

**Fernanda Salvato**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Identificação das proteínas diferencialmente expressas na região cambial de  
*Eucalyptus grandis* durante a indução da formação da madeira de reação**

Orientador:

Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

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

**Piracicaba**

**2010**

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

Salvato, Fernanda  
Identificação das proteínas diferencialmente expressas na região cambial de  
*Eucalyptus grandis* durante a indução da formação da madeira de reação / Fernanda  
Salvato. -- Piracicaba, 2010.  
263 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Eucalipto 2. Madeira - Formação 3. Metabolismo de carboidrato 4. Parede celular  
vegetal 5. Proteínas I. Título

CDD 634.9734  
S182I

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

*Aos meus pais, Darlene e José Miguel,*

*... por sonharem meus sonhos,*

*por confiarem em mim com tanto amor,*

*pelo apoio incondicional nas minhas decisões,*

*pela base familiar sólida, onde a honestidade e a dignidade constroem a  
essência do caráter...*

*Vislumbro em vocês a força de guerreiros que lutaram e lutam até hoje para  
prover os filhos com conforto. Teus ensinamentos fazem de mim hoje uma  
pessoa alegre e decidida, cumpridora dos meus deveres. Vocês me deram o  
presente mais valioso: minha formação e minha educação, presentes que  
nunca nada ou ninguém poderá arrancar de mim. Amo vocês!*

*A vocês dedico todos esses anos de estudo.*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para seguir em frente e alcançar todos meus objetivos me amparando nos momentos alegres e nos mais difíceis;

À USP e à ESALQ pela formação profissional proporcionada dentro de uma instituição séria e considerada patrimônio nacional;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade, orientação e amizade, essenciais na minha formação profissional e pessoal;

Ao CNPQ pelo oferecimento de uma bolsa para a elaboração desse trabalho;

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

À Ms José Maria Miranda, responsável pelo Laboratório de Anatomia da Madeira e Identificação de Madeiras do IPT, pela disponibilização da infraestrutura para a realização do estudo anatômico da madeira;

Aos professores e pesquisadores: Márcio Lambais, Siu Mui Tsai, João Lúcio de Azevedo, Aline A. Pizzirani Kleiner e Wellington L. Araújo pelo empréstimo de equipamentos;

Ao meu grande amigo Eduardo (Zzé) pela paciência e pelo ombro amigo. A pós-graduação já valeu e muito por ter a companhia de uma pessoa tão sincera e linda como você. Obrigada por estar sempre pronto para ouvir minhas preocupações e, pelos dias e noites de trabalho, acompanhados de muita risada e alegria. Ahh, se não fosse a existência do Skype, o que seria desta tese!!! Estarei sempre do seu lado e torcendo muito para seu sucesso!

Ao Dr. David Henry Moon pela grande paciência, amizade e orientação profissional;

À Dr. Mônica pela amizade, pela preocupação com meu bem estar, orientação profissional e pelas risadas constantes;

Às amigas Danielle e Mayra pelo apoio oferecido durante o desenvolvimento desse trabalho, pela troca de experiências, pelos desabafos e também brincadeiras que fizeram que tudo ficasse mais leve;

Aos meus novos amigos Thiago e Juliana, pelo coleguismo dentro do laboratório e pela amizade sincera. Estarei sempre torcendo por vocês!

Aos amigos do Laboratório Max Feffer: Alexander, Matheus, Ilara, Felipe, Ivan, Gisele, Lília, Daniela e Edi, pela grande ajuda no dia-a-dia e coleguismo;

Aos meus amigos de toda hora: Raqueline e Ricardo, Lívia e Cristiano, Danielle e Maurício pelos churrascos animados, pelos dias e noites de muita diversão;

Aos amigos do Laboratório de microrganismos: Carol, Manuela, Aline, Léia, Marise, Carlão, Andréia e Michele. Todos sempre muito prestativos e amigáveis. Nossas conversas do dia-a-dia de trabalho, às vezes sérias, às vezes só de brincadeiras, me ajudaram muito durante essa caminhada. Adorei ter tido vocês ao meu lado!;

À minha “hermana” Gabriela Conti, pelas conversas filosóficas, científicas e pessoais profundas. Você foi uma companheira e tanto no trabalho, nas festas e nas atrapalhadas do dia-a-dia;

Aos meus amigos de coração Caroline (Fúiu), Alex (Sufoco) e Andressa que sempre estiveram me apoiando e torcendo para meu sucesso;

"O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde por não saber mais."

*William Cowper*



## SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Biossíntese da Madeira.....	27
2.1.1 Atividade do Câmbio Vascular.....	27
2.1.2 Estádios de Diferenciação no xilema.....	28
2.1.3 Estrutura da Parede Celular.....	30
2.2 Biossíntese dos componentes da parede celular.....	32
2.2.1 Precursores dos carboidratos da parede celular.....	32
2.2.2 Metabolismo dos carboidratos durante a deposição da parede celular primária.....	34
2.2.3 Metabolismo dos carboidratos durante a expansão celular.....	37
2.2.4 Biossíntese de lignina.....	39
2.2.5 Regulação da biossíntese do xilema secundário.....	41
2.3 Madeira de reação.....	42
2.3.1 Indução da formação da madeira de reação.....	44
2.3.2 Fitormônios e a formação da madeira de reação.....	45
2.3.3 Madeira de tração.....	46
2.3.4 Composição da camada G.....	48
2.3.5 Madeira de tração como modelo de estudo.....	49
2.4 Proteômica.....	51
3 OBJETIVOS.....	55
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	57

4.1 Coleta do material.....	57
4.2 Microscopia óptica.....	60
4.3 Extração de proteínas.....	60
4.3.1 Solubilização de proteínas.....	61
4.3.2 Quantificação das proteínas.....	61
4.3.3 SDS-PAGE (Mini-Gel).....	62
4.4 Eletroforese bidimensional.....	62
4.4.1 Focalização isoeétrica (Primeira Dimensão).....	63
4.4.2 Eletroforese (Segunda Dimensão).....	63
4.4.3 Coloração dos géis.....	63
4.5 Obtenção e análise das imagens.....	64
4.6 Digestão de proteínas.....	65
4.7 LC-MS/MS.....	66
4.8 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas.....	67
4.9 Extração de RNA total.....	68
4.9.1 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído.....	69
4.9.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA.....	69
4.9.3 Seleção de genes e <i>primers</i> .....	70
4.9.4 PCR semi-quantitativo (PCRsq).....	72
4.9.5 Seleção dos genes de referência.....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	75
5.1 Microscopia óptica.....	76
5.2 Extração das proteínas.....	76
5.3 Géis bidimensionais.....	77
5.4 Análise das imagens dos géis.....	78
5.5 Espectrometria de massas: análise dos espectros.....	81
5.6 Proteínas Identificadas.....	82
5.6.1 Proteínas identificadas ao longo do processo de indução da madeira	

