82	45942.20	33274.82
A0A059D1Q5	Isoflavone Reductase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059D5B8	Cinnamoyl-CoA Reductase	—	—	12607.93	8140.37	12607.93	8140.37
A0A059DDG3	Phenylalanine Ammonia-Lyase	0.00	—	—	17007.31	—	17007.31
A0A059DGW8	P-Coumarate 3-Hydroxylase	0.38	—	0.30	—	0.33	—
A0A059DI37	Protein STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 10	—	999.23	20.84	19420.75	20820.22	19.44
Eucgr.E01107.1.p	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase 2	15832.63	—	15832.63	—	15832.63	—
Eucgr.E01244.1.p	Glycosyltransferase	—	—	0.39	0.49	0.41	0.46
Eucgr.E01434.1.p	Dihydroflavonol 4-Reductase	0.48	—	0.41	—	—	—
Eucgr.F01589.1.p	Dihydroflavonol 4-Reductase	2.54	—	—	0.33	—	—
Eucgr.G02852.1.p	Phenylalanine Ammonia-Lyase	0.00	—	0.00	0.19	0.00	0.19
Eucgr.G03138.2.p	Probable Chalcone--Flavonone Isomerase 3	—	—	2.64	—	—	—

							Conclusão
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr.H02828.1.p	Chalcone Synthase	3.13	–	–	0.27	–	0.38
Eucgr.I02422.1.p	(+)-Pinoresinol Reductase	212182.02	–	212182.02	–	212182.02	–
Eucgr.J00529.1.p	Bifunctional Nitrilase/Nitrile Hydratase NIT4A	–	–	9852.71	14780.97	9852.71	14780.97
Eucgr.J01844.1.p	Cinnamate 4-Hydroxylase	–	–	3.87	4.99	4.31	4.49
Eucgr.L01334.1.p	(+)-Pinoresinol Reductase	23619.42	–	–	0.00	–	0.00

Tabela 9 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Outros metabolismos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, p<0,05) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629082724	Nucleoside Diphosphate Kinase 2, Chloroplastic	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
629090691	Dihydroorotate Dehydrogenase (Quinone), Mitochondrial	–	–	5632.07	6554.41	5632.07	6554.41
629093900	Spermidine Synthase	2.55	–	–	0.31	–	0.37
629103193	Adenine Phosphoribosyltransferase 1	2.80	–	–	0.50	–	–
629104750	Aspartate Carbamoyltransferase 3, Chloroplastic	–	–	0.32	0.24	0.32	0.24
629105494	Putative Methyltransferase At1g22800	–	–	2515.15	1287.17	2515.15	1287.17
629106854	Adenine Phosphoribosyltransferase 5	–	0.00	19268.85	0.45	–	11644.74
629112777	Adenine Phosphoribosyltransferase 3	–	–	2225.53	1481.31	2225.53	1481.31
629123894	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase	–	1876.92	3.49	9936.51	6549.49	5.29
629126466	Nucleoside Diphosphate Kinase 1	3.51	–	–	0.31	–	0.32
702238094	Probable Uridine Nucleosidase 2	–	–	4.29	3.58	4.12	3.73
702239523	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase	–	2.24	0.00	0.00	0.00	0.00
702245612	Ribose-Phosphate Pyrophosphokinase 4 Isoform X1	1276.80	–	0.14	0.00	0.09	0.00
702247997	Adenylosuccinate Synthetase 2, Chloroplastic	–	–	0.31	0.32	0.24	0.42
702259056	Agmatine Deiminase	–	0.00	24288.03	–	–	24592.04
702337062	GMP Synthase	–	–	0.06	0.10	0.07	0.09
702345876	Nudix Hydrolase 15, Mitochondrial Isoform X1	–	–	1282.93	1654.48	1282.93	1654.48
702346842	Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase	–	–	8544.21	11746.64	8544.21	11746.64

Continuação

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702362003	Phosphoribosylaminoimidazole-Succinocarboxamide Synthase, Chloroplastic	489.34	2.07	0.08	0.00	0.17	0.00
702364656	Protochlorophyllide Reductase, Chloroplastic	737.91	—	0.09	0.00	0.12	0.00
702379440	Uridine Kinase-Like Protein 3 Isoform X1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
702380191	Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase, Chloroplastic Isoform X1	—	—	0.45	—	0.45	—
702422674	7-Methylguanosine Phosphate-Specific 5'-Nucleotidase A	—	16129.56	—	6590.80	8730.56	0.41
702475248	Putative NAD Kinase 3 Isoform X1	—	—	8447.03	7330.23	8447.03	7330.23
702495472	Dihydropyrimidine Dehydrogenase (NADP(+)), Chloroplastic	—	—	12699.23	10819.57	12699.23	10819.57
702497226	Adenylate Kinase 4	—	14232.51	0.00	—	—	0.00
702499059	Soluble Inorganic Pyrophosphatase 4	—	—	0.23	0.30	0.27	0.26
702515340	Phosphoribosylformylglycinamide Cyclo-Ligase, Chloroplastic	—	—	0.40	0.32	0.45	0.28
1091453050	Nudix Hydrolase 1	1080.49	—	1080.49	—	1080.49	—
1091486783	UMP-CMP Kinase 3	0.00	0.00	—	—	0.00	43189.26
1091491615	Bifunctional Riboflavin Kinase/FMN Phosphatase Isoform X1	—	—	4074.24	6532.84	4074.24	6532.84
A0A059ABQ9	Dihydropyrimidinase	—	—	—	3.61	2.42	2.46
A0A059ARY0	Soluble Inorganic Pyrophosphatase	—	—	21877.81	16828.04	21877.81	16828.04
A0A059ASG1	Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059AWU3	Nudix Hydrolase 7	—	0.00	—	0.00	0.00	—
A0A059AWU5	Nudix Hydrolase 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059B685	Cytidine Deaminase	2.15	—	2.77	—	2.65	—
A0A059BB30	Beta-Ureidopropionase	—	0.00	—	0.00	0.00	—
A0A059BFZ0	Nicotinate-Nucleotide Pyrophosphorylase	3.56	—	7897.24	2217.23	7897.24	2217.23
A0A059BNN1	Deoxyuridine 5'-Triphosphate Nucleotidohydrolase	—	—	30194.28	28108.13	30194.28	28108.13
A0A059BQH5	Uridine Kinase	—	—	2.45	3.04	2.25	3.32
A0A059DEM8	Soluble Inorganic Pyrophosphatase 4	2.10	—	34244.77	16302.47	34244.77	16302.47
A0A059DGE1	Apyrase 2	3657.51	—	3657.51	—	3657.51	—
Eucgr.A01518.1.p	Uridine Nucleosidase 1	3990.22	—	3990.22	—	3990.22	—
Eucgr.B00131.1.p	Adenylate Kinase	—	—	4.01	2.39	2.79	3.42
Eucgr.D01166.1.p	UMP-CMP Kinase 3	0.00	—	—	31299.32	—	31299.32
Eucgr.D02652.1.p	Soluble Inorganic Pyrophosphatase	2675.75	—	0.15	0.00	0.13	0.00

Identificação	Descrição	Conclusão					
		Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr.I02775.1.p	Phosphoribosylamine--Glycine Ligase	—	—	4005.04	3844.22	4005.04	3844.22
Eucgr.J00283.1.p	Uricase	—	—	—	2.04	—	—

Tabela 10 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Processos celulares”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
70779685	Putative Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase, Partial	2.20	—	15673.63	7124.65	15673.63	7124.65
109509132	Polygalacturonase, Partial	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
153799893	Beta-Tubulin	0.32	—	—	2.89	—	2.26
383082017	Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase 3, Partial	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
444436423	CIP-Like Protein, Partial	0.00	—	—	3758.64	—	3758.64
527190689	UDP-D-Glucuronate Carboxy-Lyase	—	2.53	2.64	13.26	6.67	5.24
629080766	Structural Constituent Of Cell Wall, Putative	0.00	—	0.00	—	0.00	—
629080956	Trifunctional UDP-Glucose 4,6-Dehydratase/UDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Glucose 3,5-Epimerase/UDP-4-Keto-L-Rhamnose-Reductase RHM1	—	—	0.28	0.23	0.26	0.24
629081038	Cell Division Control Protein 48 Homolog A	—	—	85463.52	121614.97	85463.52	121614.97
629081441	Mitochondrial Fission 1 Protein A	—	—	—	0.36	—	0.27
629083850	Actin-2	—	—	0.45	0.43	—	0.34
629086635	Prohibitin-3, Mitochondrial	—	—	11964.16	20533.30	11964.16	20533.30
629087407	Katanin P60 Atpase-Containing Subunit A1	—	—	—	0.46	—	0.38
629089780	Kinesin Light Chain-Like Protein	—	0.00	4832.24	2.67	—	8699.12
629090061	Alpha-1,4-Glucan-Protein Synthase	—	—	0.09	0.13	0.08	0.14
629091289	Putative Vesicle-Associated Membrane Protein 726	0.47	—	0.33	—	—	—
629094140	Pectate Lyase	0.40	—	—	2.75	—	2.46
629095152	Kinesin-Like Protein	0.48	—	—	3.21	—	2.91
629095914	Photosynthetic NDH Subunit Of Lumenal Location 5, Chloroplastic	—	—	0.48	—	—	—
629096136	Annexin	—	—	141159.98	137200.14	141159.98	137200.14
629097292	Beta-Xylosidase/Alpha-L-Arabinofuranosidase 2	—	—	34718.73	43835.95	34718.73	43835.95

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629098507	Probable Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 5	—	57817.12	0.00	—	—	0.00
629100331	Actin-Related Protein 7	—	—	2.15	3.53	—	4.11
629101837	F11P17.17 Protein	0.30	—	2743.65	9227.12	2743.65	9227.12
629102505	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	—	—	0.28	0.49	0.40	0.34
629103664	F-Actin-Capping Protein Subunit Beta	2.50	—	8564.27	3429.48	8564.27	3429.48
629106514	Phosphomannomutase	—	—	2.02	2.24	2.55	—
629106945	Plant UBX Domain-Containing Protein 8	—	—	0.26	0.30	0.23	0.33
629112664	Bifunctional Dtdp-4-Dehydrorhamnose 3,5-Epimerase/Dtdp-4-Dehydrorhamnose Reductase	—	—	—	—	2.01	—
629113403	Actin-7	0.50	—	13789.17	27627.72	13789.17	27627.72
629114504	Profilin	—	33262.69	4.04	95488.07	134270.48	2.87
629118560	Annexin	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
629118961	Nephrocystin-3	0.44	—	4343.89	9846.71	4343.89	9846.71
629122940	UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 1	—	—	2.28	2.03	—	2.41
629124196	Ppiase	—	8670.05	2.63	27034.47	22807.11	3.12
629124468	UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase 1	—	—	—	0.47	—	—
629124532	Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 3A	—	—	0.45	—	—	—
629124561	Probable Polygalacturonase	0.49	—	4539.81	9339.25	4539.81	9339.25
629126139	At5g53310/K19e1_11	—	—	1054.79	1472.66	1054.79	1472.66
702240152	Cell Division Control Protein 2 Homolog C	—	—	16.87	20.07	24.39	13.88
702241997	Actin-Depolymerizing Factor 2	—	—	0.49	0.32	—	0.30
702245574	Peroxisomal And Mitochondrial Division Factor 2	—	—	9132.35	6432.26	9132.35	6432.26
702269984	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase CYP19-3 Isoform X1	—	—	0.49	—	—	0.49
702271676	UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase 6	—	—	—	3.07	2.00	2.69
702277245	Probable Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 33	—	—	6942.04	6752.58	6942.04	6752.58
702280663	AP-1 Complex Subunit Gamma-2	—	—	2.39	2.79	—	3.37
702301546	Syntaxin-32-Like	2.82	—	0.22	0.10	0.27	0.08
702323177	Protein SEH1	0.00	—	—	2114.02	—	2114.02
702326488	Probable Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 27	—	7442.90	—	3883.88	6321.99	—
702334059	Probable Polygalacturonase Isoform X1	—	—	—	0.28	0.45	0.35
702336509	Armadillo Repeat-Containing Kinesin-Like Protein 3	—	—	0.31	0.40	0.28	0.46
702339705	Actin-7	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
702352113	Pectinesterase-Like	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702360854	Beta-Xylanase	—	—	6990.79	12313.13	6990.79	12313.13
702362389	Tubulin Alpha Chain	—	—	179485.86	285569.34	179485.86	285569.34
702363118	Syntaxin-51 Isoform X1	—	—	18512.68	17179.56	18512.68	17179.56
702364850	3-Deoxy-Manno-Octulosonate Cytidylyltransferase, Mitochondrial	—	—	—	0.48	—	0.43
702371971	Probable Beta-D-Xylosidase 7	—	0.46	5.08	3.15	2.35	6.80
702374110	TOM1-Like Protein 2	—	—	—	2.79	—	2.09
702389783	Beta-Xylosidase/Alpha-L-Arabinofuranosidase 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
702407137	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	—	—	—	0.34	—	0.36
702420055	65-Kda Microtubule-Associated Protein 6	0.18	—	2925.34	16463.59	2925.34	16463.59
702422707	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 53 A	5387.28	0.28	2.24	0.00	—	0.00
702433596	Annexin D5	251.42	—	0.06	0.00	0.06	0.00
702450253	Annexin D2-Like	—	—	285685.74	306258.99	285685.74	306258.99
702463664	Actin-Depolymerizing Factor 5	9807.26	0.00	9807.26	0.00	—	—
702465118	Glucuronokinase 1	—	—	0.37	—	0.36	—
702466654	Pectinesterase-Like	4324.15	—	0.10	0.00	0.10	0.00
702472066	UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase 1 Isoform X1	—	—	0.45	—	—	—
702473726	Alpha-L-Fucosidase 1	—	0.00	6242.80	—	—	10473.16
702474602	Exoglucanase	—	—	2.42	2.15	—	3.05
702474825	Syntaxin-61	—	—	—	—	2.05	—
702474842	Cyclin-Dependent Kinase C-2	—	—	2407.45	2790.51	2407.45	2790.51
702477497	Annexin-Like Protein RJ4 Isoform X1	3646.37	—	—	0.00	—	0.00
702479363	Probable Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein B	—	—	2.13	2.44	2.79	—
702483015	Pectinesterase 3-Like	—	—	—	0.33	0.45	0.44
702484529	Golgi SNAP Receptor Complex Member 1-1	2.11	—	1270.52	603.51	1270.52	603.51
702485636	Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein 11	0.27	—	3711.41	13767.23	3711.41	13767.23
702491534	Cell Division Cycle Protein 48 Homolog	—	—	0.31	0.32	0.28	0.35
702494878	Exocyst Complex Component SEC8	—	—	—	2.93	—	—
702497207	SNF1-Related Protein Kinase Regulatory Subunit Gamma-1	0.00	—	—	5708.98	—	5708.98
1091446927	Vesicle Transport V-SNARE 13	0.00	0.00	—	2.50	0.00	21698.70
1091478282	Protein MOR1-Like	0.00	—	—	5900.55	—	5900.55
1091482078	65-Kda Microtubule-Associated Protein 1	—	—	0.31	0.28	0.23	0.39
1091489146	UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase 5	—	—	—	2.70	—	2.03
1091504184	Actin-101	—	—	0.33	0.43	0.28	—
1091522484	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 53 A	—	0.00	—	0.00	0.00	—

Continuação

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1305221663	Beta-Coat Protein	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305222426	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305229109	Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 5	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305231788	Clathrin Heavy Chain 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305245695	Prohibitin-1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305245840	Coatomer Subunit Delta	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305251776	Tubulin Alpha-1 Chain	0.00	—	—	3661.57	—	3661.57
1305256703	Actin-7	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305259776	Actin	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305259793	Actin Depolymerizing Factor	—	160322.36	0.00	—	—	0.00
1305262780	Coatomer Subunit Epsilon	24702.43	15521.86	—	—	24702.43	0.00
1305265026	SH3 Domain-Containing Protein 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1388788000	Beta-Tubulin, Partial	8758.59	—	—	0.00	—	0.00
A0A059A185	Vesicle-Associated Protein 4-2	—	—	5173.35	5268.63	5173.35	5268.63
A0A059A2H8	Tubulin-Folding Cofactor B	6692.62	—	6692.62	—	6692.62	—
A0A059A2Y8	Tubulin-Folding Cofactor E	—	786.95	—	1125.74	1400.46	—
A0A059BAK6	Beta-Xylosidase/Alpha-L-Arabinofuranosidase 2	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059BID0	Annexin D4	3557.26	—	3557.26	—	3557.26	—
A0A059BJM7	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	—	—	2.76	2.60	2.46	2.91
A0A059BP04	Trifunctional UDP-Glucose 4,6-Dehydratase/UDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Glucose 3,5-Epimerase/UDP-4-Keto-L-Rhamnose-Reductase RHM1	0.00	0.00	—	0.39	0.00	599.89
A0A059BS82	Annexin	38694.96	3.52	—	0.00	3.14	0.00
A0A059BS83	Annexin	—	—	3.08	3.17	3.24	3.02
A0A059BU64	Expansin-A13	—	—	4258.95	3054.04	4258.95	3054.04
A0A059BZ01	Coatomer Subunit Beta OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_F04015 PE=4 SV=1	—	—	—	2.41	—	2.07
A0A059CDL9	Protein MOR1	0.39	—	—	3.31	—	3.56
A0A059CG22	UDP-Glucose 4-Epimerase	—	—	0.23	0.12	0.17	0.17
A0A059CMC8	Profilin (Fragment)	—	—	0.19	0.10	0.15	0.12
A0A059CRL6	Galacturonokinase	—	—	—	—	—	2.24
A0A059CTW5	Vesicle-Associated Membrane Protein 713	—	—	0.50	—	0.48	—
A0A059DAA9	Vesicle-Associated Membrane Protein 714	—	4112.36	—	5881.57	6772.54	—
Eucgr.A02473.1.p	Kinesin-Like Protein KIN-7K, Chloroplastic	—	—	—	5.40	2.95	3.51
Eucgr.B01762.1.p	Trafficking Protein Particle Complex Subunit 6B	—	—	2.20	4.16	3.33	2.76
Eucgr.B02433.1.p	Kinesin-Like Protein KIN-5D	—	—	0.29	0.39	0.25	0.45
Eucgr.D01025.1.p	UDP-Arabinose 4-Epimerase 1	9317.63	—	2.33	0.00	—	0.00

Identificação	Descrição	Conclusão					
		Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr.D01026.1.p	Coatomer Subunit Epsilon	—	—	4.09	4.37	5.23	3.42
Eucgr.F00650.2.p	Microtubule-Associated Protein MAP65-1a	—	—	0.48	0.37	—	0.34
Eucgr.G01186.1.p	Tubulin Alpha-1 Chain	—	44097.66	—	19495.35	34629.18	0.44
Eucgr.G01711.1.p	Coatomer Subunit Alpha	0.49	—	—	—	—	—
Eucgr.G02481.1.p	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase NIMA-Interacting 4	5177.50	—	5177.50	—	5177.50	—
Eucgr.H01055.1.p	Probable Beta-D-Xylosidase 2	—	—	0.34	—	0.40	—
Eucgr.H03058.1.p	Actin-Depolymerizing Factor	2.39	—	2.06	—	—	—
Eucgr.H05116.1.p	Auxilin-Related Protein 1	—	0.00	7146.02	6.57	7.15	6568.57
Eucgr.I00240.1.p	Actin-7	—	—	546488.32	710171.08	546488.32	710171.08
Eucgr.I01663.1.p	Ribosome-Recycling Factor	—	—	0.49	0.37	0.42	0.43
Eucgr.J00379.1.p	Alpha-L-Fucosidase 1	0.00	—	—	1192.06	—	1192.06
Eucgr.J00413.1.p	UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 1	—	—	0.49	0.37	0.47	0.39
Eucgr.K02133.1.p	Galacturonosyltransferase 8	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.K02506.1.p	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase 3	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabela 11 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Redox”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
111434271	Cu/Zn Superoxide Dismutase, Partial	—	—	—	0,38	—	0,37
397770467	Cu/Zn Superoxide Dismutase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
629086952	Thioredoxin Reductase 2	—	—	35120,79	30197,48	35120,79	30197,48
629088855	5-Oxoprolinase	—	—	0,27	0,39	0,23	0,47
629089735	Glutaredoxin	12293,13	—	12293,13	—	12293,13	—
629102427	Thioredoxin	—	—	35560,46	24417,03	35560,46	24417,03
629116241	Glutaredoxin-C4	2,30	—	—	—	—	—
629117983	Probable Steroid-Binding Protein 3	—	—	14614,18	12161,01	14614,18	12161,01
629123241	Probable Glutathione Peroxidase 2	3,45	9579,86	—	1907,40	6572,28	0,20
702253927	Peroxiredoxin-2E-1, Chloroplastic	—	—	21131,31	15551,37	21131,31	15551,37
702301679	Two-On-Two Hemoglobin-3	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702315825	Thioredoxin O2, Mitochondrial	2986,68	—	2986,68	—	2986,68	—
702375665	Protein Disulfide Isomerase-Like 1-6 Isoform X3	—	—	—	2,04	—	2,17

Identificação	Descrição	Conclusão					
		Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702463685	L-Ascorbate Peroxidase 3, Peroxisomal	—	—	0,35	0,33	—	0,22
702465786	Thioredoxin H2	—	—	2,17	2,95	3,85	—
702518670	Superoxide Dismutase	0,00	—	—	12707,55	—	12707,55
1041572004	Glutathione Reductase	—	—	8363,62	10419,59	8363,62	10419,59
1091481004	Catalase Isozyme 3 Isoform X3	—	—	9,56	18,96	15,91	11,40
1091481575	Catalase Isozyme 1-Like	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091517771	Thioredoxin H-Type Isoform X1	2,23	—	—	—	2,42	—
1305220902	2-Cys Peroxiredoxin BAS1, Chloroplastic	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305240895	Ascorbate Peroxidase	—	2,80	0,00	0,00	0,00	0,00
1305253942	Protein Disulfide-Isomerase	—	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
1305261423	Protein Disulfide-Isomerase Like 2-1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305264396	Cytochrome B5	—	44056,34	0,00	—	—	0,00
A0A059AQF9	Glutaredoxin	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059B2J7	Glutathione Reductase	—	—	34164,53	23727,03	34164,53	23727,03
A0A059BQT6	Catalase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_F01777 PE=3 SV=1	—	—	0,49	—	0,45	—
A0A059BUW0	Thioredoxin	6137,07	—	—	0,00	—	0,00
A0A059BYQ4	Stroma Ascorbate Peroxidase	—	—	—	0,43	—	0,44
A0A059C2I3	Glutathione Peroxidase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_E00579 PE=3 SV=1	2,37	—	3,32	—	3,12	—
A0A059D204	Peroxiredoxin-2F, Mitochondrial	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059DDL6	L-Ascorbate Peroxidase 2, Cytosolic	—	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr,B02118,1,p	Bifunctional GDP-Fucose Synthetase	—	0,00	69194,42	3,38	4,57	51133,03
Eucgr,B02496,1,p	Protein Disulfide-Isomerase	—	—	7515,22	10791,54	7515,22	10791,54
Eucgr,B03930,1,p	Superoxide Dismutase	2,37	—	0,43	0,19	0,44	0,18
Eucgr,C01134,1,p	NADH-Cytochrome B5 Reductase-Like Protein	—	—	—	0,47	—	0,42
Eucgr,F01776,1,p	Catalase	—	2,53	2,52	7,71	6,38	3,05
Eucgr,F03438,1,p	Protein Disulfide-Isomerase 5-4	—	—	6,55	8,94	5,15	11,36
Eucgr,G01295,1,p	Thioredoxin Domain-Containing Protein 9 Homolog	—	4,04	3,00	8,98	12,11	2,22
Eucgr,H00059,1,p	Cytochrome B5	—	—	2,75	—	3,59	—
Eucgr,J00124,1,p	Superoxide Dismutase	—	—	—	—	—	0,50
Eucgr,J00965,1,p	Cytosolic Ascorbate Peroxidase	—	—	0,40	0,38	0,46	0,33
Eucgr,K00245,1,p	Membrane Steroid-Binding Protein 2	2,34	—	—	0,42	—	0,40
Eucgr,K03531,1,p	Protein Disulfide Isomerase	—	—	7,00	5,17	5,60	6,46
Eucgr,L02937,1,p	Cytochrome B5 Reductase	—	—	42347,07	61717,39	42347,07	61717,39