de reação (tração e oposta).....	83
5.6.1.1 Classificação das proteínas em categorias funcionais.....	84
5.6.1.2 Proteínas identificadas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos da parede celular secundária.....	92
5.6.1.3 Proteínas identificadas envolvidas na organização do citoesqueleto.	96
5.6.1.4 Proteínas identificadas envolvidas na biossíntese de lignina.....	97
5.6.1.5 Proteínas identificadas não relacionadas diretamente com o metabolismo da parede celular.....	100
5.7 PCR semi-quantitativo (PCRsq).....	102
5.7.1 Escolha dos genes de referência.....	103
5.7.2 PCRsq de genes envolvidos na biossíntese de celulose.....	106
5.7.3 PCRsq de outros genes envolvidos na modificação da parede celular e característicos da presença da camada G.....	114
5.7.4 PCRsq de genes envolvidos na degradação de pectinas.....	116
5.7.5 PCRsq de genes envolvidos na biossíntese de lignina.....	118
6 Considerações Finais.....	123
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS.....	153





## RESUMO

### **Identificação de proteínas diferencialmente expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis* durante a indução da formação da madeira de reação**

A madeira é um tecido complexo e variável que se encontra sob o controle dos diversos estádios de desenvolvimento e do ambiente. Um modelo experimental freqüentemente utilizado para o estudo do processo da formação da madeira tem sido a indução da formação da madeira de reação. A madeira de reação é formada em resposta a um estímulo gravitacional e está associada com um aumento na taxa de crescimento, modificação química e estrutural na parede celular das fibras. A madeira de reação formada no lado superior do tronco inclinado é chamada de madeira de tração, enquanto que a madeira formada no lado inferior do troco inclinado é chamada de madeira oposta. Uma das principais características da madeira de tração é a deposição de uma camada gelatinosa na parede celular secundária, que é rica em celulose altamente cristalina. Com o objetivo de caracterizar as alterações na expressão gênica e no perfil de proteínas durante a formação da madeira de reação em *Eucalyptus grandis*, árvores de 1,8 anos de idade foram inclinadas sob um ângulo fixo (45°) e amostras da região cambial foram coletadas após 15, 30 e 60 dias da região do tronco com a curvatura mais acentuada. Proteínas e RNA foram extraídos da região do xilema em diferenciação da madeira de tração e da madeira oposta, e foram comparadas às da madeira normal (controle) utilizando uma abordagem proteômica (géis 2D e LC-MS/MS) e PCRsq. As análises foram focadas em genes e proteínas relacionadas à modificação e formação da parede celular. 480 spots de proteínas foram identificados e classificados em categorias funcionais, com particular atenção dada às proteínas relacionadas ao metabolismo de UDP-açúcares (incluindo a biossíntese de celulose), biossíntese de lignina e citoesqueleto. Além disso, a expressão relativa dos transcritos relacionados à biossíntese de celulose e lignina, ao metabolismo de pectinas e ao citoesqueleto foram analisadas através de PCRsq na madeira controle, de tração e oposta. Diversas diferenças no padrão de expressão de genes e proteínas envolvidas nas mudanças estruturais e da composição da parede celular secundária em relação à madeira normal foram observadas ao longo do período de indução. A deposição da camada G foi observada após 60 dias de indução da madeira de tração. através de secções transversais coradas com safranina e azul de astra. Ao longo do tempo de indução, os resultados sugerem um aumento no fluxo do carbono para a biossíntese de lignina na madeira oposta e para a biossíntese de celulose na madeira de tração. Assim, este trabalho resultou na caracterização dos perfis de expressão de proteínas e genes envolvidos nos mecanismos moleculares da formação da madeira sob estresse gravitacional e mais precisamente no remodelamento da parede celular secundária durante a formação da camada G.

Palavras chave: *Eucalyptus grandis*, madeira de tração, formação da madeira, proteoma, PCRsq



## ABSTRACT

### **Differentially expressed proteins identified in the cambial region of *Eucalyptus grandis* during reaction wood formation**

Wood is a complex and highly variable tissue under developmental and environmental control. Usually, an experimental model used to study wood formation is the induction of reaction wood formation. Reaction wood is formed to respond to a gravitational stimulus and is associated with an increased growth rate, modified fiber cell wall chemistry and structure. The reaction wood formed on the upper side of a bent trunk is called tension wood, and that one formed on the lower side is called opposite wood. One of the main characteristics of tension wood is the deposition of a gelatinous layer (G layer) on the secondary cell wall, which is rich in highly crystalline cellulose. With the aim to characterize the changes in gene expression and protein profile during tension wood formation in *Eucalyptus grandis*, 1,8 year-old trees were bent at a fixed angle (45°) and samples from the cambial region taken after 15, 30 and 60 days in the region of the trunk with the most accentuated curve. Proteins and RNA were extracted from the differentiating xylem region of the tension wood and opposite wood and were compared to those of normal wood (control) using 2D electrophoresis (LC-MS/MS) and sqPCR. The analysis was focused on genes and proteins related to the modification and formation of the cell wall. 480 spots of proteins were extracted, identified and classified into functional categories, with particular attention to those related to nucleotide sugar metabolism (including cellulose), lignin biosynthesis and the cytoskeleton. In addition, the relative expression of transcripts related to cellulose and lignin biosynthesis, pectin metabolism and the cytoskeleton were analyzed by sqPCR in control, tension and opposite wood. Several differences in the expression pattern of genes and proteins involved in structural and secondary cell wall composition changes were observed when compared to normal wood during the induction period. The deposition of G layer was observed after 60 days of tension wood induction using transversal sections stained with safranin-astra blue. Throughout the induction period, the results suggest an increase in the flow of carbon for lignin biosynthesis in the opposite wood and for cellulose biosynthesis in the tension wood. Therefore, the results of this work characterize the protein and gene expression profiles involved in the molecular mechanisms underlying wood formation under gravitational stress and, more specifically, in secondary cell wall remodeling during G layer formation.