Tabela 12 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Sinalização”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629089223	Protein XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER	2.03	–	2383.44	1172.59	2383.44	1172.59
629089432	Calcium-dependent protein kinase 4	3.12	–	–	0.19	–	0.21
629091788	Probable inactive receptor kinase At1g48480	–	–	3.08	3.86	2.81	4.25
629092007	GTPase	–	–	32517.74	24419.55	32517.74	24419.55
629099904	Phosphoinositide phospholipase C	0.29	–	0.40	–	0.44	–
629100363	Ras-related protein RABA4c	–	0.00	10944.90	–	–	9181.18
629101103	14-3-3-like protein	–	–	2.05	–	2.02	–
629104033	Nuclear pore complex protein NUP50B	–	–	8198.27	8954.48	8198.27	8954.48
629110316	Ras-related protein RABB1c	0.48	–	2796.18	5795.76	2796.18	5795.76
629120129	Ca ²⁺ binding protein cbp1	0.00	2.81	0.00	–	0.00	–
629124481	Ras-related protein RABE1c	–	–	15397.71	13893.33	15397.71	13893.33
629124716	Calmodulin binding protein IQD22	0.00	–	–	797.56	–	797.56
629125209	14-3-3-like protein GF14 mu	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
702240205	probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g49770	–	–	6196.17	9863.13	6196.17	9863.13
702256549	plant intracellular Ras-group-related LRR protein 9	–	0.00	7578.99	–	–	9595.83
702271040	pleckstrin homology domain-containing protein 1	–	–	–	2.87	–	2.49
702304996	ras-related protein Rab7	–	17929.45	–	13571.58	11371.06	–
702315563	plasma membrane-associated cation-binding protein 1	3202.26	–	3202.26	–	3202.26	–
702322210	rho GDP-dissociation inhibitor 1	–	–	7873.97	10081.27	7873.97	10081.27
702333470	ras-related protein RABA3	–	–	13094.74	14350.59	13094.74	14350.59
702334750	COP9 signalosome complex subunit 1	–	–	2.31	2.54	2.03	2.89
702342129	Calcium-binding EF-hand-containing protein	–	–	124630.38	68146.39	124630.38	68146.39
702363713	calcium-dependent protein kinase 2	15.31	–	0.23	0.02	0.24	0.01
702365380	ras-related protein RABA1f	2.87	–	24153.19	8420.38	24153.19	8420.38
702370325	14-3-3-like protein B	–	–	–	2.01	2.21	–
702375637	ras-related protein Rab7	–	21084.94	–	15061.85	19324.57	–
702414207	epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	0.47	–	–	2.64	–	–
702422639	calcium-dependent protein kinase 1	–	–	0.00	0.00	0.00	0.00
702423603	BTB/POZ domain-containing protein At5g03250	–	–	5.26	4.89	6.17	4.18
702433635	calmodulin	4.97	–	–	0.20	–	0.17
702484392	PTI1-like tyrosine-protein kinase At3g15890	–	18775.42	–	16894.16	16306.31	–

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702486716	mitogen-activated protein kinase homolog NTF6	0.00	—	—	1255.65	—	1255.65
702495326	probable calcium-binding protein CML27	2855.96	—	2855.96	—	2855.96	—
1091440314	ras-related protein RABA5c	—	—	—	2.20	2.60	—
1091499095	nitrogen regulatory protein P-II homolog	3667.71	—	3667.71	—	3667.71	—
1305217207	14-3-3-like protein GF14 omega	3.03	—	0.15	0.06	0.18	0.05
1305222456	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1305233811	PTI1-like tyrosine-protein kinase At3g15890	0.32	—	2065.44	6361.01	2065.44	6361.01
1305246394	Rac-like GTP-binding protein RHO1	—	0.00	—	0.00	0.00	—
A0A059A3H5	Probable calcium-binding protein CML49	—	—	17252.83	15061.45	17252.83	15061.45
A0A059A5G5	Ras-related protein RABA6b	2.65	—	—	0.31	—	0.22
A0A059AV49	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	—	—	15490.53	9911.41	15490.53	9911.41
A0A059B4I9	RAN GTPase-activating protein 2	—	—	0.44	0.32	0.28	—
A0A059B5M3	Protein ELONGATED EMPTY GLUME	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059BAC7	Ras-related protein RABG3e	—	—	—	—	—	0.48
A0A059BJZ3	14-3-3-like protein GF14 omicron	—	—	2.94	2.19	3.29	—
A0A059BSH6	Calcium-dependent protein kinase 11	—	—	—	0.45	—	—
A0A059BST6	At3g15680	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059BVM0	Ras-related protein RABA1f	—	—	—	0.46	—	0.36
A0A059BVT5	EH domain-containing protein 1	—	—	5866.12	6998.46	5866.12	6998.46
A0A059C0L5	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	—	—	9413.21	9164.58	9413.21	9164.58
A0A059C127	Ras-related protein RABD2a	—	—	16074.08	21008.93	16074.08	21008.93
A0A059C713	Ras-related protein Rab-11A	—	—	31438.89	16667.79	31438.89	16667.79
A0A059C8I1	Ras-related protein Rab-11A	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059CAG4	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1846.30	—	1846.30	—	1846.30	—
A0A059CF43	Ras-related protein RABA5a	—	—	2778.92	2136.46	2778.92	2136.46
A0A059CR72	COP9 signalosome complex subunit 5b	—	—	—	0.44	—	0.45
A0A059CUZ4	WD repeat-containing protein VIP3	—	—	9598.60	8341.93	9598.60	8341.93
A0A059CY33	14-3-3-like protein GF14 phi	—	—	7.69	5.83	6.63	6.77
A0A059D4D4	Ran-specific GTPase-activating protein 1	—	—	126723.58	74609.39	126723.58	74609.39
A0A059D4R1	Phosphoinositide phospholipase C	—	4066.25	—	1969.50	2863.48	0.48
Eucgr.A00407.1.p	GDP dissociation inhibitor	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.A01913.4.p	14-3-3-like protein GF14 mu	2597.42	—	2597.42	—	2597.42	—
Eucgr.B00458.1.p	At1g18840	—	—	1976.18	3039.75	1976.18	3039.75
Eucgr.B01429.1.p	Calreticulin-3	3.30	—	—	0.27	—	0.32
Eucgr.B02298.1.p	Ras-related protein Rab11C	—	—	0.41	0.29	0.48	0.25
Eucgr.B02907.1.p	Nudix hydrolase 25	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.D02119.1.p	Ras-related protein RABD2c	—	18582.98	—	68819.22	36650.79	3.70

Identificação	Descrição	Conclusão					
		Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr.E01779.1.p	Calcium-binding EF-hand-containing protein	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.E04057.1.p	Calcium-dependent protein kinase	2.03	—	0.17	0.10	0.21	0.08
Eucgr.F02482.1.p	14-3-3-like protein GF14 psi	—	—	2.95	2.67	3.46	2.27
Eucgr.F03278.2.p	Small GTP Rab11	—	—	—	—	—	0.50
Eucgr.H00308.1.p	IQD1	—	—	2.60	6.68	4.11	4.23
Eucgr.H00877.1.p	SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-2	—	0.00	8769.97	12.22	17.84	6005.95
Eucgr.I02331.1.p	Rac-like GTP-binding protein RHO1	0.00	—	0.00	0.33	0.00	0.44
Eucgr.J01221.1.p	Iq-domain 14, putative isoform 1	—	—	5592.86	10836.05	5592.86	10836.05

Tabela 13 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Transporte”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, p<0,05) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629087195	Developmentally-Regulated G-Protein 1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
629118324	V-Type Proton ATPase Subunit F	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
629121414	V-Type Proton ATPase Subunit F	5.71	—	2477.92	433.72	2477.92	433.72
702245435	V-Type Proton ATPase Subunit D	—	—	2.05	—	2.30	—
702278692	Mitochondrial Dicarboxylate/Tricarboxylate Transporter DTC	—	—	2.13	2.69	2.69	2.14
702290328	Temperature-Induced Lipocalin-1	0.32	—	18.83	85.37	27.62	58.20
702370093	Mitochondrial Import Inner Membrane Translocase	—	—	—	0.44	—	0.42
702439457	V-Type Proton ATPase Subunit H	—	—	2.87	2.78	2.34	3.42
1091482626	Gamma-Glutamylcyclotransferase 2-3 Isoform X1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1091486897	V-Type Proton ATPase Subunit B 1-Like Isoform X1	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
1091487384	V-Type Proton ATPase Subunit C	0.00	—	0.00	—	0.00	—
1305217669	Dicarboxylate/Tricarboxylate Carrier	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
A0A059AG31	Porin/Voltage-Dependent Anion-Selective Channel	—	—	2.63	2.85	2.70	2.79
A0A059AJZ3	V-Type Proton ATPase Catalytic Subunit A	—	—	0.48	—	—	—
A0A059BJQ0	Adenine Nucleotide Translocator	—	—	19020.48	21498.85	19020.48	21498.85
A0A059BXY8	V-Type Proton ATPase Subunit B	—	—	0.20	0.22	0.23	0.19
A0A059CH73	Plasma Membrane Intrinsic Protein	—	—	8349.02	10508.25	8349.02	10508.25
Eucgr.G01943.1.p	V-Type Proton ATPase Subunit C	32543.66	—	32543.66	—	32543.66	—
Eucgr.J02824.1.p	Developmentally-Regulated G-Protein 1	—	—	3.72	—	2.22	2.97

Tabela 14 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Transcrição e Tradução”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
383081879	LIM Transcription Factor	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629076550	DNA-Damage-Repair/Toleration Protein DRT102	–	–	–	2,06	2,72	–
629080013	Probable Mediator Of RNA Polymerase II Transcription Subunit 36b	3,20	–	21444,23	6707,31	21444,23	6707,31
629081687	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 37	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629082787	60S Ribosomal Protein L27a-2	42106,04	–	42106,04	–	42106,04	–
629083309	60S Ribosomal Protein L12-1	–	–	39228,14	28580,00	39228,14	28580,00
629083575	U6 Snrna-Associated Sm-Like Protein Lsm4	0,00	0,00	–	6,66	0,00	2735,77
629083882	40S Ribosomal Protein S11-1	–	–	0,40	0,37	0,43	0,35
629086562	F4P13,11 Protein	–	0,00	4048,40	0,45	0,40	4586,83
629086917	RNA Recognition Motif-Containing Protein	2097,52	1170,31	–	–	2097,52	0,00
629087008	40S Ribosomal Protein SA	–	–	0,46	0,48	0,43	0,50
629087429	Histone H2A	2,17	–	–	–	–	0,40
629088030	Protein BOLA2	4193,34	–	4193,34	–	4193,34	–
629090028	40S Ribosomal Protein S19-1	–	–	0,06	0,04	0,08	0,03
629090896	EF1Bgamma Class Glutathione S-Transferase	–	–	2,27	2,07	–	3,23
629091269	Transcriptional Corepressor LEUNIG_HOMOLOG	–	–	4252,91	4823,04	4252,91	4823,04
629091706	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit H	–	–	–	2,06	2,51	–
629094008	40S Ribosomal Protein S4	4,59	–	234129,15	50957,55	234129,15	50957,55
629094248	60S Ribosomal Protein L23	2,78	–	–	0,29	–	0,27
629096503	Vacuolar Sorting-Associated-Like Protein	–	–	8139,46	8669,44	8139,46	8669,44
629099297	60S Ribosomal Protein L44	–	0,41	36,04	7,66	14,66	18,82
629099426	40S Ribosomal Protein S17-1	2,25	–	–	–	–	0,48
629100006	40S Ribosomal Protein S26-3	–	–	2,42	–	–	–
629100357	Leucine Rich Repeat Protein	–	–	14788,09	11024,19	14788,09	11024,19
629100361	SURP And G-Patch Domain-Containing Protein 1	0,40	–	244,38	614,76	244,38	614,76
629100807	Homeobox Protein Knotted-1-Like 6	4372,61	0,11	65,73	0,00	6,98	0,02
629101944	DNA-Binding Family Protein	–	–	0,44	0,48	0,42	0,50
629102565	At5g42220/K5j14_2	0,49	–	0,47	–	0,45	–
629103969	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit J	–	–	–	–	2,08	–
629104581	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD5	–	–	4953,76	7117,71	4953,76	7117,71

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629106500	Remorin	—	—	25087,27	13068,89	25087,27	13068,89
629109090	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E	—	—	20873,17	18928,92	20873,17	18928,92
629110965	40S Ribosomal Protein S14-1	2,69	—	—	0,28	—	0,21
629110969	60S Ribosomal Protein L18a	—	—	52385,42	30357,96	52385,42	30357,96
629112501	Bnaa08g15030d Protein	0,00	—	0,00	0,34	0,00	0,29
629112896	(S)-Ureidoglycine Aminohydrolase	—	—	26544,00	22969,72	26544,00	22969,72
629114518	F14M2,18 Protein	—	—	4361,13	6459,12	4361,13	6459,12
629114523	3'-5' Exonuclease Domain-Containing Family Protein	—	—	4279,05	4144,64	4279,05	4144,64
629114706	M1Pi	—	—	8393,29	4922,29	8393,29	4922,29
629116044	AT2G24420 Protein	—	0,00	38239,10	—	2,25	26439,58
629116218	60S Acidic Ribosomal Protein P3	—	—	18391,99	13973,67	18391,99	13973,67
629118725	60S Ribosomal Protein L7a	—	—	—	0,48	—	0,41
629119381	40S Ribosomal Protein S7	—	—	—	—	2,08	—
629122346	60S Ribosomal Protein L34	—	—	2,13	—	2,05	—
629122879	60S Ribosomal Protein L10a	0,26	—	0,48	2,14	—	—
629123790	40S Ribosomal Protein S4	—	—	111372,88	75455,63	111372,88	75455,63
629124115	30S Ribosomal Protein S5	—	—	3330,96	1760,75	3330,96	1760,75
629124389	60S Ribosomal Protein L12	—	—	—	0,36	0,46	0,42
629126260	60S Ribosomal Protein L36-2	—	—	2930,16	2150,10	2930,16	2150,10
702236827	Probable Transcription Factor Posf21 Isoform X1	523,56	—	523,56	—	523,56	—
702246347	Binding Partner Of ACD11 1 Isoform X1	—	—	2,40	4,88	3,15	3,72
702248600	60S Ribosomal Protein L21-2	—	0,00	40880,41	2,05	3,08	27224,92
702249389	Mrna-Decapping Enzyme-Like Protein Isoform X1	—	—	0,47	—	0,42	—
702256315	28 Kda Ribonucleoprotein, Chloroplastic	1433,72	—	0,16	0,00	0,16	0,00
702258521	40S Ribosomal Protein S19-3-Like	—	—	5,67	8,49	8,76	5,50
702263429	Basic Leucine Zipper And W2 Domain-Containing Protein 2 Isoform X1	—	—	—	0,47	0,50	—
702263471	Membrane-Associated Protein VIPP1, Chloroplastic	1988,91	—	1988,91	—	1988,91	—
702276876	60S Ribosomal Protein L27a-3	—	—	95927,35	82739,72	95927,35	82739,72
702289753	Eukaryotic Translation Initiation Factor	—	—	8943,08	10652,91	8943,08	10652,91
702290743	Octicosapeptide/Phox/Bem1p And Tetratricopeptide Repeat Domain-Containing Protein	0,33	—	838,81	2565,23	838,81	2565,23
702291614	Translation Machinery-Associated Protein 22	—	—	0,30	0,44	0,43	0,31
702303791	Pre-Mrna Cleavage Factor Im 25 Kda Subunit 1	—	—	0,34	—	—	0,39
702306225	110 Kda U5 Small Nuclear Ribonucleoprotein Component CLO	—	—	0,06	0,08	0,05	0,10

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702315577	DNA Replication Licensing Factor MCM6 Isoform X1	1097,24	—	0,21	0,00	0,22	0,00
702325754	Salt Tolerance Protein 1	—	0,00	49855,05	28,67	29,49	48478,46
702339253	Glycine-Rich RNA-Binding Protein-Like Isoform X1	—	—	—	0,45	—	0,46
702344505	60S Ribosomal Protein L32-1	—	—	12415,18	10882,59	12415,18	10882,59
702347555	40S Ribosomal Protein S18	—	—	—	0,43	—	0,35
702350402	At1g11480/T23J18_15	—	0,01	2049,15	9,41	11,75	1640,91
702352556	Bnaa07g23940d Protein	2063,02	—	2063,02	—	2063,02	—
702364532	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD5 Isoform X2	—	0,00	—	0,00	0,00	—
702373554	Polypyrimidine Tract-Binding Protein Homolog 3	—	2012,88	3,57	5921,12	7186,12	2,94
702379840	Probable Eukaryotic Translation Initiation Factor 5-1	2,01	0,00	2134,09	0,18	0,37	1060,97
702382263	40S Ribosomal Protein S18	—	—	76420,67	54768,93	76420,67	54768,93
702389649	60S Ribosomal Protein L24-Like	—	—	85295,05	57411,71	85295,05	57411,71
702402624	DNA Replication Licensing Factor MCM4	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702407805	Glycine-Rich Protein 2	—	0,00	92720,51	2,37	2,49	88042,07
702420320	Protein C2-DOMAIN ABA-RELATED 7-Like	—	—	15003,16	10576,22	15003,16	10576,22
702423433	Elongation Factor 1-Alpha	—	—	0,06	0,12	0,11	0,07
702431007	60S Ribosomal Protein L35-2	0,00	—	—	12945,03	—	12945,03
702432250	40S Ribosomal Protein S15-4	2,42	—	0,20	0,06	0,15	0,08
702434281	40S Ribosomal Protein S8	—	—	90424,00	85056,89	90424,00	85056,89
702438258	Putative Mitochondrial Ribosomal Protein L28	—	0,00	6153,10	2,41	2,91	5090,35
702441199	60S Ribosomal Protein L13a-4	6893,12	—	6893,12	—	6893,12	—
702449162	60S Ribosomal Protein L22-2	0,19	—	8071,42	42697,14	8071,42	42697,14
702449588	60S Ribosomal Protein L17-2 Isoform X1	—	—	19041,45	12665,16	19041,45	12665,16
702450603	Histone H3,2	22372,53	—	22372,53	—	22372,53	—
702450701	50S Ribosomal Protein L17	4118,47	—	4118,47	—	4118,47	—
702459214	50S Ribosomal Protein L15	—	—	2283,30	2631,46	2283,30	2631,46
702463130	Cyclase-Associated Protein 1	56820,42	—	56820,42	—	56820,42	—
702464697	60S Ribosomal Protein L7a-1	6,58	0,00	20074,37	0,36	2,38	3053,01
702466165	Glycine-Rich RNA-Binding Protein 4, Mitochondrial	—	—	12910,27	9994,89	12910,27	9994,89
702469032	BZIP Transcription Factor	291,60	—	—	0,01	—	0,00
702469189	60S Ribosomal Protein L3	—	—	8563,86	5604,49	8563,86	5604,49
702472492	40S Ribosomal Protein S26-3	—	—	52385,42	33675,49	52385,42	33675,49
702473182	60S Ribosomal Protein L35a-3	—	—	24,15	26,44	30,70	20,79
702474777	UBP1-Associated Protein 2B-Like	—	—	2,65	2,42	2,07	3,09
702477124	Elongation Factor 1-Alpha Isoform X1	0,31	—	0,04	0,25	0,08	0,13

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702478233	Polypyrimidine Tract-Binding Protein Homolog 1 Isoform X1	0,47	—	3,37	4,15	—	7,12
702480970	60S Ribosomal Protein L23a-Like	—	—	102253,77	81439,55	102253,77	81439,55
702483351	Oligouridylate-Binding Protein 1B	4332,61	—	0,41	0,00	—	0,00
702483682	ESCRT-Related Protein CHMP1B	17095,00	—	—	0,00	—	0,00
702488530	Remorin Isoform X1	2,91	—	4872,00	1673,30	4872,00	1673,30
702493461	Zinc Finger CCCH Domain-Containing Protein 14	—	0,00	3310,45	—	—	4349,52
702493563	Carbon Catabolite Repressor Protein 4 Homolog 1	1101,26	—	0,22	0,00	0,20	0,00
702496224	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-2	—	—	—	—	—	0,44
702517976	Translation Initiation Factor Eif-2B Subunit Epsilon-Like Isoform X1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702520577	RNA-Binding Protein Musashi Homolog Rbp6-Like, Partial	0,00	5261,41	0,00	2676,72	—	—
1091450481	40S Ribosomal Protein S21-2	2,38	—	4106,81	1728,43	4106,81	1728,43
1091455814	40S Ribosomal Protein S12 Isoform X1	1246,63	0,31	0,50	0,00	0,15	0,00
1091458160	ATP-Dependent RNA Helicase Dbp-5	—	—	—	2,25	—	—
1091458538	DNA-Directed RNA Polymerases II And IV Subunit 5A	2931,87	—	2931,87	—	2931,87	—
1091461426	Bnac07g43660d Protein	—	0,00	2332,10	2,12	—	4319,46
1091470860	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G, Partial	0,00	—	—	3166,73	—	3166,73
1091485468	Ribonuclease P Protein Subunit P25-Like Protein Isoform X1	4864,00	—	4864,00	—	4864,00	—
1091487480	Mitotic Checkpoint Protein BUB3,3	2,35	—	—	0,29	—	0,33
1091491442	Single-Stranded DNA-Binding Protein WHY1, Chloroplastic Isoform X1	3394,90	—	—	0,00	—	0,00
1091492408	Small Nuclear Ribonucleoprotein Sm D1-Like Isoform X1	2,23	12769,60	—	7115,87	15895,04	—
1091494143	60S Ribosomal Protein L17-2-Like	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091501861	Bnac01g00750d Protein	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091509275	Staphylococcal-Like Nuclease CAN2 Isoform X1	7,45	—	—	0,10	—	0,10
1091511580	60S Ribosomal Protein L10a	—	2,98	3,99	7,51	11,90	2,52
1091513344	Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunit Alpha-Like Protein 2	—	—	7450,80	4241,32	7450,80	4241,32
1091518800	60S Ribosomal Protein L5	—	—	0,21	0,10	0,17	0,12
1305217005	Protein BTR1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305230345	Binding Partner Of ACD11 1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305236561	Putative Ribosomal Protein S10	3,10	0,22	5,62	0,41	—	—

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1305237206	40S Ribosomal Protein S21-1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305237631	40S Ribosomal Protein S1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305251070	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A	—	0,00	21169,24	3,16	5,32	12572,00
1305255547	THO Complex Subunit 4C	0,00	—	—	21541,65	—	21541,65
1305255869	60S Ribosomal Protein L9	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305259962	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 38	—	2869,99	0,00	—	—	0,00
1305261861	60S Ribosomal Protein L18a-2	12592,02	—	12592,02	—	12592,02	—
1305266620	40S Ribosomal Protein S1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A058ZSA1	DNA-Directed RNA Polymerases II, IV And V Subunit 8B	2,27	—	—	0,45	—	0,46
A0A058ZTE3	Transcriptional Corepressor LEUNIG	2457,28	—	2457,28	—	2457,28	—
A0A058ZWL4	Bnaa06g09130d Protein	—	—	18195,49	14738,13	18195,49	14738,13
A0A059A441	40S Ribosomal Protein S19-1	2,11	—	—	0,28	—	0,27
A0A059A5N9	60S Ribosomal Protein L17-2	—	—	0,30	0,19	0,23	0,25
A0A059AAU3	Histone H3,2	—	77645,65	—	57030,23	98961,46	—
A0A059AC63	60S Ribosomal Protein L35	—	—	32984,78	22787,64	32984,78	22787,64
A0A059AJQ9	Os08g0110800 Protein	0,45	0,00	2549,99	—	0,26	5641,50
A0A059AKN9	Small Nuclear Ribonucleoprotein E	—	—	26235,06	22225,36	26235,06	22225,36
A0A059ASJ4	60S Ribosomal Protein L8-1	—	—	—	0,50	—	0,46
A0A059ATB3	Polyadenylate-Binding Protein 2	6415,19	—	2,73	0,00	—	0,00
A0A059AUB0	60S Ribosomal Protein L14-2	—	—	63879,75	41407,47	63879,75	41407,47
A0A059AYV3	Bnaa03g53770d Protein	—	—	5054,13	3839,15	5054,13	3839,15
A0A059B6H7	Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein	0,00	0,00	—	—	0,00	4324,20
A0A059B6Z1	60S Ribosomal Protein L17	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059BJN4	LIM Domain-Containing Protein WLIM1	—	—	3216,99	1930,51	3216,99	1930,51
A0A059BKL7	40S Ribosomal Protein S6	—	—	6,31	3,89	6,52	3,76
A0A059BR71	Nucleic Acid Binding Protein	—	—	8317,64	9271,71	8317,64	9271,71
A0A059BU35	ATP-Dependent RNA Helicase Eif4a	—	12000,22	—	7769,55	13803,19	—
A0A059BW66	AT-Hook Motif Nuclear-Localized Protein 10	—	—	—	3,13	—	—
A0A059BXD8	60S Ribosomal Protein L7-2	7,09	—	—	0,13	—	0,10
A0A059C040	Binding Partner Of ACD11 1	—	—	1997,00	1719,69	1997,00	1719,69
A0A059C6G4	DNA Helicase	—	—	0,20	0,10	0,18	0,11
A0A059CKD9	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A	3,42	—	122909,94	35924,98	122909,94	35924,98
A0A059CKM6	MOB Kinase Activator-Like 1A	—	—	2576,14	1837,94	2576,14	1837,94
A0A059D538	ALY Protein	—	—	0,48	0,50	—	0,29
A0A059DB65	60S Ribosomal Protein L38	2,28	—	2,09	—	—	—

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
A0A059DFQ4	Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunit Alpha	2,30	—	—	0,26	—	0,29
A0A059DH70	60S Ribosomal Protein L18a-2	31301,86	—	31301,86	—	31301,86	—
A0A059DJZ2	Remorin	—	—	11866,57	17916,34	11866,57	17916,34
A0A059DKE6	Ribosomal Protein L15	—	—	18023,86	17643,51	18023,86	17643,51
Eucgr,A00378,1,p	60S Acidic Ribosomal Protein P2B	2,04	—	89452,19	43952,11	89452,19	43952,11
Eucgr,A00774,1,p	Transcription Elongation Factor TFIIS	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr,A01414,1,p	Polyadenylate-Binding Protein-Interacting Protein 10	—	—	3084,54	4585,11	3084,54	4585,11
Eucgr,A02940,1,p	Polyadenylate-Binding Protein 1	2837,77	—	2837,77	—	2837,77	—
Eucgr,A02974,1,p	Binding Partner Of ACD11 1	—	—	2,29	2,10	2,57	—
Eucgr,B00467,1,p	40S Ribosomal Protein S9-2	—	—	0,35	0,27	0,23	0,40
Eucgr,B00553,1,p	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A	—	—	0,20	0,24	0,39	0,12
Eucgr,B01570,1,p	Cell Division Cycle 5-Like Protein	—	0,00	4167,55	—	—	6287,60
Eucgr,B01908,1,p	Putative 60S Ribosomal Protein L18-1	—	—	0,38	0,30	0,34	0,33
Eucgr,B02473,1,p	Elongation Factor 1-Alpha	—	—	29652,82	40420,65	29652,82	40420,65
Eucgr,B03786,1,p	60S Ribosomal Protein L30	3,47	—	—	0,28	—	0,30
Eucgr,C00931,1,p	60S Ribosomal Protein L31	—	—	11680,34	22818,68	11680,34	22818,68
Eucgr,C01159,1,p	NHP2-Like Protein 1	2623,30	—	2623,30	—	2623,30	—
Eucgr,C01584,1,p	La Protein 1	2,65	3,29	—	2,24	5,94	—
Eucgr,C02730,1,p	40S Ribosomal Protein S11-1	—	—	46020,04	32014,11	46020,04	32014,11
Eucgr,C03783,1,p	SNW/SKI-Interacting Protein	—	1306,17	2,15	3091,00	2807,91	2,37
Eucgr,D01033,1,p	Charged Multivesicular Body Protein	1735,56	1110,52	—	—	1735,56	0,00
Eucgr,D01975,1,p	AT-Hook Motif Nuclear-Localized Protein 1	—	—	2803,97	2739,25	2803,97	2739,25
Eucgr,D02096,1,p	60S Ribosomal Protein L15	—	—	11848,90	19892,43	11848,90	19892,43
Eucgr,D02508,1,p	40S Ribosomal Protein S14-1	2,29	3907,61	29,41	50071,81	114905,81	12,81
Eucgr,E01220,3,p	60S Ribosomal Protein L13-1	—	—	9649,80	7420,13	9649,80	7420,13
Eucgr,E03898,1,p	Putative Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1-Like	—	—	0,28	0,19	0,23	0,24
Eucgr,F00193,1,p	Polyadenylate-Binding Protein 2	—	—	—	2,07	—	2,51
Eucgr,F00411,1,p	Aspartyl Protease AED3	—	—	0,13	0,10	0,09	0,16
Eucgr,F00624,1,p	Bnaa01g15770d Protein	—	2795,40	2,77	6782,26	7748,86	2,43
Eucgr,F00627,1,p	40S Ribosomal Protein S8	—	0,01	267,87	2,75	2,69	273,98
Eucgr,F01820,1,p	Bnaa07g32790d Protein	—	—	—	—	2,12	—
Eucgr,F02033,1,p	SNF2 Transcription Factor	2,39	—	—	0,31	—	0,30
Eucgr,F02243,1,p	Pollen-Specific Protein SF3	2,40	—	73979,87	30837,21	73979,87	30837,21
Eucgr,G02690,1,p	40S Ribosomal Protein S25	—	—	0,03	0,02	0,03	0,03
Eucgr,G03244,2,p	Translation Initiation Factor Eif-2B Subunit Beta	—	—	2,40	2,94	2,76	2,55

Conclusão							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr,H00136,1,p	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1	4,43	—	2,73	—	3,07	—
Eucgr,H00286,1,p	60S Ribosomal Protein L5	—	—	3,74	2,08	3,15	2,46
Eucgr,H01084,1,p	60S Ribosomal Protein L19	2,05	—	22423,74	10916,82	22423,74	10916,82
Eucgr,H02962,1,p	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E	—	—	—	0,50	—	0,47
Eucgr,H03028,1,p	60S Ribosomal Protein L14-2	—	—	33622,42	26025,34	33622,42	26025,34
Eucgr,H04516,4,p	40S Ribosomal Protein S21	2,58	—	8132,40	3157,42	8132,40	3157,42
Eucgr,H04551,1,p	60S Ribosomal Protein L18-2	—	—	11,63	6,27	8,61	8,47
Eucgr,I00520,1,p	Polyadenylate-Binding Protein 3	1813,50	—	0,40	0,00	—	0,00
Eucgr,I00692,2,p	Ruvb-Like 2	—	—	—	0,50	0,49	—
Eucgr,I01282,1,p	40S Ribosomal Protein S25-2	2,08	—	6,89	—	4,00	3,31
Eucgr,I01335,1,p	BZIP Transcription Factor Bzip28	1214,75	—	0,26	0,00	0,42	0,00
Eucgr,I01553,3,p	Histone Deacetylase 19	3016,90	4,29	2,76	0,00	11,82	0,00
Eucgr,I01561,1,p	Eukaryotic Peptide Chain Release Factor Subunit 1	—	0,00	24650,82	—	—	25144,68
Eucgr,J01044,1,p	Glycine-Rich RNA-Binding Protein RZ1C	2,34	—	8771,45	3741,18	8771,45	3741,18
Eucgr,J01085,1,p	Mrna-Decapping Enzyme Subunit 2	—	—	2539,61	3254,67	2539,61	3254,67
Eucgr,J01359,2,p	KH Domain-Containing Protein	—	—	0,41	—	0,39	—
Eucgr,J01600,1,p	THO Complex Subunit 4 ^a	—	—	2,43	—	2,67	—
Eucgr,J02422,1,p	60S Ribosomal Protein L8-1	—	—	223698,35	230175,22	223698,35	230175,22
Eucgr,J03099,1,p	Protein RAE1	3,16	0,00	3594,98	3,07	9,70	1136,55
Eucgr,K00276,1,p	60S Ribosomal Protein L36-2	—	—	15711,65	8244,00	15711,65	8244,00
Eucgr,K00657,2,p	Hnrnp	—	—	—	0,41	0,47	0,48
Eucgr,K01091,1,p	Single-Stranded DNA-Bindig Protein WHY2, Mitochondrial	—	—	13833,54	10448,91	13833,54	10448,91
Eucgr,K01327,1,p	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 53	—	0,00	7513,74	0,38	—	3775,00
Eucgr,K01363,1,p	Elongation Factor Ts, Mitochondrial	—	0,00	11335,10	—	—	11454,90
Eucgr,K01667,2,p	Stomatal Closure-Related Actin-Binding Protein 3	1207,95	—	0,15	0,00	0,13	0,00
Eucgr,K02138,1,p	FHA Domain-Containing Protein FHA2	—	1636,81	—	1616,94	2978,56	—
Eucgr,K02304,1,p	Protein Argonaute 1 ^a	0,16	—	0,15	—	0,18	—
Eucgr,K02637,1,p	H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2	3488,36	—	3488,36	—	3488,36	—
Eucgr,K02766,1,p	MA3 Domain-Containing Protein	—	—	18878,92	34694,05	18878,92	34694,05
Eucgr,K02807,1,p	Histone Deacetylase 6	—	—	4945,24	4043,25	4945,24	4043,25
Eucgr,K03154,1,p	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD6	—	—	9,99	10,74	10,64	10,08
Eucgr,K03211,1,p	40S Ribosomal Protein S23-1	—	—	4,47	3,38	4,08	3,70
Eucgr,K03512,2,p	60S Ribosomal Protein L19-2	0,45	—	6416,38	14191,70	6416,38	14191,70
Eucgr,L00752,1,p	60S Ribosomal Protein L7-2	0,31	—	5068,40	16572,19	5068,40	16572,19

Tabela 15 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Outros processos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/C3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
219891448	Peroxidase 63	2,94	–	–	0,18	–	0,28
219908187	Probable Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase	–	–	–	–	2,49	–
629080155	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 26A	3886,78	–	–	0,00	–	0,00
629080231	Mitochondrial Import Inner Membrane Translocase Subunit Tim17/Tim22/Tim23 Family Protein	–	9732,63	–	6688,02	7630,97	–
629081002	Glutathione S-Transferase F9	–	–	178339,00	168010,80	178339,00	168010,80
629081465	CDPK-Related Kinase 1	0,00	–	–	5027,36	–	5027,36
629081970	Putative Quinone-Oxidoreductase Homolog, Chloroplastic	–	–	0,47	–	–	–
629081984	Nuclear Transport Factor 2 And RNA Recognition Motif Domain-Containing Protein	–	0,00	10554,21	5,03	5,87	9049,40
629082061	Probable Beta-1,4-Xylosyltransferase IRX10L	–	0,00	11624,10	0,37	–	6634,70
629082354	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 57 Kda Regulatory Subunit B' Alpha Isoform	–	–	1827,74	1193,23	1827,74	1193,23
629082958	Patellin-6	–	–	–	2,43	2,40	–
629083719	Alcohol Dehydrogenase	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629085981	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g56460	0,22	–	0,22	–	0,11	–
629086035	Serine/Threonine-Protein Phosphatase	–	1373,05	4,27	4997,85	5856,85	3,64
629087462	Bnac03g75170d Protein	6,19	–	5,53	–	5,43	–
629087882	Probable Glucan 1,3-Alpha-Glucosidase	–	–	–	–	–	2,54
629088000	Adh1	–	33457,66	0,00	–	–	0,00
629088001	Alcohol Dehydrogenase 1	–	–	10624,92	11367,07	10624,92	11367,07
629088965	Dem Protein	–	–	5371,14	8006,96	5371,14	8006,96
629089786	2-Methylene-Furan-3-One Reductase	–	49055,30	0,00	–	–	0,00
629090354	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 35A	–	–	0,50	–	0,44	–
629092994	Serine/Threonine-Protein Phosphatase BSL1	–	–	0,46	0,49	0,41	–
629093807	Signal Recognition Particle Receptor Subunit Beta	–	–	4037,49	2303,23	4037,49	2303,23
629094250	Acid Phosphatase 1	–	–	0,47	0,30	0,43	0,32
629095085	Serine/Threonine-Protein Kinase PBS1	–	–	0,30	0,15	0,17	0,26
629095199	Epoxide Hydrolase 1	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629095392	Novel Plant SNARE 13	–	5790,64	–	6553,73	6454,87	–
629097841	Vacuolar-Sorting Receptor 3	–	0,00	5748,23	4,10	3,04	7745,09

Continuação

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629097963	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Protein-Tyrosine-Phosphatase PTEN2A	—	—	0,44	—	—	—
629099946	Ferritin	—	4082,44	2,78	9734,18	11366,53	2,38
629102615	MGC114892 Protein	0,00	4116,15	0,00	1349,01	—	0,33
629103837	2-Hydroxyacyl-CoA Lyase	0,40	—	—	—	—	2,24
629104102	Glycosyltransferase	2,39	—	6745,67	2827,11	6745,67	2827,11
629105050	Peroxidase 64	—	—	108605,84	120982,81	108605,84	120982,81
629105154	Aldehyde Dehydrogenase	—	0,00	23516,10	2,29	2,65	20302,65
629105425	Mannosyl-Oligosaccharide 1,2-Alpha-Mannosidase MNS1	0,00	10270,97	0,00	4295,96	—	0,42
629105484	Probable Protein Phosphatase 2C 44	—	—	689,06	1249,62	689,06	1249,62
629105629	Peroxidase	—	—	89208,95	73959,65	89208,95	73959,65
629105851	Alpha-Aminoadipic Semialdehyde Dehydrogenase	—	—	0,28	—	0,30	—
629106486	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At5g41260	0,00	—	0,00	0,41	0,00	0,29
629110838	SIT4 Phosphatase-Associated Family Protein	—	293,19	—	513,14	428,36	—
629111318	Epoxide Hydrolase 3	5624,18	4580,53	—	—	5624,18	0,00
629112021	Glyoxalase I	0,39	—	18303,77	46548,23	18303,77	46548,23
629112387	Importin Subunit Beta-1	—	—	—	3,13	—	2,98
629114031	NADPH--Cytochrome P450 Reductase	—	—	3,53	—	2,18	3,21
629116096	Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase 5	—	—	—	0,34	—	0,39
629117712	Glyoxalase I	—	—	0,05	0,04	0,04	0,05
629118597	Bnaa07g29960d Protein	—	—	89720,91	89672,84	89720,91	89672,84
629119492	Beta-Glucosidase 44	—	—	9,54	9,80	6,59	14,21
629119851	Peptide Methionine Sulfoxide Reductase B5	2596,44	—	2596,44	—	2596,44	—
629121770	Endoglucanase	—	—	15776,98	10620,64	15776,98	10620,64
629121824	Glutamine--Trna Ligase, Cytoplasmic	2,57	—	—	0,28	—	0,29
629122445	Nuclear Transport Factor 2	8207,91	0,00	8207,91	0,00	—	—
629122751	10 Kda Chaperonin	27030,17	—	—	0,00	2,36	0,00
629124151	Tyrosyl-Trna Synthetase	—	—	5342,13	3578,85	5342,13	3578,85
629124175	Mitochondrial Inner Membrane Translocase	—	—	6982,25	3940,07	6982,25	3940,07
629124713	PP2A Regulatory Subunit TAP46	870,34	—	—	0,00	—	0,00
629126179	Glycosyltransferase	—	—	—	0,35	0,37	0,50
702236671	Protein Farnesyltransferase/Geranylgeranyltransferase Type-1 Subunit Alpha	6548,51	—	6548,51	—	6548,51	—
702238795	Pyruvate Decarboxylase 2	—	—	2,03	—	2,16	—
702238800	Pyruvate Decarboxylase 1	—	—	0,21	0,30	0,22	0,30

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702241109	Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase 12 Isoform X1	1187,42	—	1187,42	—	1187,42	—
702241706	Glutathione S-Transferase L3	1382,88	968,82	—	—	1382,88	0,00
702241745	Glutathione S-Transferase L3	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702243703	Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase	0,00	—	—	5398,35	—	5398,35
702250956	21 Kda Protein-Like	13572,78	—	—	0,00	—	0,00
702251137	Quinone Oxidoreductase	—	—	0,16	0,16	0,21	0,13
702256908	B12D-Like Protein	3,46	—	—	0,28	—	0,45
702259050	Serine/Threonine-Protein Kinase 16	2,27	—	—	0,29	—	0,33
702259764	Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit Beta-Like Protein	—	—	4,59	2,97	4,53	3,01
702263921	Bet1-Like SNARE 1-1	2,21	3,60	2,00	3,26	7,21	—
702267968	Serine/Threonine-Protein Phosphatase PP1 Isozyme 9	—	—	15360,07	15949,36	15360,07	15949,36
702275237	Cysteine--Trna Ligase 2, Cytoplasmic	—	—	3474,03	3075,32	3474,03	3075,32
702275365	Serine/Threonine-Protein Phosphatase 2A 65 Kda Regulatory Subunit A Beta Isoform	—	—	—	2,15	—	2,28
702276328	Serine/Threonine-Protein Kinase STY46	—	—	—	—	0,50	—
702277776	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 57 Kda Regulatory Subunit B' Theta Isoform	719,27	1093,27	—	—	719,27	0,00
702288717	Serine/Threonine-Protein Kinase HT1	—	—	1779,15	2410,46	1779,15	2410,46
702292547	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2-Like	—	—	2,29	2,77	2,14	2,96
702292847	Probable Polyamine Oxidase 5	—	—	3,05	4,00	3,33	3,66
702300329	Probable Protein Phosphatase 2C 60	—	—	0,49	0,46	—	0,40
702305171	Aldehyde Dehydrogenase Family 2 Member C4	—	—	15271,97	15426,10	15271,97	15426,10
702318024	Pyruvate Decarboxylase 1	—	—	2,90	2,27	—	4,11
702319097	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 28 Homolog 1	456,64	762,93	—	—	456,64	0,00
702322787	Patellin-4 Isoform X1	—	—	0,41	0,37	—	0,29
702323814	Protein SGT1 Homolog Isoform X1	—	—	2,46	2,44	2,23	2,69
702324136	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At5g41260	2,21	—	—	0,41	—	0,35
702327647	Exportin-2	—	—	—	2,12	—	2,48
702328026	Glutathione S-Transferase 2	—	—	3958,57	2933,60	3958,57	2933,60
702338396	Dynamin-Related Protein 5A	—	—	—	0,49	0,49	—
702344478	Angio-Associated Migratory Cell Protein	2217,71	—	0,24	0,00	0,21	0,00
702366338	Probable Glutathione S-Transferase	—	—	26414,73	40981,45	26414,73	40981,45
702376312	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 55 Kda Regulatory Subunit B Alpha Isoform Isoform X2	0,00	—	—	3296,86	—	3296,86
702377624	Probable Protein Phosphatase 2C 39	—	—	—	—	2,18	—

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702420907	Alpha-Xylosidase 1	0,42	—	—	2,86	—	2,36
702423644	Probable Acetyltransferase NATA1-Like	—	2,10	3,62	8,18	7,61	3,89
702432509	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702433078	PTI1-Like Tyrosine-Protein Kinase 1 Isoform X1	—	—	0,23	0,20	0,21	0,21
702436386	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g18500	6815,42	—	6815,42	—	6815,42	—
702437054	Leucine--Trna Ligase, Cytoplasmic Isoform X1	—	—	—	—	—	2,13
702438133	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)	—	—	—	—	0,50	—
702438442	L-Ascorbate Oxidase Homolog	—	—	3121,55	5302,24	3121,55	5302,24
702439243	Casein Kinase II Subunit Alpha-2 Isoform X2	—	—	4572,42	3072,61	4572,42	3072,61
702444554	Survival Protein Sure-Like Phosphatase/Nucleotidase	—	—	4671,11	2445,10	4671,11	2445,10
702444941	Stem-Specific Protein TSJT1-Like	—	—	4,30	3,53	4,27	3,55
702446586	Translationally-Controlled Tumor Protein Homolog	2,02	—	0,38	0,15	0,31	0,19
702447288	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g18500	0,00	—	—	4385,51	—	4385,51
702449215	Serine/Threonine-Protein Phosphatase PP1	0,00	—	—	5315,97	—	5315,97
702449500	Nuclear Transport Factor 2-Like	6,50	—	40170,11	6175,32	40170,11	6175,32
702460996	Casein Kinase II Subunit Alpha	—	—	—	2,86	2,31	2,26
702464432	WD Repeat-Containing Protein LWD1	2092,96	—	—	0,00	—	0,00
702464558	Probable Alpha-Mannosidase At5g13980	—	—	2,30	3,02	2,23	3,11
702464810	Mavicyanin	—	2,30	2,89	3,91	6,64	—
702465488	Aldehyde Dehydrogenase Family 2 Member B4, Mitochondrial	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702467099	Probable Prolyl 4-Hydroxylase 10	—	—	7582,85	9052,12	7582,85	9052,12
702467493	Peroxidase 72	3566,43	—	0,03	0,00	0,03	0,00
702468476	Dynamin-Related Protein 3A Isoform X1	0,00	—	—	13658,76	—	13658,76
702468484	Dynamin-Related Protein 3A Isoform X3	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702472353	Hydroxyacylglutathione Hydrolase Cytoplasmic	—	—	—	—	2,36	—
702474441	Serine/Threonine-Protein Phosphatase BSL3	1280,88	0,00	1280,88	0,00	0,42	—
702474696	(+)-Neomenthol Dehydrogenase	4017,96	—	—	0,00	—	0,00
702474784	SNF1-Related Protein Kinase Regulatory Subunit Beta-1	0,00	3096,00	0,00	2937,70	—	—
702475015	Rhodanese-Like/Ppic Domain-Containing Protein 12, Chloroplastic	4,81	—	7771,80	1617,43	7771,80	1617,43
702483587	Protein ROOT HAIR DEFECTIVE 3	—	—	0,30	0,46	0,32	0,43
702486972	Peptide Methionine Sulfoxide Reductase A5	808,57	—	—	0,00	—	0,00
702489349	Proline--Trna Ligase, Cytoplasmic Isoform X1	—	0,00	12378,94	0,37	0,36	12544,36
702489984	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)	0,20	23004,33	0,15	17394,73	3496,88	—
702491419	Glutathione S-Transferase F9	—	27088,67	0,00	—	—	0,00