**Keywords:** *Eucalyptus grandis*, tension wood, wood formation, proteome, sqPCR



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Etapas da diferenciação do xilema e visão esquemática da região cambial .....	29
Figura 2	- Representação esquemática da parede celular primária, mostrando a interação dos constituintes (celulose, hemicelulose e pectina).....	31
Figura 3	- Representação esquemática tridimensional da parede celular secundária de uma célula xilemática.....	32
Figura 4	- Reações de interconversões de açúcares-UDP, síntese de celulose, hemiceluloses e pectinas.....	34
Figura 5	- Modelo atual da biossíntese de celulose em plantas.....	36
Figura 6	- Exemplo da atuação das forças de compressão e tração em uma madeira em resposta à inclinação.....	43
Figura 7	- Microscopia eletrônica da madeira de <i>Populus</i> .....	47
Figura 8	- Estrutura tridimensional de uma fibra.....	47
Figura 9	- Instalação do experimento no campo.....	58
Figura 10	- Coleta do material biológico.....	59
Figura 11	- Parâmetros utilizados no <i>software</i> MASCOT para a identificação das proteínas.....	68
Figura 12	- Fórmula para o cálculo da concentração de RNA.....	69

Figura13	- Microscopia óptica de secções transversais da formação da madeira de tração em <i>Eucalyptus grandis</i> após 60 dias de indução.....	76
Figura 14	- Gel representativo de poliacrilamida com amostras de proteínas totais da região cambial de <i>Eucalyptus grandis</i> resultantes da extração fenólica.....	77
Figura 15	- Géis bidimensionais representativos na faixa de pH de 4 a 7 confeccionados em triplicata e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250.....	78
Figura16	- Géis bidimensionais sobrepostos do tratamento T15 e correlações entre as triplicatas utilizando o programa ImageMaster (GE Healthcare).....	79
Figura 17	- Géis bidimensionais sobrepostos através do programa ImageMaster (GE Healthcare).....	81
Figura 18	- Histograma apresentado pelo software MASCOT.....	82
Figura 19	- Classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas identificadas na madeira de tração (T) e oposta (O) em relação ao material controle (árvore não inclinada) nos três intervalos de indução (15,30 e 60 dias).....	85
Figura 20	- Proteínas exclusivas identificadas após 15 dias de indução da madeira de tração e oposta. T15, madeira de tração; O15, madeira oposta.....	85
Figura 21	- Ciclo metil em plantas.....	87

Figura 22	- Principais intermediários do ciclo de metilações via SAH.....	89
Figura 23	- Produção de UDP-glicose pela sacarose sintase .....	93
Figura 24	- Ciclo das pentoses. Envolvimento da <i>Transketolase</i> na via do <i>shikimato</i> e conseqüentemente na biossíntese de lignina.....	94
Figura 25	- Via de biossíntese da lignina.....	98
Figura 26	- Valores de estabilidade de expressão de genes com potencial para serem genes de normalizadores de expressão obtidos através do software Norm-finder.....	104
Figura 27	- Quantificação da expressão das celulosas sintases ( <i>CesA4</i> e <i>CesA5</i> ) envolvidas na biossíntese da parede primária através de PCRsq.....	107
Figura 28	- Quantificação da expressão das celulosas sintases ( <i>CesA1</i> , <i>CesA2</i> e <i>CesA3</i> ) envolvidas na biossíntese da parede secundária através de PCRsq.....	108
Figura 29	- Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes relacionados à biossíntese de celulose na madeira de tração e oposta por PCRsq....	111
Figura 30	- Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes relacionados citoesqueleto na madeira de tração e oposta por PCRsq.....	113
Figura 31	- Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes <i>XETH3</i> e <i>FLA1</i> na madeira de tração e oposta por PCRsq.....	116
Figura 32	- Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes envolvidos	

	na degradação de pectinas na madeira de tração e oposta por PCRsq.....	117
Figura 33	- Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina na madeira de tração e oposta por PCRsq.....	121



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Medidas de diâmetro médio, altura total (T) e altura comercial (C) e os respectivos desvios padrões em relação à média de árvores de <i>Eucalyptus grandis</i> coletadas após 15, 30 e 60 dias da instalação do experimento.....	57
Tabela 2	- <i>Primers</i> escolhidos relacionados à biossíntese da parede celular para a realização do PCRsq .....	70
Tabela 3	- Número de <i>spots</i> detectados nos diferentes tratamentos em cada réplica de gel bidimensional. T e O são os tratamentos utilizados, madeira de tração e oposta, respectivamente. C, madeira controle (não inclinada). Tempos de indução da madeira de reação: 15, 30 e 60 dias.....	79
Tabela 4	- Número de <i>spots</i> detectados nos diferentes tratamentos em cada réplica de gel bidimensional.....	80
Tabela 5	- Genes analisados por PCRsq para a quantificação relativa na madeira de reação (tração e oposta) em relação à madeira normal.....	105
Tabela 6	- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução.....	157
Tabela 7	- Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução.....	180
Tabela 8	- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em	193

	relação à madeira normal aos 30 dias de indução.....	
Tabela 9	- Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução.....	207
Tabela 10	- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução.....	214
Tabela 11	- Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução.....	227
Tabela 12	- Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução .....	236
Tabela 13	- Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução.....	250

## 1 INTRODUÇÃO

Diante de um panorama global desenhado por mudanças climáticas e movido pela competição por recursos fósseis cada vez mais escassos, avanços científicos na área de biologia de plantas se colocam cada vez mais imperativos. Assim, considerando-se questões ambientais, econômicas e até mesmo sociais, significativa relevância tem sido dada à biomassa produzida pelas árvores. As árvores constituem o maior estoque de carbono da biosfera e sempre estiveram atreladas ao desenvolvimento da vida do homem, sendo um dos primeiros materiais utilizados pela humanidade, como fonte de fibras, energia e estrutura para construções. É nesse quadro que o gênero *Eucalyptus* se insere como uma poderosa fonte de matéria-prima para uma diversidade de usos na indústria moveleira, construção civil, geração de energia (queima do carvão vegetal), a indústria de papel de celulose, indústrias químicas e farmacêuticas e, mais recentemente, para a produção de biocombustível.

As pesquisas na área florestal estão focadas no melhoramento não somente na produção de biomassa, mas também propriedades da madeira e das fibras. A silvicultura futuramente se baseará em plantações altamente produtivas para multipropósitos específicos. Para isso, questões ligadas à anatomia e física da madeira, bem como à composição química já foram bastante descritas, no entanto muito ainda é necessário para o entendimento dos mecanismos de regulação do processo da formação da madeira (xilogênese).