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702492309	Short-Chain Type Dehydrogenase/Reductase	—	—	20017,01	15391,76	20017,01	15391,76
702492317	Short-Chain Type Dehydrogenase/Reductase	3,71	—	0,47	0,20	—	0,13
702492320	Short-Chain Type Dehydrogenase/Reductase	0,48	—	21133,82	43862,51	21133,82	43862,51
702494600	Putative Quinone-Oxidoreductase Homolog, Chloroplastic Isoform X1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
702495288	Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit Beta- Like Protein	—	—	4,03	3,06	4,34	2,83
702507993	Thiosulfate Sulfurtransferase 18	—	—	5726,70	5369,64	5726,70	5369,64
702512828	Persulfide Dioxxygenase ETHE1 Homolog, Mitochondrial	—	—	7673,62	7647,94	7673,62	7647,94
1091439212	Protein Farnesyltransferase/Geranylgeranyltransferase Type-1 Subunit Alpha	5774,69	—	5774,69	—	5774,69	—
1091441746	Glutathione S-Transferase L3 Isoform X1	11512,94	—	11512,94	—	11512,94	—
1091443570	Outer Envelope Pore Protein 16-3, Chloroplastic/Mitochondrial	0,00	0,00	—	2,31	0,00	7558,06
1091448460	Stem-Specific Protein TSJT1 Isoform X1	—	—	22745,79	28120,06	22745,79	28120,06
1091450627	Amidase 1 Isoform X1	—	—	0,24	0,21	0,34	0,15
1091451239	Serine/Threonine-Protein Phosphatase PP1-Like	4043,45	4488,55	—	—	4043,45	0,00
1091458724	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g15080 Isoform X1	1769,01	—	1769,01	—	1769,01	—
1091463547	Aspartate--Trna Ligase 2, Cytoplasmic	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091473795	Kinase-Related Protein	—	—	—	—	0,50	—
1091473808	Coatomer Subunit Zeta-1 Isoform X1	8560,65	—	8560,65	—	8560,65	—
1091482911	Universal Stress Protein A-Like Protein	—	12214,93	0,00	—	—	0,00
1091487382	Mitochondrial Import Inner Membrane Translocase Subunit TIM44-2-Like	2,21	—	4302,61	1949,21	4302,61	1949,21
1091487532	Beta-Hexosaminidase 1, Partial	—	—	2,60	3,64	2,35	4,03
1091491743	Signal Recognition Particle 19 Kda Protein	—	—	7006,60	4097,71	7006,60	4097,71
1091493590	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent), Partial	—	—	0,46	0,39	—	0,31
1091513965	Protein TPR2 Isoform X1	0,33	2677,65	—	6955,02	2286,79	2,60
1091515975	Serine/Threonine-Protein Phosphatase 2A 65 Kda Regulatory Subunit A Beta Isoform	—	—	10540,57	20918,48	10540,57	20918,48
1091524286	Prolyl-Trna Synthetase Associated Domain- Containing Protein 1-Like	2534,38	—	2534,38	—	2534,38	—
1305212656	T-Complex Protein 1 Subunit Epsilon	104193,47	—	—	0,00	—	0,00
1305218709	Protein TOC75, Chloroplastic	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305222467	Dynamin-Related Protein 3 ^a	—	16410,91	—	13596,94	12742,54	—

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1305224653	Dynamin-Related Protein 1B	—	732,32	22,83	19602,20	16722,11	26,77
1305224806	Alpha-Soluble NSF Attachment Protein	—	—	—	—	—	0,44
1305227702	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g18500	5802,35	—	5802,35	—	5802,35	—
1305228073	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At4g35230	0,00	—	0,00	0,18	0,00	0,22
1305232425	Threonine--Trna Ligase, Mitochondrial 1	—	4927,85	0,00	—	—	0,00
1305235849	Dynamin-2 ^a	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305241550	Nectarin-1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305246705	Alcohol Dehydrogenase B	0,00	—	0,00	0,01	0,00	0,02
1305256862	25,3 Kda Vesicle Transport Protein	0,00	—	—	953,84	—	953,84
1305258476	Serine-Threonine Kinase Receptor-Associated Protein	9632,52	—	—	0,00	0,41	0,00
1305263674	Probable Receptor-Like Protein Kinase At2g42960	—	1752,50	0,00	—	—	0,00
A0A058ZZ48	Tyrosyl-Trna Synthetase	—	0,00	5094,94	—	—	7098,32
A0A059A0J1	S-(Hydroxymethyl)Glutathione Dehydrogenase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_K01401 PE=3 SV=1	—	—	—	2,03	—	—
A0A059A0Z0	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)	—	—	51291,98	78757,87	51291,98	78757,87
A0A059A1L4	Mitochondrial Import Receptor Subunit TOM9-2	2,36	—	2,37	—	—	—
A0A059A620	GDSL Esterase/Lipase	22402,87	—	22402,87	—	22402,87	—
A0A059A650	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 29	4843,95	—	—	0,00	—	0,00
A0A059ABN8	Copper Transport Protein ATX1	—	—	27803,84	32843,40	27803,84	32843,40
A0A059ACJ5	Exosome Complex Component RRP41-Like	—	2574,99	—	2721,38	2216,16	—
A0A059AL91	Peroxidase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059AN98	Serine/Threonine-Protein Kinase SRK2E	0,00	—	—	6448,80	—	6448,80
A0A059APW0	ADP-Ribosylation Factor 1-Like 2	56874,10	51595,92	—	—	56874,10	0,00
A0A059AS25	2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase DAO	—	—	3867,29	5122,22	3867,29	5122,22
A0A059AUG3	Late Embryogenesis Abundant Protein	—	—	—	0,38	—	0,41
A0A059B4R0	1,4-Beta-D-Glucanase	—	—	6521,34	6753,94	6521,34	6753,94
A0A059B756	Nuclear Transport Factor 2	2,82	—	26686,38	9465,14	26686,38	9465,14
A0A059B7E7	Prefoldin Subunit 4	6132,20	—	3,02	0,00	2,57	0,00
A0A059BJS8	3-Oxo-Delta(4,5)-Steroid 5-Beta-Reductase	—	—	—	—	—	2,01
A0A059BPQ2	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At4g35230	106,91	—	0,03	0,00	0,03	0,00
A0A059BVL7	Mitochondrial-Processing Peptidase Subunit Alpha	—	—	2,08	—	—	2,08
A0A059BVV2	Serine/Threonine-Protein Phosphatase SV=1	—	2243,65	—	6428,00	3640,38	2,86
A0A059BX81	Bnaa05g36780d Protein	0,32	—	1199,03	3792,40	1199,03	3792,40
A0A059BXD1	Signal Recognition Particle Subunit SRP68	0,39	2364,49	—	6189,96	2436,31	2,62
A0A059BYG9	Patellin-1	—	—	—	2,30	—	—
A0A059BZF8	Valine--Trna Ligase, Mitochondrial 1	—	—	4,92	5,20	3,53	7,26

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
A0A059C784	Ankyrin-Kinase Protein	0,29	—	2227,17	7559,72	2227,17	7559,72
A0A059CBV7	Bnac03g19260d Protein	0,46	—	0,30	0,42	0,19	—
A0A059CDA7	Apoptosis Inhibitor 5-Like Protein API5	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059CHW2	Short-Chain Dehydrogenase TIC 32, Chloroplastic	—	—	14,63	13,05	19,14	9,98
A0A059CI38	Late Embryogenesis Abundant Protein	—	—	0,40	0,28	0,50	0,23
A0A059CM95	Glycylpeptide N-Tetradecanoyltransferase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_C00866 PE=3 SV=1	—	—	3,16	3,48	2,78	3,96
A0A059CVJ0	Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase RF2C	0,00	—	—	2696,44	—	2696,44
A0A059CY44	Peroxisomal Membrane Protein PEX14	—	0,00	6527,27	—	—	7834,53
A0A059DIJ7	GLU Protein	10,24	—	17650,38	1724,06	17650,38	1724,06
A0A059DDS4	Germin-Like Protein Subfamily 2 Member 4	—	—	27524,21	21648,25	27524,21	21648,25
A0A059DEI1	Glutathione S-Transferase L1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059DF77	Bnac05g43030d Protein	—	—	—	3,09	—	2,23
A0A059DGD6	Epoxide Hydrolase 3	5525,40	—	5525,40	—	5525,40	—
A0A059DJG5	Phthiocerol Synthesis Polyketide Synthase Type I Ppsc	—	—	5103,30	2912,27	5103,30	2912,27
A0A059DJM3	Protein SGT1 Homolog B	—	—	2,50	2,16	2,21	2,45
A0A059DJM4	Glycosyltransferase OS=Eucalyptus Grandis OX=71139 GN=EUGRSUZ_A02706 PE=3 SV=1	—	—	3491,57	2894,40	3491,57	2894,40
Eucgr,A02951,1,p	Translocase Of Chloroplast 34, Chloroplastic	2,49	25076,65	0,38	3823,73	9514,91	0,15
Eucgr,B00605,1,p	At5g60980/Msl3_100	—	—	0,49	—	0,37	—
Eucgr,B01156,1,p	GLU Protein	—	—	4,64	4,08	6,05	3,13
Eucgr,B01450,1,p	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)	—	—	2020,85	1956,95	2020,85	1956,95
Eucgr,B01579,3,p	Epoxide Hydrolase 1	—	—	16556,83	13704,02	16556,83	13704,02
Eucgr,B03349,2,p	Aldehyde Dehydrogenase	0,00	—	0,00	0,09	0,00	0,11
Eucgr,B03357,1,p	Threonine--Trna Ligase, Mitochondrial 1	—	—	—	—	—	2,04
Eucgr,B03455,1,p	Signal Recognition Particle Subunit SRP72	—	0,00	7878,67	3,08	2,39	10161,64
Eucgr,B03696,1,p	Cinnamoyl Alcohol Dehydrogenase	—	—	3,47	4,89	4,46	3,81
Eucgr,C00056,1,p	Os08g0224100 Protein	—	0,00	—	0,00	0,00	—
Eucgr,C00141,1,p	Lysine--Trna Ligase	—	—	—	—	—	2,10
Eucgr,C00763,1,p	Sec34-Like Protein	0,48	—	0,48	—	0,42	—
Eucgr,C01895,1,p	Protein Phosphatase 2C	—	—	—	—	—	2,14
Eucgr,D00699,1,p	Phthiocerol Synthesis Polyketide Synthase Type I Ppsc	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr,D01336,1,p	Glyoxalase I	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr,D01838,1,p	Short-Chain Dehydrogenase TIC 32, Chloroplastic	—	—	6788,59	5244,00	6788,59	5244,00

Conclusão							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr,D01990,1,p	Probable Calcium-Binding Protein CML13	2,13	—	—	—	—	—
Eucgr,F02946,1,p	Histidine--Trna Ligase, Cytoplasmic	—	—	6519,51	11485,54	6519,51	11485,54
Eucgr,F03107,1,p	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 55 Kda	2,86	—	3425,55	1199,73	3425,55	1199,73
	Regulatory Subunit B Alpha Isoform						
Eucgr,F04279,1,p	Basic Blue Protein	9351,32	—	9351,32	—	9351,32	—
Eucgr,G00557,1,p	Serin/Threonine Protein Kinase	—	—	2,13	—	2,46	—
Eucgr,G00778,2,p	Probable Protein Phosphatase 2C 10	—	—	18129,05	23248,56	18129,05	23248,56
Eucgr,G02110,1,p	Probable Peroxygenase 4	—	14904,78	0,00	—	—	0,00
Eucgr,G02703,1,p	Copper Transport Protein ATX1	—	—	0,17	0,11	0,17	0,11
Eucgr,G03086,1,p	Acid Phosphatase	—	0,00	18683,24	3,82	3,43	20849,84
Eucgr,H00450,1,p	Ybak/Aminoacyl-Trna Synthetase-Associated Domain-Containing Protein	5069,04	—	5069,04	—	5069,04	—
Eucgr,I00224,3,p	Alcohol Dehydrogenase 1	—	—	0,20	0,12	0,17	0,15
Eucgr,I00278,1,p	AP2-Associated Protein Kinase 1	0,26	—	—	—	—	2,20
Eucgr,I00804,1,p	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Protein-Tyrosine-Phosphatase PTEN2A	2,08	—	1758,05	845,90	1758,05	845,90
Eucgr,I01404,1,p	Probable Senescence Related Protein	0,47	2,20	0,42	—	—	—
Eucgr,I01732,1,p	Golgin Candidate 6	0,37	—	0,44	—	0,34	—
Eucgr,I02742,1,p	Serine/Threonine-Protein Kinase SAPK6	0,48	0,00	5405,24	—	—	11265,83
Eucgr,I02747,1,p	Oxidoreductase FEY3	2206,98	—	0,41	0,00	0,47	0,00
Eucgr,I02794,1,p	NADPH-Dependent Pterin Aldehyde Reductase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
Eucgr,J00787,1,p	Outer Envelope Protein 80, Chloroplastic	—	—	3055,97	2805,68	3055,97	2805,68
Eucgr,J01603,1,p	ADP-Ribosylation Factor-Like Protein 8B	0,00	—	0,00	—	0,00	—
Eucgr,J02053,1,p	Outer Envelope Pore Protein 16, Chloroplastic	14978,53	—	5,11	0,00	6,54	0,00
Eucgr,J02080,1,p	11S Seed Storage Protein	—	5298,73	—	12061,83	7954,19	2,28
Eucgr,J02213,1,p	MAP Kinase	—	—	1909,87	2749,08	1909,87	2749,08
Eucgr,J02844,1,p	Casein Kinase I Isoform Delta-Like Protein	—	—	995,51	978,20	995,51	978,20
Eucgr,J02848,1,p	At1g72880	—	—	0,39	0,34	0,34	0,38
Eucgr,K01428,1,p	Gb	—	—	—	2,45	—	2,45
Eucgr,K02858,1,p	Aldehyde Dehydrogenase, Mitochondrial	—	—	2,63	3,36	2,64	3,35
Eucgr,K03188,1,p	Nuclear Pore Complex Protein NUP43	—	—	7690,87	6716,38	7690,87	6716,38
Eucgr,K03456,1,p	Glutathione S-Transferase F13	—	—	26627,13	30361,00	26627,13	30361,00
Eucgr,L01448,1,p	Glyoxalase I	—	—	205627,78	130714,05	205627,78	130714,05

Tabela 16 – Proteínas relacionadas ao processo biológico “Processos desconhecidos”, identificadas no tecido cambial de clones de *Eucalyptus* sp. e *Corymbia* sp., que apresentaram aumento na regulação em função de clones e de espaçamentos de plantio. Clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Eu3x3) e 6 x 0,5 m (Eu6x0,5) e clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento 3 x 3 m (Cor3x3) e 6 x 0,5 m (Cor6x0,5). Proteínas com diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) e regulação diferencial segundo o critério de *fold-change* entre 2 e 0,5, identificadas nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (UniProt, NCBI e Phytozome) e agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pela base de dados KEGG. O valor da razão entre dois tratamentos (Eu3x3/Eu6x0,5, Cor3x3/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor3x3, Eu6x0,5/Cor6x0,5, Eu3x3/Cor6x0,5, Eu6x0,5/Cor3x3) maior que 2 indica que uma determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “numerador” e o valor da razão menor que 0,5 indica que determinada proteína foi *up*-regulada no tratamento “denominador”.

Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629079354	Protein CBG17375	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629079829	Hypersensitive-induced response protein 4	–	–	0,48	0,32	–	0,27
629079882	ACI13	3088,47	–	3088,47	–	3088,47	–
629079964	Os05g0301600 protein	33,69	–	2970,84	88,17	2970,84	88,17
629081749	Putative ML domain protein	–	–	62585,80	65861,16	62585,80	65861,16
629081889	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	–	–	5992,69	4482,34	5992,69	4482,34
629082004	Transferase, transferring glycosyl groups, putative	–	–	–	–	–	0,43
629082350	Splicing factor 3a, subunit 2	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629082366	Hypersensitive-induced response protein 1	–	–	5573,17	6320,66	5573,17	6320,66
629084214	Uricase	–	3,23	0,00	0,00	0,00	0,00
629084445	60S acidic ribosomal protein P2B	3,39	–	2,24	0,50	–	–
629084580	Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629084765	Pseudouridine-5'-phosphate glycosidase	2921,51	–	0,27	0,00	0,33	0,00
629084875	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	–	0,00	7725,48	2,31	2,34	7610,33
629084924	Anamorsin homolog	–	–	–	–	2,42	–
629085923	At5g47870	2778,78	–	2778,78	–	2778,78	–
629089300	Expressed protein	1225,27	–	1225,27	–	1225,27	–
629089574	Glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 2	5239,89	–	5239,89	–	5239,89	–
629091278	WD repeat-containing protein 55	1762,90	–	–	0,00	–	0,00
629091950	GPN-loop GTPase 3	–	–	0,00	0,00	0,00	0,00
629096116	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	–	0,00	–	0,00	0,00	–
629099516	Kelch motif family protein, expressed	–	–	2,13	–	–	–
629101226	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	4203,17	9621,89	0,44	–	4203,17	0,00
629102018	Protein DJ-1 homolog C	15492,88	–	15492,88	–	15492,88	–
629102866	THO complex subunit 3	1411,56	–	1411,56	–	1411,56	–
629105137	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	–	1252,68	3,39	2488,72	4244,45	–
629105432	At4g22290	–	17248,99	0,00	–	–	0,00
629106521	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	–	14197,57	–	14613,53	11246,63	–
629108030	KH domain-containing protein	0,13	–	1270,22	9958,93	1270,22	9958,93

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
629108657	BnaC04g10730D protein	—	0,00	10750,30	—	—	12028,77
629113283	Gibberellin receptor GID1, putative	0,00	—	—	13914,12	—	13914,12
629113917	26S proteasome regulatory subunit RPN13	—	0,00	8189,72	—	—	7364,46
629113973	Tetratricopeptide repeat protein	2,23	2617,78	3,38	3969,02	8849,52	—
629114520	Clathrin interactor EPSIN 1	—	—	0,46	—	0,42	—
629114874	BnaA08g13380D protein	—	—	4025,24	6829,38	4025,24	6829,38
629115846	AT5g10730/MAJ23_90	2,18	7842,22	—	5649,91	12331,92	—
629116030	BnaA08g12540D protein	0,43	—	3474,64	8155,70	3474,64	8155,70
629116711	Putative clathrin assembly protein At2g25430	0,36	—	—	—	—	—
629121764	Putative clathrin assembly protein At2g01600	0,42	—	0,31	—	0,29	—
629122020	COBW domain-containing protein 1	—	809,06	0,00	—	—	0,00
629122042	Nodulin-related protein 1	2,33	—	—	—	—	0,33
629122628	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	—	2,11	—	2,44	2,25	—
629125202	Adaptin ear-binding coat-associated protein 2	—	—	3559,61	4923,52	3559,61	4923,52
700254284	nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein, partial	—	—	0,42	0,34	0,43	0,33
702236894	15 kDa selenoprotein	8990,01	—	—	0,00	—	0,00
702237060	major allergen Pru av 1	—	—	65084,12	48277,15	65084,12	48277,15
702238287	exocyst complex component SEC3A	0,29	—	0,33	—	0,23	—
702246049	extensin isoform X2	—	—	0,43	0,49	0,50	0,42
702259865	putative DNA-binding protein At1g48610, partial	—	—	1984,65	3687,23	1984,65	3687,23
702270789	gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase isoform X1	—	0,00	13103,57	2,11	3,35	8240,91
702272208	probable trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial isoform X2	—	—	0,38	0,40	0,39	0,40
702273054	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6	2,12	—	4057,35	1910,32	4057,35	1910,32
702274724	ALG-2 interacting protein X	—	—	2,01	2,69	—	3,07
702280289	At2g27740	—	—	9651,00	14862,12	9651,00	14862,12
702291598	BnaAnng41530D protein	0,50	—	30390,75	61380,00	30390,75	61380,00
702294569	Putative isomerase Ydde	3015,11	6568,96	0,46	—	3015,11	0,00
702296694	protein WVD2-like 6	0,40	—	6792,59	17019,24	6792,59	17019,24
702318849	trafficking protein particle complex subunit 13 isoform X1	—	—	8154,42	8663,04	8154,42	8663,04
702320728	upstream activation factor subunit spp27	2,77	—	—	0,37	—	0,32
702320947	uric acid degradation bifunctional protein TTL isoform X1	3,22	—	9064,59	2811,90	9064,59	2811,90
702323352	Transmembrane protein, putative	2149,30	—	—	0,00	—	0,00

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
702324362	remorin isoform X1	—	13905,45	—	15693,02	15997,26	—
702325105	FAM10 family protein At4g22670	—	—	—	—	—	—
702325618	Inositol 2-dehydrogenase	0,40	—	5016,02	12558,52	5016,02	12558,52
702328474	THO complex subunit 7A	—	4237,66	0,00	—	—	0,00
702341344	Phosphoglycerate mutase family protein	0,44	—	0,28	—	0,45	—
702351968	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g61870, mitochondrial	3,68	—	2,75	0,39	—	—
702366549	Metal-dependent hydrolase	2851,72	—	—	0,00	—	0,00
702371354	MFP1 attachment factor 1-like	—	—	13395,92	17087,67	13395,92	17087,67
702372856	ran-binding protein 10 isoform X1	0,44	—	0,32	—	0,27	—
702376479	Predicted protein	2093,96	—	2093,96	—	2093,96	—
702377673	proton pump-interactor 1	—	—	9594,33	12341,44	9594,33	12341,44
702379273	nuclear mitotic apparatus protein 1	0,00	0,00	—	—	0,00	3534,32
702381411	BnaC03g41910D protein	—	—	3090,51	1629,28	3090,51	1629,28
702381856	BnaA03g24300D protein	7584,43	—	7584,43	—	7584,43	—
702389440	multiple organellar RNA editing factor 1, mitochondrial	—	—	3367,60	1863,48	3367,60	1863,48
702392124	probable carbohydrate esterase At4g34215	—	—	37719,94	39215,50	37719,94	39215,50
702434533	60S acidic ribosomal protein P2A-like	6,48	—	57693,51	8900,68	57693,51	8900,68
702435216	Expressed protein	—	—	10910,71	8161,50	10910,71	8161,50
702440467	probable nucleoredoxin 1	—	239,87	8,09	3726,72	1940,46	15,54
702442266	protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 4	—	501,74	0,00	—	—	0,00
702443116	protein WVD2-like 3 isoform X1	0,25	—	2608,74	10393,56	2608,74	10393,56
702446748	major allergen Pru ar 1	8863,02	—	8863,02	—	8863,02	—
702449923	esterase AGAP003155	—	—	4718,73	8654,40	4718,73	8654,40
702467539	TIM-barrel signal transduction protein	0,47	—	—	—	—	2,03
702468473	hemiasterlin resistant protein 1	436,44	1628,53	0,27	—	436,44	0,00
702469292	glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 1	—	2,11	2,46	8,38	5,19	3,97
702472148	Translation initiation factor IF-2, putative	—	—	73858,25	75442,07	73858,25	75442,07
702473465	Os01g0265700 protein	—	3058,52	0,00	—	—	0,00
702473506	protein SAD1/UNC-84 domain protein 1	—	0,00	2634,78	—	—	2330,71
702474537	succinate dehydrogenase subunit 6, mitochondrial	—	—	2,68	—	2,42	—
702518057	trafficking protein particle complex subunit 2-like, partial	—	—	5222,75	3927,08	5222,75	3927,08
1091440240	major allergen Pru av 1-like	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091442929	switch-associated protein 70 isoform X1	5599,85	—	—	0,00	—	0,00

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
1091446679	hypersensitive-induced response protein 1 isoform X1	—	8875,94	0,00	—	—	0,00
1091455423	afadin- and alpha-actinin-binding protein isoform X1	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091467174	At4g05400	0,00	—	—	4671,59	—	4671,59
1091476332	protein E6 isoform X1	—	—	2829,78	2153,84	2829,78	2153,84
1091477856	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	—	—	—	0,43	—	0,46
1091479370	BnaC07g37300D protein	—	—	5945,65	5482,70	5945,65	5482,70
1091479515	multiple organellar RNA editing factor 8, chloroplastic/mitochondrial-like	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1091481406	Organellar dna-binding protein	—	13855,83	—	7543,05	10402,50	—
1091492493	F17A17,37 protein	—	—	35830,84	48036,14	35830,84	48036,14
1091493508	UPF0510 protein INM02	—	—	11509,83	6178,62	11509,83	6178,62
1091498021	BSD domain-containing protein 1 isoform X2	—	—	5173,61	9468,24	5173,61	9468,24
1091505281	extradiol ring-cleavage dioxygenase	—	0,00	5435,05	—	2,51	2776,35
1091520648	Catalytic, putative	—	2,24	0,00	0,00	0,00	0,00
1305217668	Protein EMBRYO DEFECTIVE 2734	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305241765	Differentially expressed in FDCP 6	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
1305243512	AUGMIN subunit 7	0,00	0,00	—	—	0,00	4950,97
1305245105	BnaC02g43550D protein	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A058ZU13	PLAT-plant-stress protein	—	—	93577,28	100480,14	93577,28	100480,14
A0A059A0W7	Protein light-dependent short hypocotyls 10	2,35	—	—	0,29	—	0,40
A0A059A3L1	Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1 homolog	3,19	—	—	0,24	—	0,25
A0A059A5T1	BnaCnng40610D protein	—	—	8678,39	5633,04	8678,39	5633,04
A0A059A800	Deoxyhypusine hydroxylase	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059A8T0	Nitrile-specifier protein 5	884,00	—	0,04	0,00	0,04	0,00
A0A059A994	Omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase	—	—	21938,25	33082,33	21938,25	33082,33
A0A059AAF3	Octanoyltransferase	—	—	4544,05	2795,86	4544,05	2795,86
A0A059AP62	Translocon-associated protein subunit beta	—	—	2,62	2,29	2,06	2,91
A0A059AP80	Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein	13806,21	—	—	0,00	—	0,00
A0A059APZ9	Protein ABHD17C	1443,57	—	0,45	0,00	0,39	0,00
A0A059ATM1	Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g36680, mitochondrial	—	3448,82	—	4668,78	3654,41	—
A0A059AU56	La-related protein 7	—	0,00	2151,74	4,32	4,25	2187,81
A0A059AVF5	BnaC04g13840D protein	0,28	6649,59	0,27	6547,63	1818,30	—
A0A059AXR8	UPF0510 protein INM02	—	0,42	3,51	—	—	2,39
A0A059AXZ9	BnaC08g32180D protein	—	—	0,46	0,41	0,34	—

Continuação							
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
A0A059B3B2	Probable carbohydrate esterase At4g34215	8470,62	—	8470,62	—	8470,62	—
A0A059B752	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	—	—	6009,16	5906,96	6009,16	5906,96
A0A059BF26	BnaCnng24500D protein	—	0,00	8317,64	—	—	10409,07
A0A059BF27	Expressed protein	—	—	20144,52	30251,18	20144,52	30251,18
A0A059BKS8	Succinate dehydrogenase subunit 5, mitochondrial	2,62	—	—	0,41	—	0,41
A0A059BNA6	Dihydroxyacetone kinase	15452,78	—	15452,78	—	15452,78	—
A0A059BR35	WEB family protein At5g55860	—	—	0,00	0,00	0,00	0,00
A0A059BRW3	Alba DNA/RNA-binding protein	3,71	—	—	—	—	—
A0A059BU27	Beta-catenin-like protein 1	—	—	2079,13	2113,31	2079,13	2113,31
A0A059BYA7	Absciscic stress ripening protein-like protein	—	—	23,07	20,69	28,08	17,01
A0A059C1P0	Elicitor-responsive protein 1	—	—	32249,58	27229,93	32249,58	27229,93
A0A059CDU8	Protein ELONGATED EMPTY GLUME	3027,87	—	—	0,00	—	0,00
A0A059CJL1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	1320,35	1120,22	—	—	1320,35	0,00
A0A059CMV2	DeSI-like protein At4g17486	3,02	—	4073,44	1348,45	4073,44	1348,45
A0A059CTS8	Trafficking protein particle complex II-specific subunit 120 homolog	—	3897,39	—	8240,15	4959,54	2,11
A0A059CTV1	BnaC07g44040D protein	—	—	6830,97	8009,00	6830,97	8009,00
A0A059CXY7	Alba DNA/RNA-binding protein	—	0,00	—	0,00	0,00	—
A0A059D0V8	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY	—	—	2,44	2,43	—	3,31
A0A059D1D6	Mitochondrial pyruvate carrier	1924,71	—	1924,71	—	1924,71	—
A0A059D1F7	CBS domain-containing protein CBSX6	—	—	7452,39	11567,17	7452,39	11567,17
A0A059D7D9	Protein SPIRAL1-like 1	—	—	11031,15	11149,80	11031,15	11149,80
A0A059D9Y2	Probable carboxylesterase 15	—	—	2892,59	3635,32	2892,59	3635,32
A0A059DC07	Major allergen Pru av 1	3,07	—	0,04	0,01	0,03	0,01
Eucgr,A00188,1,p	Major allergen Pru av 1	—	—	11996,79	6361,01	11996,79	6361,01
Eucgr,A01225,1,p	At2g37400	—	—	0,45	0,49	—	0,40
Eucgr,A01916,1,p	Protein light-dependent short hypocotyls 10	1272,24	—	1272,24	—	1272,24	—
Eucgr,A02564,1,p	Putative ML domain protein	25341,10	—	0,38	0,00	0,46	0,00
Eucgr,A02985,1,p	WEB family protein At5g16730, chloroplastic	—	—	—	—	0,40	—
Eucgr,B01000,1,p	Prostaglandin E synthase 2	—	—	—	2,27	3,26	—
Eucgr,B02196,1,p	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	—	—	—	2,74	—	2,14
Eucgr,B02460,1,p	P70 protein	1397,73	—	0,12	0,00	0,10	0,00
Eucgr,B02549,1,p	Predicted protein	—	—	7122,35	5107,48	7122,35	5107,48
Eucgr,B03112,1,p	DNA-3-methyladenine glycosylase 1	0,37	—	3737,95	10008,66	3737,95	10008,66
Eucgr,B03160,1,p	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g26460, mitochondrial	—	0,00	11984,21	0,49	0,50	11766,90

							Conclusão
Identificação	Descrição	Eu3x3/Eu6x0,5	Cor3x3/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor3x3	Eu6x0,5/Cor6x0,5	Eu3x3/Cor6x0,5	Eu6x0,5/Cor3x3
Eucgr,B03677,1,p	BnaA02g01340D protein	0,42	—	—	3,88	—	3,66
Eucgr,B03744,1,p	FrnE protein-like	0,00	—	—	14577,76	—	14577,76
Eucgr,C01583,1,p	Coiled-coil domain-containing protein 25	2,74	0,00	2754,96	0,46	—	1004,12
Eucgr,C02663,1,p	Stromal cell-derived factor 2-like protein	—	—	6050,33	4626,61	6050,33	4626,61
Eucgr,D01683,1,p	BnaUnng00170D protein	—	—	—	2,80	—	2,58
Eucgr,D02638,1,p	Protein AE7	—	—	4086,19	2233,88	4086,19	2233,88
Eucgr,E00279,1,p	Absciscic acid receptor PYR1	—	—	39170,50	36997,26	39170,50	36997,26
Eucgr,E02058,1,p	ASR5 protein	—	—	175796,64	140792,31	175796,64	140792,31
Eucgr,E02409,2,p	Os06g0538900 protein	—	—	22220,42	16583,72	22220,42	16583,72
Eucgr,E04317,1,p	Src homology 3 domain containing protein	0,47	—	—	2,31	—	—
Eucgr,F01791,1,p	BnaA08g04550D protein	16134,95	7731,54	2,09	—	16134,95	0,00
Eucgr,F02250,1,p	ZCW7	—	—	5589,22	5676,14	5589,22	5676,14
Eucgr,F04071,1,p	BnaA05g00830D protein	0,29	—	8066,74	27449,44	8066,74	27449,44
Eucgr,G03122,1,p	WEB family protein At2g40480	—	—	0,33	0,37	0,38	0,32
Eucgr,G03402,1,p	Thioredoxin-like protein Clot	1396,59	13039,37	0,11	—	1396,59	0,00
Eucgr,H00191,1,p	Protein WVD2-like 3	—	—	1474,86	1371,54	1474,86	1371,54
Eucgr,H02217,1,p	Putative polysaccharide biosynthesis protein	0,00	0,00	—	—	0,00	1750,34
Eucgr,H03367,1,p	At1g51160	—	—	—	—	2,06	—
Eucgr,I01692,2,p	Plant UBX domain-containing protein 1	—	—	12353,42	9781,20	12353,42	9781,20
Eucgr,I02318,1,p	Winged-helix DNA-binding transcription factor family protein, putative	0,47	—	549,05	1156,64	549,05	1156,64
Eucgr,I02352,1,p	WEB family plant protein	—	—	10214,02	8341,93	10214,02	8341,93
Eucgr,I02797,1,p	Nucleic acid binding/RNA binding protein	1634,77	—	1634,77	—	1634,77	—
Eucgr,J00058,2,p	Translation initiation factor IF-2, putative	—	—	15108,10	14051,59	15108,10	14051,59
Eucgr,J00434,1,p	Stress-response A/B barrel domain-containing protein At5g22580	—	—	17424,32	15530,57	17424,32	15530,57
Eucgr,J01052,1,p	Esterase	—	—	17831,22	12526,82	17831,22	12526,82
Eucgr,J01257,1,p	At5g48020	870,67	—	0,16	0,00	0,20	0,00
Eucgr,J01387,1,p	Protein SPIRAL1-like 1	—	—	13491,21	9371,57	13491,21	9371,57
Eucgr,J01534,1,p	Protein-lysine N-methyltransferase METTL10	—	—	0,44	—	0,39	—
Eucgr,J02185,1,p	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	—	—	3,67	4,33	3,42	4,65
Eucgr,J02308,1,p	Phosducin-like protein 3	8315,36	5,51	—	0,00	6,89	0,00
Eucgr,J03195,1,p	YTH domain-contained RNA binding protein 13	—	0,00	680,02	5,84	3,30	1200,86
Eucgr,K02950,1,p	Light-inducible protein ATLS1	—	—	2,32	—	—	—

Quadro 1 – Anotação funcional das proteínas identificadas anotadas como “não caracterizadas” ou “hipotéticas” nas bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Uniprot, NCBI e Phytozome). Proteínas anotadas com base na similaridade com sequências anotadas na base de dados UniRef, considerando a taxonomia de plantas, pela ferramenta Sma3s.

Identificação	GENE	Descrição
219891448	PER63	Peroxidase 63
219908187	CAD1	Probable Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase
259667060	GT2	Cinnamate Beta-D-Glucosyltransferase
527190689	UXS1	UDP-D-Glucuronate Carboxy-Lyase
629076550	DRT102	DNA-Damage-Repair/Toleration Protein DRT102
629077068	CXP	Serine Carboxypeptidase II-2
629079354	CBG17375	Protein CBG17375
629079738	AT3G03100	Probable NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 12
629079829	HIR4	Hypersensitive-Induced Response Protein 4
629079882	ACI13	Aci13
629079945	BAG1	BAG Family Molecular Chaperone Regulator 1
629079964	OS05G0301600	Os05g0301600 Protein
629080013	MED36B	Probable Mediator Of RNA Polymerase II Transcription Subunit 36b
629080023	HSP83A	Heat Shock Protein 83
629080155	VPS26A	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 26A
629080231	TIM22B	Mitochondrial Import Inner Membrane Translocase Subunit Tim17/Tim22/Tim23 Family Protein
629080702	7OMT	(R,S)-Reticuline 7-O-Methyltransferase
629080766	RCOM_1174740	Structural Constituent Of Cell Wall, Putative
629080956	RHM1	Trifunctional UDP-Glucose 4,6-Dehydratase/UDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Glucose 3,5-Epimerase/UDP-4-Keto-L-Rhamnose-Reductase RHM1
629081002	GSTF9	Glutathione S-Transferase F9
629081038	CDC48A	Cell Division Control Protein 48 Homolog A
629081441	FIS1A	Mitochondrial Fission 1 Protein A
629081465	CRK1	CDPK-Related Kinase 1
629081687	RH37	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 37
629081749	ML	Putative ML Domain Protein
629081887	AT3G10080	Germin-Like Protein Subfamily 3 Member 2
629081889	AT2G36290	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein
629081970	AT4G13010	Putative Quinone-Oxidoreductase Homolog, Chloroplastic
629081984	AT3G25150	Nuclear Transport Factor 2 And RNA Recognition Motif Domain-Containing Protein
629082004	RCOM_1719220	Transferase, Transferring Glycosyl Groups, Putative
629082061	IRX10L	Probable Beta-1,4-Xylosyltransferase IRX10L
629082101	AT3G18410	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Beta Subcomplex Subunit 10-B

Identificação	GENE	Descrição
629082350	SPL2	Splicing Factor 3a, Subunit 2
629082354	B'ALPHA	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 57 Kda Regulatory Subunit B' Alpha Isoform
629082366	HIR1	Hypersensitive-Induced Response Protein 1
629082395	GMDH	Malate Dehydrogenase
629082724	NDPK2	Nucleoside Diphosphate Kinase 2, Chloroplastic
629082745	CYSEP	Vignain
629082787	RPL27AB	60S Ribosomal Protein L27a-2
629082958	PATL6	Patellin-6
629083073	AT3G53970	Probable Proteasome Inhibitor
629083309	RPL12A	60S Ribosomal Protein L12-1
629083575	LSM4	U6 Snrna-Associated Sm-Like Protein Lsm4
629083580	USP	Universal Stress Protein
629083719	ADH6	Alcohol Dehydrogenase
629083850	ACT2	Actin-2
629083882	RPS11A	40S Ribosomal Protein S11-1
629084214	PSUR	Uricase
629084331	METK	Mat
629084445	RPP2B	60S Acidic Ribosomal Protein P2B
629084580	ML	Phosphatidylglycerol/Phosphatidylinositol Transfer Protein
629084765	PSUG	Pseudouridine-5'-Phosphate Glycosidase
629084875	AT3G20790	NAD(P)-Binding Rossmann-Fold Superfamily Protein
629084924	VIT_01S0010G01180	Anamorsin Homolog
629084947	SCOA	Succinyl-CoA Ligase [ADP-Forming] Subunit Alpha-1, Mitochondrial
629085099	ACR12	ACT Domain-Containing Protein ACR12
629085923	PGSC0003DMG400027997	At5g47870
629085981	AT5G56460	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g56460
629086035	MTS	Serine/Threonine-Protein Phosphatase
629086231	HSP17	17.5 Kd Heat Shock Family Protein
629086562	F4P13.11	F4P13.11 Protein
629086635	PHB3	Prohibitin-3, Mitochondrial
629086851	SKP1B	SKP1-Like Protein 1B
629086917	AT5G66010	RNA Recognition Motif-Containing Protein
629086952	NTR2	Thioredoxin Reductase 2
629087008	LRP	40S Ribosomal Protein SA

Identificação	GENE	Descrição
629087195	DRG1	Developmentally-Regulated G-Protein 1
629087320	ME1	Malic Enzyme
629087407	AAA1	Katanin P60 Atpase-Containing Subunit A1
629087429	H2A	Histone H2A
629087462	BNAC03G75170D	Bnac03g75170d Protein
629087544	CCR	Cinnamoyl-Coa Reductase
629087822	ACL1	ATP-Citrate (Pro-S-)-Lyase
629087882	PSL5	Probable Glucan 1,3-Alpha-Glucosidase
629088000	ADH	Adh1
629088001	ADH1	Alcohol Dehydrogenase 1
629088030	BOLA2	Protein BOLA2
629088451	NIFS1	Cysteine Desulfurase, Mitochondrial
629088543	PUB4	U-Box Domain-Containing Protein 4
629088646	CYS1	Cysteine Proteinase
629088855	OXPI	5-Oxoprolinase
629088965	DEM	Dem Protein
629089223	XCT	Protein XAP5 circadian timekeeper
629089300	AT2G16860	Expressed Protein
629089432	CPK4	Calcium-Dependent Protein Kinase 4
629089495	CHS	Chalcone Synthase
629089513	RISP	Cytochrome B-C1 Complex Subunit Rieske, Mitochondrial
629089574	GXM2	Glucuronoxylan 4-O-Methyltransferase 2
629089630	ACG12	Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase, Cytoplasmic Isoform 2
629089735	GLR1	Glutaredoxin
629089780	AT3G27960	Kinesin Light Chain-Like Protein
629089786	EO	2-Methylene-Furan-3-One Reductase
629090028	RPS19A	40S Ribosomal Protein S19-1
629090061	UPTG2	Alpha-1,4-Glucan-Protein Synthase [UDP-Forming] 2
629090354	VPS35A	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 35A
629090360	PRDE	Proteasome Subunit Alpha Type
629090546	APP2	Xaa-Pro Aminopeptidase 2
629090691	PYRD	Dihydroorotate Dehydrogenase (Quinone), Mitochondrial
629090896	EFA1G	EF1Bgamma Class Glutathione S-Transferase
629091269	LUH	Transcriptional Corepressor leunig_homolog

Identificação	GENE	Descrição
629091278	WDR55	WD Repeat-Containing Protein 55
629091289	VAMP726	Putative Vesicle-Associated Membrane Protein 726
629091394	ETFB	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta, Mitochondrial
629091706	TIF3H1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit H
629091788	RKL1	Probable Inactive Receptor Kinase At1g48480
629091897	SCS1	Succinyl-CoA Ligase [ADP-Forming] Subunit Alpha
629091950	GPN3	GPN-Loop Gtpase 3
629092007	GMR2	Gtpase
629092994	BSL1	Serine/Threonine-Protein Phosphatase BSL1
629093807	SRP102	Signal Recognition Particle Receptor Subunit Beta
629093900	PMT	Spermidine Synthase
629093959	SHM4	Serine Hydroxymethyltransferase 4
629094008	RPS4	40S Ribosomal Protein S4
629094140	PEL2	Pectate Lyase
629094248	RPL23A	60S Ribosomal Protein L23
629094250	APS1	Acid Phosphatase 1
629094824	HIDM	2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase
629095085	PBS1	Serine/Threonine-Protein Kinase PBS1
629095152	KIF2	Kinesin-Like Protein
629095199	EH1	Epoxide Hydrolase 1
629095392	NPSN13	Novel Plant SNARE 13
629095808	LOX	Lipoxygenase
629095914	PNSL5	Photosynthetic NDH Subunit Of Lumenal Location 5, Chloroplastic
629095988	CLKR27	3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reductase, Chloroplastic
629096116	AT5G61450	P-Loop Containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases Superfamily Protein
629096136	ANN	Annexin
629096170	AGT2	Alanine--Glyoxylate Aminotransferase 2 Homolog 1, Mitochondrial
629096503	CHMP6	Vacuolar Sorting-Associated-Like Protein
629096801	MMT1	Methionine S-Methyltransferase
629097292	XYL2	Beta-Xylosidase/Alpha-L-Arabinofuranosidase 2
629097699	TRPA1	Tryptophan Synthase Alpha Chain
629097841	VSR3	Vacuolar-Sorting Receptor 3
629097963	PTEN2A	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Protein-Tyrosine-Phosphatase PTEN2A
629098507	XTH5	Probable Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 5

Identificação	GENE	Descrição
629098655	ACLB	ATP-Citrate Synthase
629099297	RPL44	60S Ribosomal Protein L44
629099339	PTRB	Oligopeptidase B
629099341	PTRB	Protease 2
629099426	RPS17A	40S Ribosomal Protein S17-1
629099516	OS12G0540800	Kelch Motif Family Protein, Expressed
629099631	AROC	5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Phospholyase
629099662	PAL6	Phenylalanine Ammonia-Lyase
629099904	PLC3	Phosphoinositide Phospholipase C
629099946	FEN1	Ferritin
629100006	RPS26C	40S Ribosomal Protein S26-3
629100331	ARP7	Actin-Related Protein 7
629100357	LRR	Leucine Rich Repeat Protein
629100361	SUGP1	SURP And G-Patch Domain-Containing Protein 1
629100363	RABA4C	Ras-Related Protein RABA4c
629100807	HIRZ	Homeobox Protein Knotted-1-Like 6
629100827	SBT1	Subtilisin-Like Protease
629100895	CP2	Cysteine Protease
629101103	FTTB	14-3-3-Like Protein
629101226	UFC1	Ubiquitin-Fold Modifier-Conjugating Enzyme 1
629101263	DFC	Protein DOWNSTREAM OF FLC
629101715	ETFA	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Alpha, Mitochondrial
629101837	CIP7	F11P17.17 Protein
629101944	INO1	DNA-Binding Family Protein
629101959	HGO	Homogentisate 1,2-Dioxygenase
629101997	MMDH	Malate Dehydrogenase, Mitochondrial
629102018	DJ1C	Protein DJ-1 Homolog C
629102045	MBF1B	Multiprotein-Bridging Factor 1b
629102076	GGH2	Gamma-Glutamyl Hydrolase 2
629102427	TRH2	Thioredoxin
629102505	CYP1	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase
629102509	ASK15	SKP1-Like Protein 15
629102560	CCT2	T-Complex Protein 1 Subunit Beta
629102565	AT5G42220	At5g42220/K5j14_2