A madeira é formada pelo xilema secundário, composto por vasos, fibras e células do parênquima, e suas propriedades físico-químicas são derivadas diretamente da composição e estrutura das paredes celulares. Durante a xilogênese, células do câmbio vascular se dividem dando origem a células iniciais de vasos, fibras e parênquima, que sofrem expansão e alongação antes da deposição da parede celular secundária e lignificação; a diferenciação das células de vasos e fibras é finalizada com a morte celular programada. O xilema é, portanto constituído principalmente por células envolvidas por uma parede celular, cuja composição depende dos processos de

biossíntese e modificações, dirigidas por genes específicos, além de uma série de fatores endógenos e exógenos que podem influenciar na expressão desses genes.

Dessa forma, o melhor entendimento do funcionamento dos genes envolvidos nos diferentes passos que levam à síntese dos componentes da parede celular podem indicar pontos-chaves de regulação das propriedades da madeira. Nesse sentido, uma das primeiras iniciativas para se estudar a regulação da formação da madeira numa perspectiva global foi feita por Sterky et al. (1998) que resultou na produção de mais de 5.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) a partir da região cambial de *Populus*. Da mesma forma, Paux et al. (2004) desenharam o primeiro perfil transcricional da região cambial de uma espécie de *Eucalyptus*. Já em 2008, Carvalho et al. descreve o perfil transcricional da madeira juvenil de *Eucalyptus*. O desenvolvimento de projetos genoma como de *Populus* (TUSKAN et al, 2006) e agora de *Eucalyptus* (em andamento) também abre grandes possibilidades de identificação de novos genes e caracterização de perfis transcricionais.

Apesar da produção de ESTs e análise da abundância de transcritos resultarem em grande quantidade de informação, elas não tratam da história completa dos eventos moleculares que ocorrem durante a formação da madeira. A maneira ideal é a combinação dos dados de transcritos com os de proteínas e metabólitos, pois a regulação também ocorre pós-transcricionalmente. Estudos globais de proteínas e metabólitos em tecidos do desenvolvimento da madeira são recentes sendo que somente alguns exemplos encontram-se na literatura. Exemplos desse tipo de estudo é o caso do trabalho de Celedon et al (2007) que descreve o proteoma da madeira juvenil de *Eucalyptus*, o trabalho de Morris et al. (2003) que avalia os metabólitos da região cambial em *Pinus* e o estudo de Andersson-Gunneras et al. (2006) que reuniu em um só trabalho dados de transcrito e metaboloma para a investigação dos principais genes envolvidos no processo de formação da madeira de *Populus*.

A maioria dos trabalhos relacionados ao estudo da xilogênese baseia-se em modelos de formação de parede celular, principalmente através da comparação de tecidos diferentes como madeira juvenil e madeira adulta (MIJNSBRUGGE et al., 2000; PLOMION et al., 2006), e sob indução da madeira de tração (ANDERSSON-GUANNERAS et al., 2006; GION et al., 2005; PAUX et al, 2005). A utilização da

madeira de reação (tração e oposta) como modelo experimental do processo de xilogênese é adotada geralmente por apresentar características físico-químicas e anatômicas peculiares. A principal alteração que ocorre na madeira de tração é a deposição de uma camada extra na parede celular secundária rica em celulose (camada G). São as alterações na composição da parede celular decorrentes dessa deposição da camada G, como o alto teor de celulose e baixo teor de lignina e a resistência mecânica conferida pelo menor ângulo no arranjo das microfibrilas de celulose em relação ao eixo axial das células, que fazem dessa madeira um modelo vantajoso no estudo do processo de formação da madeira. De maneira inversa, a madeira oposta, geralmente com altos teores de lignina também serve como modelo de estudo da biossíntese de lignina.

Dessa forma, através da utilização do modelo experimental de indução da formação da madeira de reação (tração e oposta) e do emprego de uma abordagem proteômica juntamente com a utilização da quantificação de transcritos por PCRsq, o objetivo do presente trabalho foi o estudo do processo de formação da madeira no que diz respeito aos genes responsáveis pelo direcionamento do metabolismo de carboidratos para os componentes da parede celular. Ainda mais especificamente, este trabalho também teve como objetivo estudar os mecanismos moleculares envolvidos na formação da camada G na parede celular secundária das fibras.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biossíntese da Madeira**

O processo de formação da madeira resulta de repetidas divisões celulares que ocorrem no meristema lateral, chamado de câmbio vascular, presente em dicotiledôneas perenes, e responsável pelo crescimento secundário das árvores (LARSON, 1994). Assim, a seqüência de processos que incluem: divisão celular, expansão celular (alongação e crescimento radial), deposição da parede celular (celulose, hemiceluloses, proteínas), lignificação (biossíntese e deposição) e morte celular programada, estão estreitamente relacionados à formação do xilema secundário (CHAFFEY, 2001; KALLURI et al., 2009).

Durante a xilogênese, ou seja, formação do xilema secundário, as células sofrem diversas mudanças no formato, na estrutura e na composição química. Estas mudanças fazem com que a madeira tenha uma composição celular bastante diversificada que depende não somente do estágio de desenvolvimento individual de cada célula, mas também das perturbações abióticas, bióticas ou genéticas (MEGRAW, 1985).

A complexidade da madeira está associada aos diferentes polímeros orgânicos que a compõem, presentes na parede celular, e também à maneira como estes polímeros são organizados. Dentre os polímeros mais abundantes, tem-se a celulose, as hemiceluloses e a lignina, que correspondem a aproximadamente 45-50%, 20-25% e 25-35% da estrutura da madeira, respectivamente. Além desses polímeros, há uma pequena porcentagem que corresponde às proteínas presentes também na parede celular e outras substâncias químicas, os extrativos, que compreendem resinas, taninos, óleos, gomas, compostos aromáticos e sais de ácidos orgânicos (PLOMION et al., 2001).

#### **2.1.1 Atividade do Câmbio Vascular**

O câmbio vascular é um meristema secundário derivado do procâmbio que, por sua vez, desenvolve-se a partir do meristema apical (LARSON, 1994). É um tecido

complexo composto de dois tipos morfológicos de células: as iniciais radiais e as iniciais fusiformes, que se dividem repetidamente em direção à medula, dando origem ao xilema, e em direção à casca dando origem ao floema. Dessa forma, a cada divisão das células, uma célula permanece com características meristemáticas, enquanto que a outra, se torna uma célula mãe do xilema ou floema (LARSON, 1994).

As células-mãe xilemáticas apresentam atividade de divisão muito mais intensa que as células-mãe do floema, o que explica a considerável desproporção entre os tecidos do xilema e floema (PLOMION et al., 2001).

As células iniciais fusiformes apresentam 90% de divisões periclinais (plano tangencial) produzindo, na parte interna, os elementos da madeira: elementos de vaso, células associadas aos vasos, parênquima axial e fibras em dicotiledôneas e, na parte externa, as células do floema, células companheiras, parênquima axial e fibras. Já as células iniciais radiais, estão envolvidas principalmente na produção dos raios, que são essenciais na translocação de nutrientes entre floema e xilema (TAIZ; ZEIGER, 2004; MELLEROWICZ, et al, 2001).

A alta taxa de atividade metabólica do processo de formação de novas células na região cambial necessita também de uma excepcional rapidez na biossíntese da lamela média, membrana plasmática e parede celular primária. Este crescimento rápido faz o tecido cambial ser a mais rica fonte de transcritos e proteínas. (CATESSON, 1990; MELLEROWICZ et al, 2001).

### **2.1.2 Estádios de Diferenciação no xilema**

A diferenciação das novas células do xilema consiste de quatro etapas: expansão celular, síntese de parede celular, lignificação e morte celular programada (LARSON, 1994) (Figura 1).

Depois que as células-mãe do xilema deixam o meristema, elas começam a se expandir longitudinalmente e radialmente até atingirem o tamanho final durante a formação da parede primária. As xiloglicanas endotransglicosilases, endoglicanases, expansinas, pectina metil esterases, e pectinases são as determinantes primárias durante o processo de expansão celular. (SAMUELS et al., 2006). É nesta fase em que os elementos de vaso e fibras mostram claras diferenças morfológicas. Mecanismos



que regulam diferencialmente a pressão de turgor e/ou a plasticidade das células devem existir, pois o grau de expansão varia entre as células. Inúmeras observações em árvores dicotiledôneas, incluindo *Populus*, indicam que mudanças na quantidade e composição de pectinas estão relacionadas à expansão radial de células (CATESSON; ROLAND, 1981; BARNETT, 1992; VERHERTBRUGGEN; KNOX, 2006).

Uma vez completada a expansão, a síntese de parede celular secundária é iniciada, através de uma coordenada expressão de inúmeros genes especificamente envolvidos na biossíntese e organização dos quatro principais componentes: polissacarídeos (celulose e hemiceluloses), ligninas e outros compostos solúveis (flavonóides, taninos e terpenóides), e insolúveis (pectinas e proteínas de parede) (MELLEROVICZ; SUNDBERG, 2008).

Quando a lignificação é finalizada, os elementos de vaso progridem para a morte celular programada, durante a qual há perda de todo o conteúdo celular levando à formação de uma unidade contínua de vasos condutores do xilema (GROOVER; JONES, 1999).

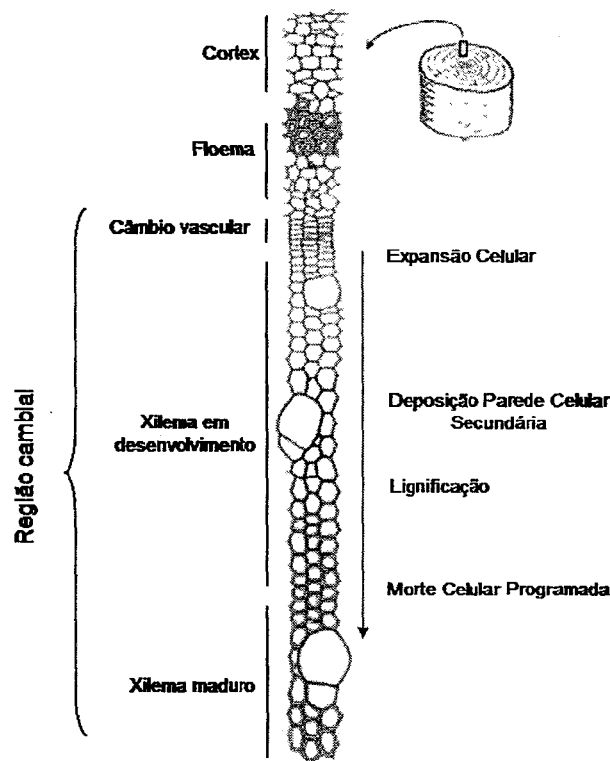


Figura 1 – Etapas da diferenciação do xilema e visão esquemática da região cambial (Schrader, 2004)

### 2.1.3 Estrutura da Parede Celular

A parede celular é composta de várias camadas que são produzidas em diferentes períodos durante a diferenciação celular. A primeira camada a se desenvolver depois da divisão celular é chamada de lamela média e é responsável pela adesão entre as células vizinhas. A lamela média é composta principalmente de substâncias pécnicas e lignina que pode ser incorporada durante o período de diferenciação (PLOMION et al, 2001).

No começo da diferenciação celular, a parede celular primária (Figura 2) é formada, sendo composta basicamente de três polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) estruturalmente interligados e por proteínas de parede (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

A parede celular primária possui diversas camadas de microfibrilas de celulose arranjadas aleatoriamente. As substâncias pécnicas, ligninas e hemiceluloses podem ser encontradas entre as microfibrilas (FUNADA, 2000). Essas microfibrilas de celulose, sintetizadas na membrana plasmática, são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e predisposição estrutural das células (REITER, 2002).

As hemiceluloses são sintetizadas no Complexo de Golgi e caracterizam-se por serem polissacarídeos flexíveis que se ligam à superfície da celulose. Diversas hemiceluloses são encontradas na parede celular, entretanto, na parede primária das dicotiledôneas, a mais abundante é o xiloglucano, presente em proporções semelhantes à celulose (REITER, 2002).

Já as pectinas, sintetizadas também no complexo de Golgi, incluem vários tipos diferentes de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico. Esses são responsáveis pela formação de uma estrutura gelatinosa na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Dessa maneira, atuam como um preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose (REITER, 2002).

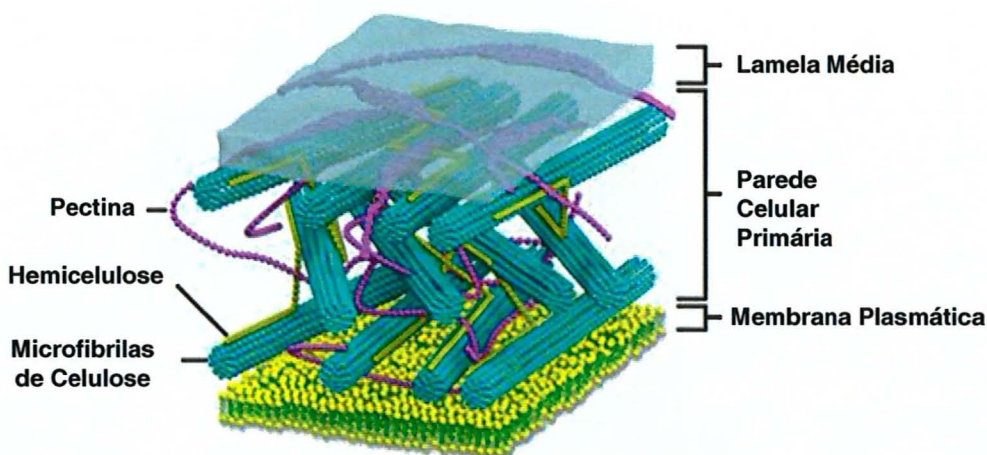


Figura 2 – Representação esquemática da parede celular primária, mostrando a interação dos constituintes (celulose, hemicelulose e pectina). Estrutura originalmente proposta por McCann e Roberts (1992)