Identificação	GENE	Descrição
629102615	DPM1	MGC114892 Protein
629102866	THO3	THO Complex Subunit 3
629103193	APT1	Adenine Phosphoribosyltransferase 1
629103238	SCP1	Cysteine Protease-1
629103664	ABPE	F-Actin-Capping Protein Subunit Beta
629103837	HACL	2-Hydroxyacyl-CoA Lyase
629103885	FRK1	Fructokinase
629103969	AT5G37475	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit J
629103972	GAD1	Glutamate Decarboxylase 1
629103979	UGPA	UTP--Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase
629104033	NUP50B	Nuclear Pore Complex Protein NUP50B
629104102	DG8I	Glycosyltransferase
629104473	UBC35	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 35
629104581	AGD5	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD5
629104750	PYRB3	Aspartate Carbamoyltransferase 3, Chloroplastic
629105050	PER64	Peroxidase 64
629105137	SGTA	Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein Alpha
629105154	ALDA	Aldehyde Dehydrogenase
629105177	CHI	Chalcone--Flavonone Isomerase
629105304	IMDH3	3-Isopropylmalate Dehydrogenase 3, Chloroplastic
629105425	MNS1	Mannosyl-Oligosaccharide 1,2-Alpha-Mannosidase MNS1
629105432	AT4G22290	At4g22290
629105484	OS04G0609600	Probable Protein Phosphatase 2C 44
629105494	AT1G22800	Putative Methyltransferase At1g22800
629105629	PRX2	Peroxidase
629105851	ALH	Alpha-Aminoadipic Semialdehyde Dehydrogenase
629105879	AG118	Acetylornithine Aminotransferase, Mitochondrial
629105937	AMC4	Metacaspase-4
629106486	AT5G41260	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At5g41260
629106500	DBP	Remorin
629106514	PMM	Phosphomannomutase
629106521	GLYSOJA_034651	Methionine Adenosyltransferase 2 Subunit Beta
629106854	APT5	Adenine Phosphoribosyltransferase 5
629106945	PUX8	Plant UBX Domain-Containing Protein 8

Identificação	GENE	Descrição
629107236	EFF	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-17 Kda
629107317	RPN12	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 8
629107706	RPN9A	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 13 Homolog A
629107749	HPR3	Glyoxylate/Hydroxypyruvate Reductase HPR3
629108030	GLYSOJA_017675	KH Domain-Containing Protein
629108657	BNAC04G10730D	Bnac04g10730d Protein
629109090	EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
629109782	USP	Universal Stress Protein
629110316	RABB1C	Ras-Related Protein RABB1c
629110336	UCH2	Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 2
629110838	AT1G30470	SIT4 Phosphatase-Associated Family Protein
629110845	PBD1	Proteasome Subunit Beta Type-2-A
629110965	RPS14A	40S Ribosomal Protein S14-1
629110969	RPL18A	60S Ribosomal Protein L18a
629111318	EH3	Epoxide Hydrolase 3
629111640	GDH2	Glycine Cleavage System H Protein 2, Mitochondrial
629112021	GLOA	Glyoxalase I
629112062	ACO	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase
629112387	KPNB1	Importin Subunit Beta-1
629112501	BNAA08G15030D	Bnaa08g15030d Protein
629112664	NRS/ER	Bifunctional Dtdp-4-Dehydrorhamnose 3,5-Epimerase/Dtdp-4-Dehydrorhamnose Reductase
629112777	APT3	Adenine Phosphoribosyltransferase 3
629112815	HSP22	Mitochondrial Small Heat Shock Protein
629112896	UGLYAH	(S)-Ureidoglycine Aminohydrolase
629113283	EST	Gibberellin Receptor GID1, Putative
629113403	ACT7	Actin-7
629113917	RPN13	26S Proteasome Regulatory Subunit RPN13
629113973	INT106	Tetratricopeptide Repeat Protein
629114007	AT3G01590	Putative Glucose-6-Phosphate 1-Epimerase
629114023	RBCS	Ribulose Biphosphate Carboxylase Small Chain
629114031	CPR	NADPH--Cytochrome P450 Reductase
629114225	LAP2	Leucine Aminopeptidase
629114493	ME1	NADP-Dependent Malic Enzyme
629114504	PF1	Profilin

Identificação	GENE	Descrição
629114518	F14M2.18	F14M2.18 Protein
629114520	EPSIN1	Clathrin Interactor EPSIN 1
629114523	POPTR_0018S04700G	3'-5' Exonuclease Domain-Containing Family Protein
629114588	HSP2	17.7 Kda Heat Shock Protein
629114675	SUS4	Sucrose Synthase 4
629114706	MRI1	M1Pi
629114874	BNAA08G13380D	Bnaa08g13380d Protein
629115846	AT5G10730	At5g10730/Maj23_90
629116030	AT2G24440	Bnaa08g12540d Protein
629116044	AT2G24420	AT2G24420 Protein
629116096	BGL	Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase 5
629116218	RPP3A	60S Acidic Ribosomal Protein P3
629116241	GRXC4	Glutaredoxin-C4
629116460	ZOSMA_14G01640	Transcription Elongation Factor B Polypeptide 2
629116659	ASP5	Aspartate Aminotransferase, Chloroplastic
629116711	AT2G25430	Putative Clathrin Assembly Protein At2g25430
629117152	AASS	Alpha-Aminoadipic Semialdehyde Synthase
629117712	GLOA	Glyoxalase I
629117983	MP3	Probable Steroid-Binding Protein 3
629118324	VATF	V-Type Proton ATPase Subunit F
629118560	AN34	Annexin
629118597	BNAA07G29960D	Bnaa07g29960d Protein
629118704	GAPC2	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 2, Cytosolic
629118725	RPL8	60S Ribosomal Protein L7a
629118961	UMC2530	Nephrocystin-3
629119088	HVA22A	HVA22-Like Protein A
629119213	F3'	Flavonoid 3'-Hydroxylase
629119218	F3'H	Flavanone 3'-Hydroxylase
629119240	GDPD6	Glycerophosphodiester Phosphodiesterase GDPD6
629119381	RPS7	40S Ribosomal Protein S7
629119492	BGLU44	Beta-Glucosidase 44
629119573	NMT1	Phosphoethanolamine N-Methyltransferase 1
629119851	MSRB5	Peptide Methionine Sulfoxide Reductase B5
629120129	CBP1	Ca ²⁺ Binding Protein Cbp1

Identificação	GENE	Descrição
629120160	HMP	MPBQ/MSBQ Methyltransferase
629120404	CS1	Cysteine Synthase
629121291	GROL	60 Kda Chaperonin
629121414	VATF	V-Type Proton ATPase Subunit F
629121698	ATPB	ATP Synthase Subunit Beta, Mitochondrial
629121764	AT2G01600	Putative Clathrin Assembly Protein At2g01600
629121770	EG1	Endoglucanase
629121819	ATJ15	Chaperone Protein DnaJ 15
629121824	OVA9	Glutamine--Trna Ligase, Cytoplasmic
629122020	CBWD1	COBW Domain-Containing Protein 1
629122042	NRP1	Nodulin-Related Protein 1
629122313	AT5G47890	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 2
629122346	RPL34	60S Ribosomal Protein L34
629122445	NTF2	Nuclear Transport Factor 2
629122628	AT5G19630	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein
629122740	F3'	Flavonoid 3'-Hydroxylase
629122751	CPN10	10 Kda Chaperonin
629122879	RPL10A	60S Ribosomal Protein L10a
629122940	AXS1	UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 1
629123241	GPX2	Probable Glutathione Peroxidase 2
629123420	PUX11	Plant UBX Domain-Containing Protein 11
629123696	MGTA	GDP-Mannose-Dependent Alpha-Mannosyltransferase
629123712	ACX4	Acyl-Coenzyme A Oxidase 4, Peroxisomal
629123790	RPS4	40S Ribosomal Protein S4
629123894	PURH	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase
629124115	RPSE	30S Ribosomal Protein S5
629124151	TYRS	Tyrosyl-Trna Synthetase
629124175	TIM22B	Mitochondrial Inner Membrane Translocase
629124196	CPR2	Ppiase
629124389	RPL12	60S Ribosomal Protein L12
629124468	UXS1	UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase 1
629124481	RABE1C	Ras-Related Protein RABE1c
629124532	ORP3A	Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 3A
629124561	GSVIVT00026920001	Probable Polygalacturonase

Identificação	GENE	Descrição
629124643	OMT	Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase
629124713	TAP46	PP2A Regulatory Subunit TAP46
629124716	IQD22	Calmodulin Binding Protein IQD22
629124923	ACA7	Alpha Carbonic Anhydrase 7
629125202	NECAP2	Adaptin Ear-Binding Coat-Associated Protein 2
629125209	GRF9	14-3-3-Like Protein GF14 Mu
629125337	HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase
629125565	C3'H	P-Coumarate 3-Hydroxylase
629125909	DIR21	Dirigent Protein 21
629126139	AT5G53310	At5g53310/K19e1_11
629126179	DG8I	Glycosyltransferase
629126260	RPL36B	60S Ribosomal Protein L36-2
629126466	NDK1	Nucleoside Diphosphate Kinase 1
702239523	PURH	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase
702251137	QOR	Quinone Oxidoreductase
702256908	B12D	B12D-Like Protein
702275279	BNAA07G26960D	Bnaa07g26960d Protein
702280289	AT2G27740	At2g27740
702290743	AT5G20360	Octicosapeptide/Phox/Bem1p And Tetratricopeptide Repeat Domain-Containing Protein
702291598	BNAANNG41530D	Bnaanng41530d Protein
702294569	YDDE	Putative Isomerase Ydde
702325618	IOLG	Inositol 2-Dehydrogenase
702325754	SATO1	Salt Tolerance Protein 1
702337062	GUAA	GMP Synthase [Glutamine-Hydrolyzing]
702341344	AT3G60440	Phosphoglycerate Mutase Family Protein
702342129	AT2G44310	Calcium-Binding EF-Hand-Containing Protein
702350402	AT1G11480	At1g11480/T23J18_15
702352556	BNAA07G23940D	Bnaa07g23940d Protein
702360854	XYNK	Beta-Xylanase
702366549	F383_17854	Metal-Dependent Hydrolase
702372792	AST2	Aspartate Aminotransferase
702376479	CA608558	Predicted Protein
702381411	BNAC03G41910D	Bnac03g41910d Protein
702381666	20	Erythronate-4-Phosphate+Dehydrogenase+Domain+Containing+Protein

Identificação	GENE	Descrição
702381856	BNAA03G24300D	Bnaa03g24300d Protein
702435216	AT2G16760	Expressed Protein
702438258	MRPL28	Putative Mitochondrial Ribosomal Protein L28
702444554	SURE	Survival Protein Sure-Like Phosphatase/Nucleotidase
702450701	RPLQ	50S Ribosomal Protein L17
702459214	RPLO	50S Ribosomal Protein L15
702467539	Y4OV	TIM-Barrel Signal Transduction Protein
702469032	BZIP119	BZIP Transcription Factor
702472148	TCM_042950	Translation Initiation Factor IF-2, Putative
702473465	OS01G0265700	Os01g0265700 Protein
702474602	EXG1	Exoglucanase
702476999	ALGC	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase
1091461426	BNAC07G43660D	Bnac07g43660d Protein
1091467174	AT4G05400	At4g05400
1091473795	AT1G29350	Kinase-Related Protein
1091477856	AT5G25770	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein
1091479370	BNAC07G37300D	Bnac07g37300d Protein
1091481406	PGSC0003DMG400001162	Organellar Dna-Binding Protein
1091492493	AT1G80240	F17A17.37 Protein
1091493508	AT1G65270	UPF0510 Protein INM02
1091501861	BNAC01G00750D	Bnac01g00750d Protein
1091520648	AT5G25770	Catalytic, Putative
1305212656	CCT5	T-Complex Protein 1 Subunit Epsilon
1305212829	PIP	Proline Iminopeptidase
1305213106	IMDH2	3-Isopropylmalate Dehydrogenase 2, Chloroplastic
1305213823	IDH1	Isocitrate Dehydrogenase [NAD] Regulatory Subunit 1, Mitochondrial
1305217005	BTR1	Protein BTR1
1305217207	GRF2	14-3-3-Like Protein GF14 Omega
1305217668	EMB2734	Protein EMBRYO DEFECTIVE 2734
1305217669	DTC	Dicarboxylate/Tricarboxylate Carrier
1305218709	IAP75	Protein TOC75, Chloroplastic
1305219194	FBA	Fructose-Bisphosphate Aldolase
1305220233	CLPA	Atpase AAA-2 Domain Protein
1305220902	BAS1	2-Cys Peroxiredoxin BAS1, Chloroplastic

Identificação	GENE	Descrição
1305220909	UEV1D	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 Variant 1D
1305221663	BCOP	Beta-Coat Protein
1305222426	UGD2	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase 2
1305222456	GDI	Rab GDP Dissociation Inhibitor Alpha
1305222467	ADL2	Dynamin-Related Protein 3A
1305224653	DRP1B	Dynamin-Related Protein 1B
1305224806	NAPA	Alpha-Soluble NSF Attachment Protein
1305225868	ALF	Fructose-Bisphosphate Aldolase
1305226028	PAA1	Proteasome Subunit Alpha Type-6
1305227702	AT5G18500	Probable Receptor-Like Protein Kinase At5g18500
1305228073	AT4G35230	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At4g35230
1305228508	SBT1	Subtilisin-Like Protease
1305229109	LOC100283976	Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 5
1305229439	APGM	Phosphoglycerate Mutase (2,3-Diphosphoglycerate-Independent)
1305229720	CCT1	T-Complex Protein 1 Subunit Alpha
1305230345	BPA1	Binding Partner Of ACD11 1
1305230972	NQO3	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 75 Kda Subunit, Mitochondrial
1305231788	CHC2	Clathrin Heavy Chain 2
1305232425	THRRS	Threonine--Trna Ligase, Mitochondrial 1
1305233811	AT3G15890	PTI1-Like Tyrosine-Protein Kinase At3g15890
1305235849	DRP2A	Dynamin-2A
1305236561	RPS10	Putative Ribosomal Protein S10
1305237206	RPS21B	40S Ribosomal Protein S21-1
1305237631	RPS1	40S Ribosomal Protein S1
1305240355	UGP2	UTP--Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase 1
1305240895	APX	Ascorbate Peroxidase
1305241469	HISN8	Histidinol Dehydrogenase, Chloroplastic
1305241550	NECI	Nectarin-1
1305241765	F383_21784	Differentially Expressed In FDCP 6
1305243512	AUG7	AUGMIN Subunit 7
1305244559	ME1	Malic Enzyme
1305245013	PGDH	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase
1305245105	BNAC02G43550D	Bnac02g43550d Protein
1305245695	PHB1	Prohibitin-1

Identificação	GENE	Descrição
1305245696	GAPC	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Cytosolic
1305245840	COPD	Coatomer Subunit Delta
1305246394	RHO1	Rac-Like GTP-Binding Protein RHO1
1305246561	AT1G47710	Serpin-ZX
1305246705	ADHB	Alcohol Dehydrogenase B
1305251070	IF1A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A
1305251776	TUBA1	Tubulin Alpha-1 Chain
1305253942	PDI	Protein Disulfide-Isomerase
1305254089	RPN8A	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 7 Homolog A
1305254475	ROF1	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase
1305254749	AATA	Aspartate Aminotransferase
1305255362	PAD1	Proteasome Subunit Alpha Type-7
1305255547	ALY3	THO Complex Subunit 4C
1305255869	RPL9	60S Ribosomal Protein L9
1305256387	METE	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase
1305256703	ACT7	Actin-7
1305256862	SEC22	25.3 Kda Vesicle Transport Protein
1305257014	ILVN	Acetolactate Synthase Small Subunit
1305258003	GCVP	Glycine Cleavage System P-Protein
1305258476	STRAP	Serine-Threonine Kinase Receptor-Associated Protein
1305258954	SS	Sucrose Synthase
1305259776	ACT1	Actin
1305259793	ADF1	Actin Depolymerizing Factor
1305259943	PK3	Pyruvate Kinase
1305259962	RH38	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 38
1305260377	DFR	Dihydroflavonol 4-Reductase
1305260514	SHM2	Serine Hydroxymethyltransferase
1305260751	CCT7	T-Complex Protein 1 Subunit Eta
1305261423	UNE5	Protein Disulfide-Isomerase Like 2-1
1305261861	RPL18AB	60S Ribosomal Protein L18a-2
1305262121	ALGC	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase
1305262508	MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase
1305262780	COP2	Coatomer Subunit Epsilon
1305263053	RPN6	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 11 Homolog

Identificação	GENE	Descrição
1305263630	SUS1	Sucrose Synthase
1305263674	AT2G42960	Probable Receptor-Like Protein Kinase At2g42960
1305264396	CYTB5	Cytochrome B5
1305264652	GAPA	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
1305265026	SH3P2	SH3 Domain-Containing Protein 2
1305265599	CLPB1	Chaperone Protein Clpb1
1305266613	PEX4	Protein PEROXIN-4
1305266620	RPS1	40S Ribosomal Protein S1
A0A058ZSA1	NRPB8B	DNA-Directed RNA Polymerases II, IV And V Subunit 8B
A0A058ZTE3	LUG	Transcriptional Corepressor LEUNIG
A0A058ZU13	TINI	PLAT-Plant-Stress Protein
A0A058ZVR1	METE	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase
A0A058ZWL4	BNAA06G09130D	Bnaa06g09130d Protein
A0A058ZXX4	HSP	Heat Shock Protein
A0A058ZZ48	TYRS	Tyrosyl-Trna Synthetase
A0A059A0W7	LSH10	Protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 10
A0A059A0Z0	DBR	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)
A0A059A185	PVA42	Vesicle-Associated Protein 4-2
A0A059A1L4	TOM9-2	Mitochondrial Import Receptor Subunit TOM9-2
A0A059A2H8	TFCB	Tubulin-Enrolamento Cofactor B
A0A059A2Y8	TFCE	Tubulin-Enrolamento Cofactor E
A0A059A3H5	CML49	Probable Calcium-Binding Protein CML49
A0A059A441	RPS19A	40S Ribosomal Protein S19-1
A0A059A5G5	RABA6B	Ras-Related Protein RABA6b
A0A059A5N9	RPL17B	60S Ribosomal Protein L17-2
A0A059A5T1	BNACNNG40610D	Bnacnng40610d Protein
A0A059A620	IAH1	GDSL Esterase/Lipase
A0A059A8T0	NSP5	Nitrile-Specifier Protein 5
A0A059A994	HHT1	Omega-Hydroxypalmitate O-Feruloyl Transferase
A0A059AAF3	F383_00866	Octanoyltransferase
A0A059AAU3	HTR2	Histone H3.2
A0A059ABN8	ATX1	Copper Transport Protein ATX1
A0A059ABQ9	PYD2	Dihydropyrimidinase
A0A059AC14	DIM	Delta(24)-Sterol Reductase

Identificação	GENE	Descrição
A0A059AC63	RPL35	60S Ribosomal Protein L35
A0A059ACJ5	RRP41L	Exosome Complex Component RRP41-Like
A0A059AF54	AT4G09520	Cofactor-Independent Phosphoglycerate Mutase
A0A059AFU2	HSP17	17.5 Kd Heat Shock Family Protein
A0A059AG31	POM30	Porin/Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein
A0A059AHJ7	ATP1	ATP Synthase Subunit Alpha
A0A059AJQ9	OS08G0110800	Os08g0110800 Protein
A0A059AJZ3	ATPA	V-Type Proton Atpase Catalytic Subunit A
A0A059AKN9	SMP3	Small Nuclear Ribonucleoprotein E
A0A059AL39	AATA	Aspartate Aminotransferase
A0A059ALQ0	PCKA	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase [ATP]
A0A059AMK6	AT3G50210	Probable 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase At3g49630
A0A059AN98	SRK2E	Serine/Threonine-Protein Kinase SRK2E
A0A059ANI8	FAP2	Fimbriata-Associated Protein
A0A059ANX6	M6PR	NADPH-Dependent Mannose 6-Phosphate Reductase
A0A059AP62	BNAC09G43160D	Translocon-Associated Protein Subunit Beta
A0A059AP80	TRAPPC2L	Trafficking Protein Particle Complex Subunit 2-Like Protein
A0A059APP3	DSK2B	Ubiquitin Domain-Containing Protein DSK2b
A0A059APW0	ARF1	ADP-Ribosylation Factor 1-Like 2
A0A059APZ9	ABHD17C	Protein ABHD17C
A0A059AQF9	GLR1	Glutaredoxin
A0A059AQK1	PBB1	Proteasome Subunit Beta Type-7-A
A0A059ARY0	IPP	Soluble Inorganic Pyrophosphatase
A0A059AS25	DAO	2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase DAO
A0A059ASJ4	RPL8A	60S Ribosomal Protein L8-1
A0A059AT91	GARR	2-Hydroxy-3-Oxopropionate Reductase
A0A059ATB3	PABN2	Polyadenylate-Binding Protein 2
A0A059ATM1	AT4G36680	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein At4g36680, Mitochondrial
A0A059AU56	FIP1	La-Related Protein 7
A0A059AUB0	RPL14B	60S Ribosomal Protein L14-2
A0A059AUF5	ECI2	Enoyl-CoA Delta Isomerase 2, Peroxisomal
A0A059AUG3	LEA	Late Embryogenesis Abundant Protein
A0A059AUR9	IOLS	Aldo/Keto Reductase
A0A059AV49	GDI1	Rho GDP-Dissociation Inhibitor 1

Identificação	GENE	Descrição
A0A059AVF5	BNAC04G13840D	Bnac04g13840d Protein
A0A059AWU3	NUDT7	Nudix Hydrolase 7
A0A059AWU5	NUDT2	Nudix Hydrolase 2
A0A059AXR8	PCO111077	UPF0510 Protein INM02
A0A059AXZ9	BNAC08G32180D	Bnac08g32180d Protein
A0A059AYV3	BNAA03G53770D	Bnaa03g53770d Protein
A0A059B0F6	PRCP	Lysosomal Pro-X Carboxypeptidase
A0A059B0U5	CHR2	Putative NAD(P)H-Dependent Oxidoreductase 1
A0A059B2J7	CGR	Glutathione Reductase
A0A059B3B2	AT4G34215	Probable Carbohydrate Esterase At4g34215
A0A059B4I9	RANGAP2	RAN Gtpase-Activating Protein 2
A0A059B4R0	GPM842	1,4-Beta-D-Glucanase
A0A059B5F4	CTL2	Chitinase-Like Protein 2
A0A059B5M3	ELE	Protein ELONGATED EMPTY GLUME
A0A059B685	CDA	Cytidine Deaminase
A0A059B695	AIM1	Glyoxysomal Fatty Acid Beta-Oxidation Multifunctional Protein MFP-A
A0A059B6H7	CHERP	Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein
A0A059B6Z1	RPL17	60S Ribosomal Protein L17
A0A059B752	AT5G65400	Alpha/Beta-Hydrolases Superfamily Protein
A0A059B756	NTF2	Nuclear Transport Factor 2
A0A059B9F6	HSP70	Stromal 70 Kda Heat Shock-Related Protein, Chloroplastic
A0A059BAC7	RABG3E	Ras-Related Protein RABG3e
A0A059BAK6	XYL2	Beta-Xylosidase/Alpha-L-Arabinofuranosidase 2
A0A059BB30	PYD3	Beta-Ureidopropionase
A0A059BCZ3	MTN1	5'-Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase 1
A0A059BDD0	PAC1	Putative Papain-Like Cysteine Proteinase
A0A059BEV8	MLP1	Major Latex Protein Homologue
A0A059BF26	BNACNNG24500D	Bnacnng24500d Protein
A0A059BF27	AT2G01190	Expressed Protein
A0A059BFZ0	QPT	Nicotinate-Nucleotide Pyrophosphorylase [Carboxylating], Chloroplastic
A0A059BGB3	POPTR_0008S12110G	Universal Stress Family Protein
A0A059BID0	ANN4	Annexin D4
A0A059BJN4	WLIM1	LIM Domain-Containing Protein WLIM1
A0A059BJQ0	ANT1	Adenine Nucleotide Translocator