À medida que o desenvolvimento celular atinge o tamanho definitivo, uma nova camada é formada no interior da parede primária celular, que é a camada mais importante para a célula no que diz respeito à força mecânica (PLOMION et al, 2001). Esta nova camada, denominada parede celular secundária (Figura 3), é dividida em três camadas diferentes, S1, S2 e S3 (TIMELL, 1986). Cada uma dessas é composta por microfibrilas de celulose alinhadas ordenadamente e arranjadas paralelamente, diferindo nessa ordenação de uma camada S para outra. Hemiceluloses e lignina estão também presentes em cada uma dessas camadas.

A camada S1 é a mais fina (0,1-0,35 $\mu$ m) e representa apenas 5-10% da espessura da parede celular total. Nessa camada, o ângulo microfibrilar é de 60-80° em relação ao eixo da célula. Já a camada S2, é a mais espessa (1-10 $\mu$ m) e representa 75-85% da espessura total da parede celular, com ângulo microfibrilar variando entre 5-30° em relação ao eixo da célula. A orientação microfibrilar na camada S2 pode influenciar grandemente as propriedades físicas e mecânicas da célula. A camada mais interna da parede celular secundária, S3, é relativamente fina (0,5-1,10 $\mu$ m), com microfibrilas arranjadas paralelamente com ângulo variando entre 60-90° em relação ao eixo celular (CHAFFEY et al., 1997; FUNADA, 2000).

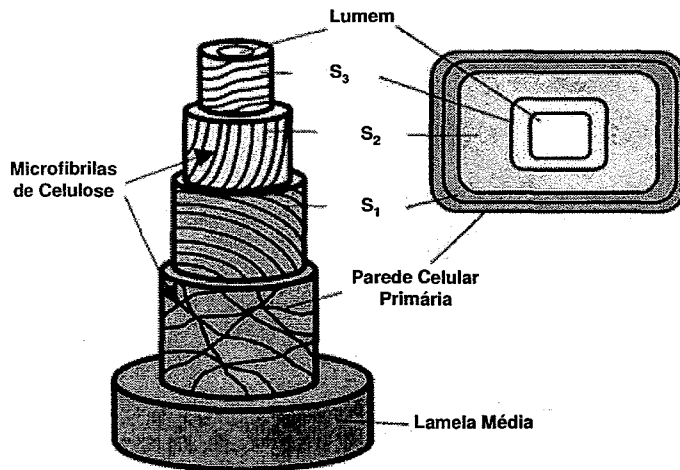


Figura 3 – Representação esquemática tridimensional da parede celular secundária de uma célula xilemática, mostrando as camadas S1, S2 e S3 da parede secundária, bem como a lamela média e parede primária. O alinhamento das microfibrilas aparece irregular (como na parede primária) ou inclinado em relação ao eixo da célula (camadas S1, S2 e S3). Retirado de Plomion et al, 2001

## 2.2 Biossíntese dos componentes da parede celular

Os próximos subitens abordam alguns aspectos da biossíntese dos componentes da parede celular (lignina, celulose e hemicelulose) durante o processo da formação da madeira, ou mais precisamente, durante a diferenciação das células xilemáticas.

### 2.2.1 Precursores dos carboidratos da parede celular

A maior parte dos produtos fotoassimilados das plantas superiores são direcionados através das vias de interconversão de carboidratos nucleotídicos (açúcares-NDP) até chegar à composição da parede celular. A fixação de carbono nos cloroplastos conduz à formação de frutose-6-fosfato como primeira hexose a partir da qual, através da ação de diversas isomerases e mutases, resultam na glicose-1-fosfato e manose-1-fosfato, que por sua vez, com a atuação de pirofosforilases citosólicas, resultam nos açúcares UDP-D-glicose e GDP-D-manose (REITER, 2008). Todos os precursores da parede celular são derivados desses dois açúcares nucleotídicos, via uma série de reações catalisadas por 4-epimerases, 3,5-epimerases, 4-redutases, 4,6-desidratases, desidrogenases e carboxilases (REITER, 2001; SEIFERT, 2004).

UDP-D-glicose é um dos precursores mais importantes dos carboidratos da parede celular (GIBEAUT, 2000), é formado pela reação (sacrose + UDP → UDP-glicose + frutose), catalisada pela sacarose sintase (EC 2.4.1.13) (SUSY), ou pela UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9) (glicose-1-P + UTP → UDP-D-glicose + PP) (Figura 4). Os cDNAs para ambas as enzimas foram identificados na região cambial de *Populus* (STERKY et al., 1998) e de *Eucalyptus* (CARVALHO et al., 2008), evidenciando a importante função dessas enzimas na formação da parede celular secundária do xilema. Além disso, a atividade enzimática da SUSY no xilema em desenvolvimento foi correlacionada com a intensidade de formação da parede celular no xilema de *Populus* (SAUTER, 2000).

A UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22), que converte UDP-D-glicose em UDP-D-glucuronato (Figura 4), é uma enzima chave que regula o fluxo de UDP-glicose para a produção de pectinas e hemiceluloses. Isso porque o UDP-glucuronato resultante dessa reação é substrato para as reações de diversas outras enzimas envolvidas na síntese desses componentes (TENHAKEN; THULKE, 1996). A presença de transcritos de UDP-glicose desidrogenase em tecidos do câmbio sob baixa atividade comparada a outras enzimas responsáveis por reações subseqüentes da mesma via de interconversão de açúcares, indica que essa enzima pode ser considerada essencial na regulação da síntese dos polissacarídeos da matrix (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977; CARVALHO et al., 2008). O UDP-glucuronato pode ser produzido pela ação da UDP-glicose desidrogenase ou alternativamente, pela oxidação do mio-inositol através da ação da mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1). No entanto, a via da UDP-glicose desidrogenase parece ser preferida, pois nenhuma enzima da via do mio-inositol foi identificada na região cambial de *Eucalyptus* (CARVALHO et al., 2008). Seitz et al. (2000) demonstrou a predominância da UDP-glucose desidrogenase nos meristemas, raízes e tecidos vasculares de *Arabidopsis*, enquanto que a via da oxidação do mio-inositol esteve predominante em cotilédones e hipocótilos.

As interconversões de açúcares incluem reações de desidrogenação, descarboxilação e epimerização. Dessa maneira, foram encontradas enzimas envolvidas em algumas dessas reações em tecidos da formação da madeira de *Populus* (STERKY et al., 1998) e *Eucalyptus* (CARVALHO et al., 2008), assim como

também a atividade enzimática de UDP-D-galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.2), UDP-L-arabinose epimerase (EC 5.1.3.5) e UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35) que foram detectadas na região cambial de *P. x euroamericana* cv. Robusta (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977).

Várias glicosiltransferases também foram identificadas em *Populus* (GEISLER-LEE et al., 2006). Essas enzimas encontram-se ligadas à membrana do Golgi e estão envolvidas na síntese de componentes da matrix da parede celular (PERRIN et al, 2001; SCHEIBLE; PAULY, 2004).

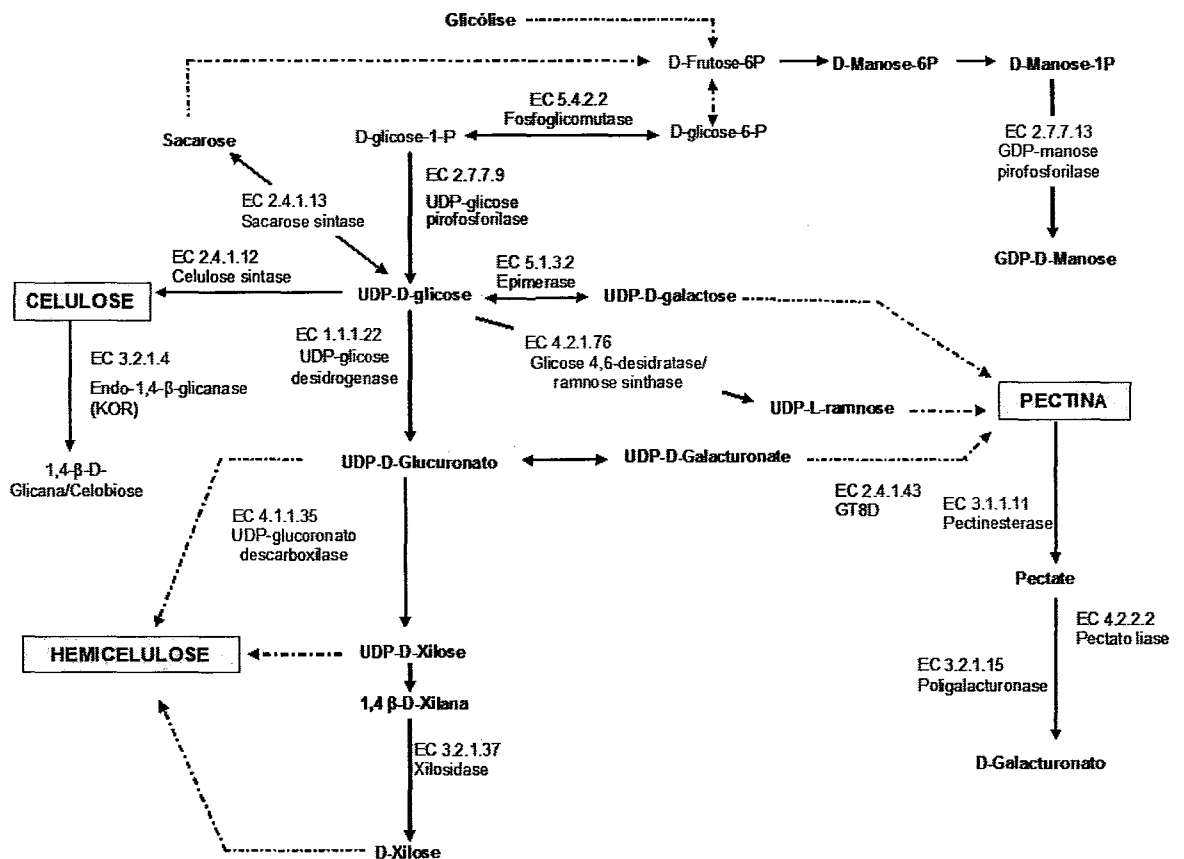


Figura 4 – Reações de interconversões de açúcares-UDP, síntese de celulose, hemiceluloses e pectinas

## 2.2.2 Metabolismo de carboidratos durante a construção da parede celular primária

A parede primária de células em crescimento é composta por microfibrilas de celulose cristalinas embebidas em uma matrix de polissacarídeos complexos (pectinas

e hemiceluloses) (COSGROVE, 2005). A celulose é sintetizada por complexos enzimáticos de celulose sintases (CESAs) na membrana plasmática, enquanto que os polissacarídeos da matrix são sintetizados no Complexo de Golgi (LEROUXEL et al, 2006).

Cada microfibrila de celulose é formada a partir do empacotamento e cristalização de várias cadeias de (1,4)- $\beta$ -D-glicanas, cada uma dessas formada por uma proteína CESA presente no complexo hexamérico (COSGROVE, 2005). Em *Arabidopsis thaliana* foram encontrados dez genes codificadores de celulose sintases (CESA), três deles fazem parte da biossíntese da parede primária (CESA1, CESA3 e CESA6) e outros três da parede secundária (CESA4, CESA7 e CESA8) (ARIOLI et al, 1998). Em *Populus*, o gene *PtCesA1* se expressa durante o desenvolvimento da parede secundária do protoxilema, metaxilema e xilema secundário, mas sua expressão não foi detectada em fibras do floema que também produzem parede celular secundária (WU et al, 2000). Em eucalipto, seis genes codificadores de CESAs envolvidos na biossíntese da parede primária (CesA4, CesA5 e CesA6) e secundária (CesA1, CesA2 e CesA3) foram detectados (RANIK; MYBURG, 2006).