Idêntificação	GENE	Descrição
A0A059BJS8	VEP1	3-Oxo-Delta(4,5)-Steroid 5-Beta-Reductase
A0A059BJZ3	GRF11	14-3-3-Like Protein GF14 Omicron
A0A059BKS8	SDH5	Succinate Dehydrogenase Subunit 5, Mitochondrial
A0A059BNA6	THIJ	Dihydroxyacetone Kinase
A0A059BNN1	DUT	Deoxyuridine 5'-Triphosphate Nucleotidohydrolase
A0A059BNR5	PPC16	Phosphoenolpyruvate Carboxylase, Housekeeping Isozyme
A0A059BP04	RHM1	Trifunctional UDP-Glucose 4,6-Dehydratase/UDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Glucose 3,5-Epimerase/UDP-4-Keto-L-Rhamnose-Reductase RHM1
A0A059BPQ2	AT4G35230	Probable Serine/Threonine-Protein Kinase At4g35230
A0A059BQ05	CP1	Cysteine Protease
A0A059BQQ2	ARGF	Ornithine Carbamoyltransferase, Chloroplastic
A0A059BR35	AT5G55860	WEB Family Protein At5g55860
A0A059BR71	NBP1	Nucleic Acid Binding Protein
A0A059BRW3	NAB	Alba DNA/RNA-Binding Protein
A0A059BS82	ANX2	Annexin
A0A059BSH6	CPK11	Calcium-Dependent Protein Kinase 11
A0A059BST6	AT3G15680	At3g15680
A0A059BU27	CTNNBL1	Beta-Catenin-Like Protein 1
A0A059BU35	FAL1	ATP-Dependent RNA Helicase Eif4a
A0A059BU64	EXPA13	Expansin-A13
A0A059BUW0	TRX	Thioredoxin
A0A059BUX7	FOR	Serine Hydroxymethyltransferase
A0A059BVL7	MPP	Mitochondrial-Processing Peptidase Subunit Alpha
A0A059BVM0	RABA1F	Ras-Related Protein RABA1f
A0A059BVT5	EHD1	EH Domain-Containing Protein 1
A0A059BW35	EFF	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-17 Kda
A0A059BW66	AHL10	AT-Hook Motif Nuclear-Localized Protein 10
A0A059BX81	BNAA05G36780D	Bnaa05g36780d Protein
A0A059BXD8	RPL7B	60S Ribosomal Protein L7-2
A0A059BXY8	VATB	V-Type Proton Atpase Subunit B
A0A059BYA7	ASR1	Absciscic Stress Ripening Protein-Like Protein
A0A059BYG9	PATL1	Patellin-1
A0A059BYQ4	SAPX	Stroma Ascorbate Peroxidase
A0A059BZF8	TWN2	Valine--Trna Ligase, Mitochondrial 1

Identificação	GENE	Descrição
A0A059C040	BPA1	Binding Partner Of ACD11 1
A0A059C0X8	LAR	(+)-Pinoresinol Reductase
A0A059C127	RABD2A	Ras-Related Protein RABD2a
A0A059C1F3	HSPD	Heat Shock Protein 90
A0A059C1P0	ERG1	Elicitor-Responsive Protein 1
A0A059C371	LAR	(+)-Pinoresinol Reductase
A0A059C3F6	UGT95B1	Glycosyltransferase
A0A059C4I5	CHY1	3-Hydroxyisobutyryl-CoA Hydrolase 1
A0A059C713	ITS5	Ras-Related Protein Rab-11A
A0A059C784	APK1	Ankyrin-Kinase Protein
A0A059C8I1	RAB11A	Ras-Related Protein Rab-11A
A0A059C990	HSP70	Heat Shock Cognate 70 Kda Protein
A0A059C9K2	NDB2	External Alternative NAD(P)H-Ubiquinone Oxidoreductase B2, Mitochondrial
A0A059CAG4	GDI1	Rho GDP-Dissociation Inhibitor 1
A0A059CBV7	BNAC03G19260D	Bnac03g19260d Protein
A0A059CDA7	API5	Apoptosis Inhibitor 5-Like Protein API5
A0A059CDL9	MOR1	Protein MOR1
A0A059CDU8	ELE	Protein ELONGATED EMPTY GLUME
A0A059CF43	RABA5A	Ras-Related Protein RABA5a
A0A059CG22	GALE	UDP-Glucose 4-Epimerase
A0A059CH73	MIPA	Plasma Membrane Intrinsic Protein
A0A059CHC6	ANS	Leucoanthocyanidin Dioxygenase
A0A059CHW2	TIC32	Short-Chain Dehydrogenase TIC 32, Chloroplastic
A0A059CI38	LEA	Late Embryogenesis Abundant Protein
A0A059CJL1	TCM_015569	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 21
A0A059CKM6	MOB1A	MOB Kinase Activator-Like 1A
A0A059CMV2	AT4G17486	Desi-Like Protein At4g17486
A0A059CPK8	RPN5B	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 12 Homolog B
A0A059CR72	CSN5B	COP9 Signalosome Complex Subunit 5b
A0A059CRL6	GALAK	Galacturonokinase
A0A059CRL9	GAPN	NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
A0A059CS67	GAPN	NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
A0A059CTS8	TRS120	Trafficking Protein Particle Complex II-Specific Subunit 120 Homolog
A0A059CTV1	BNAC07G44040D	Bnac07g44040d Protein

Identificação	GENE	Descrição
A0A059CTW5	VAMP713	Vesicle-Associated Membrane Protein 713
A0A059CUZ4	VIP3	WD Repeat-Containing Protein VIP3
A0A059CVJ0	RF2C	Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase RF2C
A0A059CXY7	NAB	Alba DNA/RNA-Binding Protein
A0A059CY33	GRF4	14-3-3-Like Protein GF14 Phi
A0A059CY44	PEX14	Peroxisomal Membrane Protein PEX14
A0A059CY79	AAP1	Aspartyl Aminopeptidase
A0A059CZ10	LAR	Leucoanthocyanidin Reductase
A0A059D0V8	GATY	D-Tagatose-1,6-Bisphosphate Aldolase Subunit Gaty
A0A059D1F7	CBSX6	CBS Domain-Containing Protein CBSX6
A0A059D1J7	GLU	GLU Protein
A0A059D1Q5	IFR	Isoflavone Reductase
A0A059D204	PRXIIF	Peroxiredoxin-2F, Mitochondrial
A0A059D4D4	SBP1	Ran-Specific Gtpase-Activating Protein 1
A0A059D4T0	TRPE	Anthranilate Synthase Component 1
A0A059D538	ALY	ALY Protein
A0A059D5B8	CCR	Cinnamoyl-CoA Reductase
A0A059D6N7	PGM1	Phosphoglucomutase, Cytoplasmic
A0A059D6N8	PPC3	Phosphoenolpyruvate Carboxylase Protein
A0A059D7D9	SP1L1	Protein SPIRAL1-Like 1
A0A059D803	BNAC09G05210D	Bnac09g05210d Protein
A0A059D9N8	ARALYDRAFT_488074	C2 Domain-Containing Protein
A0A059D9Y2	CXE15	Probable Carboxylesterase 15
A0A059DAA9	VAMP714	Vesicle-Associated Membrane Protein 714
A0A059DB65	RPL38A	60S Ribosomal Protein L38
A0A059DC07	PRUA1	Major Allergen Pru Av 1
A0A059DCP5	ECHIA	Probable Enoyl-CoA Hydratase 1, Peroxisomal
A0A059DDF5	PGM1	2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase
A0A059DDL6	APX2	L-Ascorbate Peroxidase 2, Cytosolic
A0A059DDR5	CAT1	Putative Cathepsin B-Like Protease
A0A059DDS4	GLP10	Germin-Like Protein Subfamily 2 Member 4
A0A059DEI1	GSTL1	Glutathione S-Transferase L1
A0A059DEM8	PPA4	Soluble Inorganic Pyrophosphatase 4
A0A059DF77	BNAC05G43030D	Bnac05g43030d Protein

Identificação	GENE	Descrição
A0A059DFA9	GLT1	Glutamate Synthase 1 [NADH], Chloroplastic
A0A059DFQ4	AIC	Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunit Alpha
A0A059DGD6	EH3	Epoxide Hydrolase 3
A0A059DGE1	APY2	Apyrase 2
A0A059DGW8	C3'H	P-Coumarate 3-Hydroxylase
A0A059DH70	RPL18AB	60S Ribosomal Protein L18a-2
A0A059DH88	PHB1	Prohibitin-1, Mitochondrial
A0A059DI37	SSL10	Protein strictosidine synthase-like 10
A0A059DJG5	PPSC	Phthiocerol Synthesis Polyketide Synthase Type I Ppsc
A0A059DJM3	SGT1B	Protein SGT1 Homolog B
A0A059DJR2	HSP83A	Heat Shock Protein 83
A0A059DJZ2	DBP	Remorin
Eucgr.A00188.1.p	PRUA1	Major Allergen Pru Av 1
Eucgr.A00378.1.p	RPP2B	60S Acidic Ribosomal Protein P2B
Eucgr.A00407.1.p	GDI	GDP Dissociation Inhibitor
Eucgr.A00774.1.p	TFIIS	Transcription Elongation Factor TFIIS
Eucgr.A01109.2.p	API	Aspartic Proteinase
Eucgr.A01225.1.p	AT2G37400	At2g37400
Eucgr.A01368.1.p	IGPS	Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase, Chloroplastic
Eucgr.A01414.1.p	CID10	Polyadenylate-Binding Protein-Interacting Protein 10
Eucgr.A01518.1.p	URH1	Uridine Nucleosidase 1
Eucgr.A01913.4.p	GRF9	14-3-3-Like Protein GF14 Mu
Eucgr.A01916.1.p	LSH10	Protein light-dependent short hypocotyls 10
Eucgr.A01955.1.p	AARA	Citrate Synthase
Eucgr.A02097.5.p	GDH1	Glutamate Dehydrogenase 1
Eucgr.A02473.1.p	KIN7K	Kinesin-Like Protein KIN-7K, Chloroplastic
Eucgr.A02564.1.p	ML	Putative ML Domain Protein
Eucgr.A02780.1.p	TPP2	Tripeptidyl-Peptidase 2
Eucgr.A02940.1.p	PABN1	Polyadenylate-Binding Protein 1
Eucgr.A02951.1.p	TOC34	Translocase Of Chloroplast 34, Chloroplastic
Eucgr.A02974.1.p	BPA1	Binding Partner Of ACD11 1
Eucgr.A02985.1.p	AT5G16730	WEB Family Protein At5g16730, Chloroplastic
Eucgr.B00038.1.p	COX12	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B
Eucgr.B00131.1.p	ADK	Adenylate Kinase

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.B00458.1.p	IQD30	At1g18840
Eucgr.B00467.1.p	RPS9C	40S Ribosomal Protein S9-2
Eucgr.B00553.1.p	TIF5A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A
Eucgr.B00605.1.p	AT5G60980	At5g60980/Msl3_100
Eucgr.B00995.1.p	MRO	Aldose 1-Epimerase
Eucgr.B01000.1.p	PTGES2	Prostaglandin E Synthase 2
Eucgr.B01156.1.p	GLU	GLU Protein
Eucgr.B01429.1.p	CRT3	Calreticulin-3
Eucgr.B01450.1.p	DBR	2-Alkenal Reductase (NADP(+)-Dependent)
Eucgr.B01499.1.p	AKR4C9	Aldo-Keto Reductase Family 4 Member C9
Eucgr.B01570.1.p	CDC5	Cell Division Cycle 5-Like Protein
Eucgr.B01579.3.p	EH1	Epoxide Hydrolase 1
Eucgr.B01762.1.p	TRAPPC6B	Trafficking Protein Particle Complex Subunit 6B
Eucgr.B01908.1.p	RPL18A	Putative 60S Ribosomal Protein L18-1
Eucgr.B02118.1.p	FCL	Bifunctional GDP-Fucose Synthetase
Eucgr.B02196.1.p	COG4	Conserved Oligomeric Golgi Complex Subunit 4
Eucgr.B02298.1.p	RAB11C	Ras-Related Protein Rab11C
Eucgr.B02433.1.p	KIN5D	Kinesin-Like Protein KIN-5D
Eucgr.B02460.1.p	P70	P70 Protein
Eucgr.B02473.1.p	REFA1	Elongation Factor 1-Alpha
Eucgr.B02496.1.p	P4HB	Protein Disulfide-Isomerase
Eucgr.B02549.1.p	PHYPADRAFT_207347	Predicted Protein
Eucgr.B02610.1.p	FHS	C-1-Tetrahydrofolate Synthase, Cytoplasmic
Eucgr.B02632.1.p	GAD4	Glutamate Decarboxylase 4
Eucgr.B02732.1.p	USP1	Universal Stress Protein 1
Eucgr.B02770.1.p	ACCA	Carboxyltransferase Alpha Subunit
Eucgr.B02907.1.p	NUDT25	Nudix Hydrolase 25
Eucgr.B03110.1.p	HSPD	Heat Shock Protein 90
Eucgr.B03112.1.p	TAG	DNA-3-Methyladenine Glycosylase 1
Eucgr.B03160.1.p	AT1G26460	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein At1g26460, Mitochondrial
Eucgr.B03349.2.p	RF2	Aldehyde Dehydrogenase
Eucgr.B03357.1.p	THRRS	Threonine--Trna Ligase, Mitochondrial 1
Eucgr.B03455.1.p	BNAA07G26580D	Signal Recognition Particle Subunit SRP72
Eucgr.B03677.1.p	BNAA02G01340D	Bnaa02g01340d Protein

Idêntificação	GENE	Descrição
Eucgr.B03696.1.p	CAD2	Cinnamoyl Alcohol Dehydrogenase
Eucgr.B03744.1.p	AT5G38900	Frne Protein-Like
Eucgr.B03786.1.p	RPL30	60S Ribosomal Protein L30
Eucgr.B03874.1.p	SKD1	Protein suppressor of K(+) transport growth defect 1
Eucgr.B03930.1.p	SODCP	Superoxide Dismutase [Cu-Zn], Chloroplastic
Eucgr.C00056.1.p	DPK1	Os08g0224100 Protein
Eucgr.C00141.1.p	KARS	Lysine--Trna Ligase
Eucgr.C00646.1.p	GDCSP	Glycine Dehydrogenase (Decarboxylating), Mitochondrial
Eucgr.C00763.1.p	AT1G73430	Sec34-Like Protein
Eucgr.C00920.1.p	AT2G19680	Copia-Like Retroelement Pol Polyprotein
Eucgr.C00931.1.p	RPL31	60S Ribosomal Protein L31
Eucgr.C00956.1.p	PFK3	ATP-Dependent 6-Phosphofructokinase 3
Eucgr.C01134.1.p	CBR2	NADH-Cytochrome B5 Reductase-Like Protein
Eucgr.C01159.1.p	SNU13	NHP2-Like Protein 1
Eucgr.C01583.1.p	CCDC25	Coiled-Coil Domain-Containing Protein 25
Eucgr.C01584.1.p	LA1	La Protein 1
Eucgr.C01895.1.p	PTC2	Protein Phosphatase 2C
Eucgr.C02542.1.p	AT5G57950	26S Proteasome Non-Atpase Regulatory Subunit 9
Eucgr.C02663.1.p	SDF2	Stromal Cell-Derived Factor 2-Like Protein
Eucgr.C02730.1.p	RPS11A	40S Ribosomal Protein S11-1
Eucgr.C02894.1.p	ASP3	Aspartate Aminotransferase 3, Chloroplastic
Eucgr.C03069.1.p	APM1	Aminopeptidase M1
Eucgr.C03295.1.p	CPN21	20 Kda Chaperonin, Chloroplastic
Eucgr.C03783.1.p	SKIP	SNW/SKI-Interacting Protein
Eucgr.D00288.1.p	GLO5	Peroxisomal (S)-2-Hydroxy-Acid Oxidase GLO5
Eucgr.D00699.1.p	PPSC	Phthiocerol Synthesis Polyketide Synthase Type I Ppsc
Eucgr.D01025.1.p	MUR4	UDP-Arabinose 4-Epimerase 1
Eucgr.D01026.1.p	COP2	Coatomer Subunit Epsilon
Eucgr.D01033.1.p	SLP	Charged Multivesicular Body Protein
Eucgr.D01166.1.p	UMK3	UMP-CMP Kinase 3
Eucgr.D01336.1.p	GLOA	Glyoxalase I
Eucgr.D01683.1.p	BNAUNNG00170D	Bnaunng00170d Protein
Eucgr.D01838.1.p	TIC32	Short-Chain Dehydrogenase TIC 32, Chloroplastic
Eucgr.D01975.1.p	AHL1	AT-Hook Motif Nuclear-Localized Protein 1

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.D01990.1.p	CML13	Probable Calcium-Binding Protein CML13
Eucgr.D02096.1.p	RPL15	60S Ribosomal Protein L15
Eucgr.D02119.1.p	RABD2C	Ras-Related Protein RABD2c
Eucgr.D02202.1.p	AGD8	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD8
Eucgr.D02508.1.p	RPS14A	40S Ribosomal Protein S14-1
Eucgr.D02638.1.p	AE7	Protein AE7
Eucgr.D02652.1.p	IP1	Soluble Inorganic Pyrophosphatase
Eucgr.E00118.1.p	CS1	Cysteine Synthase
Eucgr.E00279.1.p	PYR1	Absciscic Acid Receptor PYR1
Eucgr.E00356.2.p	CLPR4	ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit-Related Protein 4, Chloroplastic
Eucgr.E00394.2.p	PPTE	Palmitoyl Protein Thioesterase
Eucgr.E00620.1.p	PGDH	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase
Eucgr.E01107.1.p	CAD2	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase 2
Eucgr.E01220.3.p	RPL13B	60S Ribosomal Protein L13-1
Eucgr.E01244.1.p	UGT95B1	Glycosyltransferase
Eucgr.E01434.1.p	DFR	Dihydroflavonol 4-Reductase
Eucgr.E01779.1.p	AT2G44310	Calcium-Binding EF-Hand-Containing Protein
Eucgr.E01909.1.p	ACOB	Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Beta Subunit
Eucgr.E02058.1.p	ASR5	ASR5 Protein
Eucgr.E02409.2.p	OS06G0538900	Os06g0538900 Protein
Eucgr.E02482.3.p	AIR9	187-Kda Microtubule-Associated Protein AIR9
Eucgr.E03898.1.p	MSI2B	Putative Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1-Like
Eucgr.E04057.1.p	CPK1	Calcium-Dependent Protein Kinase
Eucgr.E04317.1.p	SRC	Src Homology 3 Domain Containing Protein
Eucgr.F00026.3.p	PTPA	Prolyl Tripeptidyl Peptidase
Eucgr.F00193.1.p	PAB2	Polyadenylate-Binding Protein 2
Eucgr.F00411.1.p	AED3	Aspartyl Protease AED3
Eucgr.F00419.1.p	POPTR_0002S10560G	DNAJ Heat Shock N-Terminal Domain-Containing Family Protein
Eucgr.F00471.1.p	XYLB	Xylulose Kinase
Eucgr.F00624.1.p	BNAA01G15770D	Bnaa01g15770d Protein
Eucgr.F00627.1.p	RPS8	40S Ribosomal Protein S8
Eucgr.F00650.2.p	PLE	Microtubule-Associated Protein MAP65-1a
Eucgr.F01476.1.p	PGK	Phosphoglycerate Kinase
Eucgr.F01589.1.p	DFR	Dihydroflavonol 4-Reductase

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.F01710.1.p	ECH2	Enoyl-Coa Hydratase 2, Peroxisomal
Eucgr.F01776.1.p	CAT2	Catalase
Eucgr.F01791.1.p	BNAA08G04550D	Bnaa08g04550d Protein
Eucgr.F01820.1.p	BNAA07G32790D	Bnaa07g32790d Protein
Eucgr.F02033.1.p	GPM690	SNF2 Transcription Factor
Eucgr.F02243.1.p	SF3	Pollen-Specific Protein SF3
Eucgr.F02479.1.p	AOC	Allene Oxide Cyclase
Eucgr.F02482.1.p	GRF3	14-3-3-Like Protein GF14 Psi
Eucgr.F02946.1.p	HARS	Histidine--Trna Ligase, Cytoplasmic
Eucgr.F03107.1.p	PP2AB1	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A 55 Kda Regulatory Subunit B Alpha Isoform
Eucgr.F03161.2.p	DLAA	Acetyltransferase Component Of Pyruvate Dehydrogenase Complex
Eucgr.F03224.1.p	RBSK	Ribokinase
Eucgr.F03278.2.p	RAB	Small Gtp Rab11
Eucgr.F03438.1.p	PDI5	Protein Disulfide-Isomerase 5-4
Eucgr.F03866.1.p	HSP26.5	26.5 Kda Heat Shock Protein, Mitochondrial
Eucgr.F04071.1.p	BNAA05G00830D	Bnaa05g00830d Protein
Eucgr.F04241.1.p	AT1G43690	At1g43690/F2J6_4
Eucgr.F04279.1.p	ARPN	Basic Blue Protein
Eucgr.F04303.1.p	AG118	Acetylornithine Aminotransferase, Mitochondrial
Eucgr.G00557.1.p	PK5	Serin/Threonine Protein Kinase
Eucgr.G00778.2.p	AT1G34750	Probable Protein Phosphatase 2C 10
Eucgr.G01186.1.p	TUBA1	Tubulin Alpha-1 Chain
Eucgr.G01295.1.p	AT2G18990	Thioredoxin Domain-Containing Protein 9 Homolog
Eucgr.G01646.1.p	OS01G0702450	Os01g0702450 Protein
Eucgr.G01711.1.p	COPA	Coatomer Subunit Alpha
Eucgr.G01943.1.p	ATC	V-Type Proton Atpase Subunit C
Eucgr.G02110.1.p	PXG4	Probable Peroxygenase 4
Eucgr.G02304.1.p	ATJ15	Chaperone Protein Dnaj 15
Eucgr.G02481.1.p	PIN4	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase NIMA-Interacting 4
Eucgr.G02508.1.p	AT1G26850	Probable Methyltransferase PMT2
Eucgr.G02690.1.p	RPS25	40S Ribosomal Protein S25
Eucgr.G02703.1.p	ATX1	Copper Transport Protein ATX1
Eucgr.G02852.1.p	PAL6	Phenylalanine Ammonia-Lyase
Eucgr.G03086.1.p	PCO091084	Acid Phosphatase

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.G03122.1.p	AT2G40480	WEB Family Protein At2g40480
Eucgr.G03138.2.p	CHI3	Probable Chalcone--Flavonone Isomerase 3
Eucgr.G03244.2.p	EIF2B2	Translation Initiation Factor Eif-2B Subunit Beta
Eucgr.G03402.1.p	AT5G42850	Thioredoxin-Like Protein Clot
Eucgr.H00059.1.p	CYTB5	Cytochrome B5
Eucgr.H00136.1.p	RNP1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1
Eucgr.H00191.1.p	WDL3	Protein WVD2-Like 3
Eucgr.H00238.1.p	MAP2B	Methionine Aminopeptidase 2B
Eucgr.H00286.1.p	RPL5	60S Ribosomal Protein L5
Eucgr.H00308.1.p	IQD13	Iqd1
Eucgr.H00450.1.p	AT1G44835	Ybak/Aminoacyl-Trna Synthetase-Associated Domain-Containing Protein
Eucgr.H00877.1.p	GAL83	SNF1-Related Protein Kinase Regulatory Subunit Beta-2
Eucgr.H01055.1.p	BXL2	Probable Beta-D-Xylosidase 2
Eucgr.H01084.1.p	RPL19	60S Ribosomal Protein L19
Eucgr.H01421.1.p	MAC2	Phosphoglucosamine Mutase Family Protein
Eucgr.H02217.1.p	GXM3	Putative Polysaccharide Biosynthesis Protein
Eucgr.H02345.1.p	PRCP	Lysosomal Pro-X Carboxypeptidase
Eucgr.H02828.1.p	ACS	Chalcone Synthase
Eucgr.H02962.1.p	EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
Eucgr.H03028.1.p	RPL14B	60S Ribosomal Protein L14-2
Eucgr.H03058.1.p	ADF	Actin-Depolymerizing Factor
Eucgr.H03316.1.p	BNAA07G12540D	Bnaa07g12540d Protein
Eucgr.H03367.1.p	F11M15.2	At1g51160
Eucgr.H04377.1.p	PNG1	Peptide-N(4)-(N-Acetyl-Beta-Glucosaminy)Asparagine Amidase
Eucgr.H04516.4.p	RPS21	40S Ribosomal Protein S21
Eucgr.H04551.1.p	RPL18B	60S Ribosomal Protein L18-2
Eucgr.H04748.1.p	DAHPS2	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonate Aldolase 2, Chloroplastic
Eucgr.H05072.1.p	NEP1	Aspartic Proteinase Nepenthesin-1
Eucgr.H05116.1.p	AUX11	Auxilin-Related Protein 1
Eucgr.I00183.1.p	RGLG	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RGLG
Eucgr.I00224.3.p	ADH1	Alcohol Dehydrogenase 1
Eucgr.I00240.1.p	ACT7	Actin-7
Eucgr.I00278.1.p	AAK1	AP2-Associated Protein Kinase 1
Eucgr.I00520.1.p	PABN3	Polyadenylate-Binding Protein 3

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.I00692.2.p	RUVBL2	Ruvb-Like 2
Eucgr.I00804.1.p	PTEN2A	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Protein-Tyrosine-Phosphatase PTEN2A
Eucgr.I01100.1.p	MTK	Methylthioribose Kinase
Eucgr.I01282.1.p	RPS25B	40S Ribosomal Protein S25-2
Eucgr.I01305.1.p	PAC1	Putative Papain-Like Cysteine Proteinase
Eucgr.I01335.1.p	BZIP28	BZIP Transcription Factor Bzip28
Eucgr.I01402.1.p	SBT1	Subtilisin-Like Protease
Eucgr.I01404.1.p	ERD7	Probable Senescence Related Protein
Eucgr.I01541.1.p	ACY1	Aminoacylase-1
Eucgr.I01553.3.p	HDA19	Histone Deacetylase 19
Eucgr.I01561.1.p	ERF1	Eukaryotic Peptide Chain Release Factor Subunit 1
Eucgr.I01663.1.p	FRR	Ribosome-Recycling Factor
Eucgr.I01692.2.p	PUX1	Plant UBX Domain-Containing Protein 1
Eucgr.I01732.1.p	GC6	Golgin Candidate 6
Eucgr.I02318.1.p	TCM_000149	Winged-Helix DNA-Binding Transcription Factor Family Protein, Putative
Eucgr.I02331.1.p	RHO1	Rac-Like GTP-Binding Protein RHO1
Eucgr.I02352.1.p	MTR_5G021990	WEB Family Plant Protein
Eucgr.I02422.1.p	LAR	(+)-Pinoresinol Reductase
Eucgr.I02469.1.p	APP2	Xaa-Pro Aminopeptidase 2
Eucgr.I02515.1.p	PIP	Proline Iminopeptidase
Eucgr.I02742.1.p	SAPK6	Serine/Threonine-Protein Kinase SAPK6
Eucgr.I02747.1.p	FEY	Oxidoreductase FEY3
Eucgr.I02775.1.p	PUR2	Phosphoribosylamine--Glycine Ligase, Chloroplastic
Eucgr.I02794.1.p	AT1G10310	NADPH-Dependent Pterin Aldehyde Reductase
Eucgr.I02797.1.p	AT2G02570	Nucleic Acid Binding/RNA Binding Protein
Eucgr.J00058.2.p	TCM_042950	Translation Initiation Factor IF-2, Putative
Eucgr.J00124.1.p	SODA	Superoxide Dismutase [Mn], Mitochondrial
Eucgr.J00283.1.p	PSUR	Uricase
Eucgr.J00379.1.p	FUC1	Alpha-L-Fucosidase 1
Eucgr.J00413.1.p	AXS1	UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 1
Eucgr.J00434.1.p	AT5G22580	Stress-Response A/B Barrel Domain-Containing Protein At5g22580
Eucgr.J00529.1.p	NIT4A	Bifunctional Nitrilase/Nitrile Hydratase NIT4A
Eucgr.J00612.1.p	METE	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--Homocysteine Methyltransferase
Eucgr.J00787.1.p	OEP80	Outer Envelope Protein 80, Chloroplastic

Idêntificação	GENE	Descrição
Eucgr.J00865.1.p	HCF136	Photosystem II Stability/Assembly Factor HCF136, Chloroplastic
Eucgr.J00965.1.p	APX	Cytosolic Ascorbate Peroxidase
Eucgr.J01044.1.p	RZ1C	Glycine-Rich RNA-Binding Protein RZ1C
Eucgr.J01052.1.p	EST	Esterase
Eucgr.J01085.1.p	DCP2	Mrna-Decapping Enzyme Subunit 2
Eucgr.J01178.1.p	NQR	NADPH:Quinone Oxidoreductase
Eucgr.J01257.1.p	AT5G48020	At5g48020
Eucgr.J01359.2.p	NABP	KH Domain-Containing Protein
Eucgr.J01387.1.p	SP1L1	Protein SPIRAL1-Like 1
Eucgr.J01534.1.p	METTTL10	Protein-Lysine N-Methyltransferase METTTL10
Eucgr.J01600.1.p	ALY1	THO Complex Subunit 4A
Eucgr.J01603.1.p	ARL8B	ADP-Ribosylation Factor-Like Protein 8B
Eucgr.J01844.1.p	C4H	Cinnamate 4-Hydroxylase
Eucgr.J01907.1.p	UBA1	Ubiquitin-Activating Enzyme E1 1
Eucgr.J02049.2.p	TRIP1	Triosephosphate Isomerase, Cytosolic
Eucgr.J02053.1.p	OEP16	Outer Envelope Pore Protein 16, Chloroplastic
Eucgr.J02080.1.p	PSS	11S Seed Storage Protein
Eucgr.J02213.1.p	MAP4K4	MAP Kinase
Eucgr.J02308.1.p	PDCL3	Phosducin-Like Protein 3
Eucgr.J02422.1.p	RPL8A	60S Ribosomal Protein L8-1
Eucgr.J02824.1.p	DRG1	Developmentally-Regulated G-Protein 1
Eucgr.J02844.1.p	CKL5	Casein Kinase I Isoform Delta-Like Protein
Eucgr.J02848.1.p	AT1G72880	At1g72880
Eucgr.J03099.1.p	RAE1	Protein RAE1
Eucgr.J03127.1.p	HSP70	Heat Shock Cognate 70 Kda Protein
Eucgr.J03195.1.p	YTP13	YTH Domain-Contained RNA Binding Protein 13
Eucgr.K00245.1.p	MSBP2	Membrane Steroid-Binding Protein 2
Eucgr.K00276.1.p	RPL36B	60S Ribosomal Protein L36-2
Eucgr.K00374.1.p	DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4
Eucgr.K00657.2.p	RNP	Hnrnp
Eucgr.K00816.1.p	FASS	Sucrose Synthase
Eucgr.K01091.1.p	WHY2	Single-Stranded DNA-Bindig Protein WHY2, Mitochondrial
Eucgr.K01314.1.p	APGM	Phosphoglycerate Mutase (2,3-Diphosphoglycerate-Independent)
Eucgr.K01327.1.p	RH53	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 53

Identificação	GENE	Descrição
Eucgr.K01363.1.p	EFTS	Elongation Factor Ts, Mitochondrial
Eucgr.K01428.1.p	AT5G43960	Gb}
Eucgr.K01667.2.p	SCAB3	Stomatal Closure-Related Actin-Binding Protein 3
Eucgr.K02019.1.p	SFGH	S-Formylglutathione Hydrolase
Eucgr.K02133.1.p	GAUT8	Galacturonosyltransferase 8
Eucgr.K02138.1.p	FHA2	FHA Domain-Containing Protein FHA2
Eucgr.K02304.1.p	AGO1A	Protein Argonaute 1A
Eucgr.K02506.1.p	UGD3	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase 3
Eucgr.K02521.1.p	CLPB1	Chaperone Protein Clpb1
Eucgr.K02531.1.p	PSP	Phosphoserine Phosphatase, Chloroplastic
Eucgr.K02637.1.p	NHP2	H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2
Eucgr.K02766.1.p	AT5G63190	MA3 Domain-Containing Protein
Eucgr.K02807.1.p	HDA6	Histone Deacetylase 6
Eucgr.K02858.1.p	ALDH	Aldehyde Dehydrogenase, Mitochondrial
Eucgr.K02890.1.p	EDS1B	Protein EDS1B
Eucgr.K02950.1.p	PGSC0003DMG400015887	Light-Inducible Protein ATLS1
Eucgr.K03154.1.p	AGD6	Probable ADP-Ribosylation Factor Gtpase-Activating Protein AGD6
Eucgr.K03188.1.p	NUP43	Nuclear Pore Complex Protein NUP43
Eucgr.K03211.1.p	RPS23A	40S Ribosomal Protein S23-1
Eucgr.K03456.1.p	GSTF13	Glutathione S-Transferase F13
Eucgr.K03506.1.p	IPK2B	Inositol Polyphosphate Multikinase Beta
Eucgr.K03512.2.p	RPL19B	60S Ribosomal Protein L19-2
Eucgr.K03531.1.p	PDI	Protein Disulfide Isomerase
Eucgr.L00429.1.p	DIR23	Dirigent Protein 23
Eucgr.L00752.1.p	RPL7B	60S Ribosomal Protein L7-2
Eucgr.L01334.1.p	LAR	(+)-Pinoresinol Reductase
Eucgr.L01448.1.p	GLOA	Glyoxalase I
Eucgr.L02937.1.p	CBR1	Cytochrome B5 Reductase
Eucgr.L03148.1.p	IOLS	Aldo/Keto Reductase

Quadro 2 – Proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas exclusivamente no clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento de plantio 6 x 0,5 m. Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt) e classificadas de acordo com a base de dados KEEG.

Identificação	Descrição	Classificação
629096116	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Desconhecido
629119213	Flavonoid 3'-hydroxylase	Metabolismo secundário
629123696	GDP-mannose-dependent alpha-mannosyltransferase	Metabolismo de lipídeos
702363330	Aspartic proteinase A1	Enrolamento, direcionamento e degradação
702364532	Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD5 isoform X2	Transcrição e tradução
1091522484	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 A	Processos celulares
1305219194	Fructose-bisphosphate aldolase	Fotossíntese
1305241469	Histidinol dehydrogenase (chloroplastic)	Metabolismo de aminoácidos
1305246394	Rac-like GTP-binding protein RHO1	Sinalização
1305262508	Methylenetetrahydrofolate reductase	Metabolismo de carboidrato
A0A058ZVR1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Metabolismo de aminoácidos
A0A059AWU3	Nudix hydrolase 7	Outros metabolismos
A0A059BB30	Beta-ureidopropionase	Outros metabolismos
A0A059BUX7	Serine hydroxymethyltransferase	Fotossíntese
A0A059CXY7	Alba DNA/RNA-binding protein	Desconhecido
Eucgr.C00056.1.p	Os08g0224100 protein	Outros

Quadro 3 – Proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas exclusivamente no clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento de plantio 6 x 0,5 m. Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt) e classificadas de acordo com a base de dados KEEG.

Identificação	Descrição	Classificação
108802652	Acetyl-coa carboxylase carboxyl transferase beta subunit (chloroplast)	Metabolismo de lipídeos
444436423	CIP-like protein, partial	Processos celulares
629081465	CDPK-related kinase 1	Outros
629082745	Vignain	Enrolamento, direcionamento e degradação
629097699	Tryptophan synthase alpha chain	Metabolismo de aminoácidos
629113283	Gibberellin receptor GID1, putative	Desconhecido
629124716	Calmodulin binding protein IQD22	Sinalização
702243703	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	Outros
702323177	Protein SEH1	Processos celulares
702340189	Isoflavone reductase homolog	Metabolismo secundário
702376312	Serine/threonine phosphatase 2A 55 kda regulatory subunit B alpha isoform isoform X2	Outros
702431007	60S ribosomal protein L35-2	Transcrição e tradução
702432686	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic	Metabolismo de lipídeos

Conclusão		
Identificação	Descrição	Classificação
702447288	Probable receptor-like protein kinase At5g18500	Outros
702449215	Serine/threonine-protein phosphatase PP1	Outros
702468476	Dynamin-related protein 3A isoform X1	Outros
702486716	Mitogen-activated protein kinase homolog NTF6	Sinalização
702497207	SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1	Processos celulares
702518670	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform	Redox
1091467174	At4g05400	Desconhecido
1091470860	Eukaryotic translation initiation factor 4G, partial	Transcrição e tradução
1091478282	Protein MOR1-like	Processos celulares
1305220233	Atpase AAA-2 domain protein	Enrolamento, direcionamento e degradação
1305251776	Tubulin alpha-1 chain	Processos celulares
1305255547	THO complex subunit 4C	Transcrição e tradução
1305256862	25.3 kda vesicle transport protein	Outros
1305257014	Acetolactate synthase small subunit	Metabolismo de aminoácidos
1305258003	Glycine cleavage system P-protein	Fotossíntese
A0A059AN98	Serine/threonine-protein kinase SRK2E	Outros
A0A059C4I5	3-hydroxyisobutyryl-coa hydrolase 1	Metabolismo de aminoácidos
A0A059CVJ0	Cytosolic aldehyde dehydrogenase RF2C	Outros
A0A059DDG3	Phenylalanine ammonia-lyase	Metabolismo secundário
Eucgr.B03744.1.p	Frne protein-like	Desconhecido
Eucgr.C00956.1.p	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3	Metabolismo de carboidrato
Eucgr.D01166.1.p	UMP-CMP kinase 3	Outros metabolismos
Eucgr.J00379.1.p	Alpha-L-fucosidase 1	Processos celulares
Eucgr.L00429.1.p	Dirigent protein 23	Defesa e estresse

Quadro 4 – Proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas exclusivamente no clone de *Corymbia* sp. cultivado no espaçamento de plantio 3 x 3 m. Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt) e classificadas de acordo com a base de dados KEEG.

Identificação	Descrição	Classificação
629088000	ADH1	Outros
629089786	2-methylene-furan-3-one reductase	Outros
629098507	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 5	Processos celulares
629105432	At4g22290	Desconhecido
629112815	Mitochondrial small heat shock protein	Defesa e estresse
629122020	COBW domain-containing protein 1	Desconhecido
629125909	Dirigent protein 21	Defesa e estresse

			Conclusão
Identificação	Descrição	Classificação	
702328474	THO complex subunit 7A	Desconhecido	
702442266	Protein light-dependent short hypocotyls 4	Desconhecido	
702473465	Os01g0265700 protein	Desconhecido	
702491419	Glutathione S-transferase F9	Outros	
702497226	Adenylate kinase 4	Outros metabolismos	
1091446679	Hypersensitive-induced response protein 1 isoform X1	Desconhecido	
1091482911	Universal stress protein A-like protein	Outros	
1091484243	Gama-glutamyl hydrolase 2-like	Enrolamento, direcionamento e degradação	
1091492445	Luminal-binding protein 5	Defesa e estresse	
1091508701	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 2	Metabolismo energético	
1305213106	3-isopropylmalate dehydrogenase 2, chloroplastic	Metabolismo de aminoácidos	
1305232425	Threonine--tRNA ligase, mitochondrial 1	Outros	
1305259793	Actin depolymerizing factor	Processos celulares	
1305259962	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	Transcrição e tradução	
1305260751	T-complex protein 1 subunit eta	Enrolamento, direcionamento e degradação	
1305263674	Probable receptor-like protein kinase At2g42960	Outros	
1305264396	Cytochrome b5	Redox	
A0A059BDD0	Putative papain-like cysteine proteinase	Enrolamento, sorting e degradação	
A0A059CRL9	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo de carboidrato	
Eucgr.E00620.1.p	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Metabolismo de aminoácidos	
Eucgr.G02110.1.p	Probable peroxygenase 4	Outros	
Eucgr.J00865.1.p	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic	Fotossíntese	

Quadro 5 – Proteínas do tecido cambial diferencialmente reguladas exclusivamente no clone de *Eucalyptus* sp. cultivado no espaçamento de plantio 3 x 3 m. Proteínas identificadas por nLC-MS/MS (Orbitrap, Q-OT-qIT) usando algoritmos SEQUEST e as bases de dados de *Eucalyptus grandis* (Phytozome, NCBI e UniProt) e classificadas de acordo com a base de dados KEEG.

Identificação	Descrição	Classificação
383081915	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	Metabolismo secundário
629079882	ACI13	Desconhecido
629082787	60S ribosomal protein l27a-2	Transcrição e tradução
629085923	At5g47870	Desconhecido
629088030	Protein BOLA2	Transcrição e tradução
629089300	Expressed protein	Desconhecido
629089574	Glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 2	Desconhecido
629089735	Glutaredoxin	Redox
629102018	Protein DJ-1 homolog C	Desconhecido

Continuação

Identificação	Descrição	Classificação
629102509	SKP1-like protein 15	Enrolamento, direcionamento e degradação
629102866	THO complex subunit 3	Desconhecido
629119088	HVA22-like protein a	Metabolismo de lipídeos
629119851	Peptide methionine sulfoxide reductase B5	Outros
629120160	MPBQ/MSBQ methyltransferase	Metabolismo secundário
702236671	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Outros
702236827	Probable transcription factor posf21 isoform X1	Transcrição e tradução
702241109	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12 isoform X1	Outros
702263471	Membrane-associated protein VIPP1, chloroplastic	Transcrição e tradução
702286222	MLP-like protein 28	Defesa e estresse
702315563	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	Sinalização
702315825	Thioredoxin O2, mitochondrial	Redox
702352556	Bnaa07g23940d protein	Transcrição e tradução
702376479	Predicted protein	Desconhecido
702381856	Bnaa03g24300d protein	Desconhecido
702433245	MLP-like protein 28	Defesa e estresse
702433338	Probable aldo-keto reductase 2	Metabolismo de lipídeos
702436386	Probable receptor-like protein kinase At5g18500	Outros
702441199	60S ribosomal protein l13a-4	Transcrição e tradução
702446748	Major allergen Pru ar 1	Desconhecido
702450603	Histone H3.2	Transcrição e tradução
702450701	50S ribosomal protein L17	Transcrição e tradução
702463130	cyclase-associated protein 1	Transcrição e tradução
702472013	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 14 isoform X1	Enrolamento, direcionamento e degradação
702495326	Probable calcium-binding protein CML27	Sinalização
702498370	BAG family molecular chaperone regulator 4 isoform X1	Defesa e estresse
702509064	Acetyl-coa acetyltransferase, cytosolic 1	Metabolismo de aminoácidos
1091439212	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Outros
1091441746	Glutathione S-transferase L3 isoform X1	Outros
1091453050	Nudix hydrolase 1	Outros metabolismos
1091458538	DNA-directed RNA polymerases II and IV subunit 5A	Transcrição e tradução
1091458724	Probable receptor-like protein kinase At5g15080 isoform X1	Outros
1091473808	Coatomer subunit zeta-1 isoform X1	Outros
1091485468	Ribonuclease P protein subunit p25-like protein isoform X1	Transcrição e tradução
1091490056	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase 1	Metabolismo de aminoácidos
1091499095	nitrogen regulatory protein P-II homolog	Sinalização
1091524286	Prolyl-trna synthetase associated domain-containing protein 1-like	Outros

			Conclusão
Identificação	Descrição	Classificação	
1305227702	Probable receptor-like protein kinase At5g18500	Outros	
1305261861	60S ribosomal protein l18a-2	Transcrição e tradução	
A0A058ZTE3	Transcriptional corepressor LEUNIG	Transcrição e tradução	
A0A059A2H8	Tubulin-Enrolamento cofactor B	Processos celulares	
A0A059A620	GDSL esterase/lipase	Outros	
A0A059B3B2	Probable carbohydrate esterase At4g34215	Desconhecido	
A0A059BID0	Annexin D4	Processos celulares	
A0A059BLB6	HVA22-like protein	Metabolismo de lipídeos	
A0A059BNA6	Dihydroxyacetone kinase	Desconhecido	
A0A059CAG4	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Sinalização	
A0A059CAL9	Glycine cleavage system H protein	Fotossíntese	
A0A059D1D6	Mitochondrial pyruvate	Desconhecido	
A0A059DEJ0	S-adenosylmethionine synthase	Metabolismo de aminoácidos	
A0A059DGD6	Epoxide hydrolase 3	Outros	
A0A059DGE1	Apyrase 2	Outros metabolismos	
A0A059DH70	60S ribosomal protein l18a-2	Transcrição e tradução	
Eucgr.A01518.1.p	Uridine nucleosidase 1	Outros metabolismos	
Eucgr.A01913.4.p	14-3-3-like protein GF14 mu	Sinalização	
Eucgr.A01916.1.p	Protein light-dependent short hypocotyls 10	Desconhecido	
Eucgr.A02940.1.p	Polyadenylate-binding protein 1	Transcrição e tradução	
Eucgr.C01159.1.p	NHP2-like protein 1	Transcrição e tradução	
Eucgr.E01107.1.p	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase 2	Metabolismo secundário	
Eucgr.F00419.1.p	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing family protein	Defesa e estresse	
Eucgr.F04279.1.p	Basic blue protein	Outros	
Eucgr.G01943.1.p	V-type proton atpase subunit C	Transporte	
Eucgr.G02481.1.p	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Processos celulares	
Eucgr.H00450.1.p	Ybak/aminoacyl-trna synthetase-associated domain-containing protein	Outros	
Eucgr.H04377.1.p	Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase	Enrolamento, direcionamento e degradação	
Eucgr.I02422.1.p	(+)-pinorensinol reductase	Metabolismo secundário	
Eucgr.I02797.1.p	Nucleic acid binding/RNA binding protein	Desconhecido	
Eucgr.K02637.1.p	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	Transcrição e tradução	