Além das celulosas sintases, a endoglicanase KORRIGAN (KOR) também é requerida durante o processo de formação da celulose (Figura 5). Esta endoglicanase encontra-se ligada à membrana, mas não associada ao complexo de CESAs (Figura 5). Postula-se que a endoglicanase KOR esteja envolvida na remoção do precursor  $\beta$ -esterol-glicosídeo do final do processo de formação das novas cadeias de glicanas durante a síntese de celulose (PENG et al, 2002). Esse  $\beta$ -esterol-glicosídeo é considerado um *primer* para a elongação da cadeia de glicanas. O único problema com esse modelo de ação da KOR proposto por PENG et al. (2002) está no fato de que o sítio catalítico da KOR predito encontra-se do lado de fora da membrana plasmática enquanto que os sítios catalíticos das CesAs encontram-se no citoplasma, ou seja, no interior da célula. Portanto, novos experimentos ainda são requeridos para dar suporte a essa teoria (JOSHI et al, 2004). MOLHOJ et al. (2002) propuseram que KOR teria uma função diferente como editor da elongação da cadeia de glicanas na parte externa da membrana plasmática, removendo cadeias de glicanas defeituosas do arranjo de microfibrilas. Nesse caso, KOR possui uma função importante na síntese de celulose,



mas o mecanismo exato de como esse processo ocorre, precisa ainda ser decifrado (JOSHI et al, 2004).

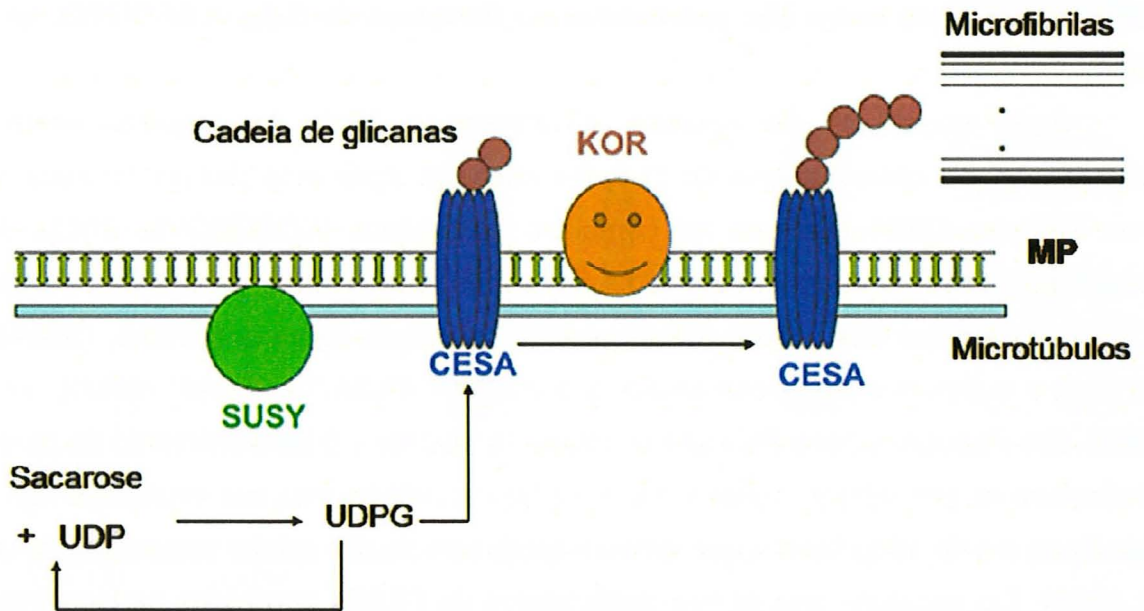


Figura 5 – Modelo atual da biossíntese de celulose em plantas. Sacarose sintase (SUSY) associada à membrana plasmática (MP) canaliza o substrato UDP-glicose (UDPG) para o complexo de celulose sintases (CESA) formando a cadeia de glicanas, ao mesmo tempo ocorre a reciclagem da (UDP) para nova ação da SUSY. As rosetas de CESA podem estar se movendo ao longo da MP com a ajuda dos microtúbulos. As cadeias de glicanas se arranjam em microfibrilas, enquanto que a celulase KORRIGAN (KOR) trabalha editando e monitorando esse processo (Retirado de JOSHI et al, 2004)

Ao contrário da celulose, os polissacarídeos da matrix são sintetizados no Complexo de Golgi e empacotados em vesículas que se fundem com a membrana plasmática e então secretam os polissacarídeos para a parede celular. Esses polissacarídeos são integrados na parede celular através de interações físicas e ligações enzimáticas (COSGROVE, 2005). As glicosiltransferases são responsáveis pela síntese desses polissacarídeos e as hidrolases, esterases e liases pela modificação dos mesmos. Mais de 1600 genes codificadores de enzimas carboidratoativas (CAZymes) em *Populus trichocarpa* foram identificados, anotados e agrupados em famílias de glicosiltransferases, glicoside hidrolases, carboidrato esterases, polissacarídeos liases e expansinas (GEISLER-LEE et al, 2006).

A família *cellulose synthase-like* (CSL), inclui genes que possuem motivos característicos de glicosiltransferases, mas também possuem no final da cadeia



domínios de dedo de zinco, característicos de CESA. Por essas semelhanças, as proteínas CLS são consideradas responsáveis pela síntese de  $\beta$ -D-glicanas no Complexo de Golgi, que irão formar o esqueleto das hemiceluloses como xilogucanas, xilanas e mananas (COSGROVE, 2005; DHUGGA et al, 2004). Outras sintases são requeridas na biossíntese dos polissacarídeos de matrix, assim como outras glicosiltransferases são importantes na adição de cadeias no esqueleto de glicanas (SCHEIBLE; PAULY, 2004).

### **2.2.3 Metabolismo de carboidratos durante a expansão celular**

Durante o desenvolvimento das células, a parede celular está sujeita a um estresse de tração (equivalente a 100-1000 atmosferas) (COSGROVE, 2005). Essa tração ocorre devido ao estiramento dos polímeros à medida que resistem à pressão de turgor fornecendo a energia mecânica requerida para a extensão da parede celular. Assim, através de um mecanismo de deslizamento de polímeros cuidadosamente controlado, as microfibrilas e polissacarídeos da matrix lentamente deslizam na parede celular aumentando sua área superficial. Dessa forma, as paredes celulares irreversivelmente se estendem, sem que ocorra nenhum dano fatal à célula (MARGA et al., 2005). Para que isso ocorra, a expansão celular deve ser ligada ao processo de síntese e integração de novos polímeros da parede para prevenir a diminuição da espessura nos pontos de instabilidade mecânica (COSGROVE, 2005).

O afrouxamento da parede se refere à modificação molecular que ocorre na rede de polissacarídeos da parede celular que resulta em um relaxamento que diminui a tração. Os agentes envolvidos neste afrouxamento incluem as expansinas, xiloglicanas endotransglicosilases/hidrolases e endo-(1,4)- $\beta$ -D-glicanase (COSGROVE, 2005; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

As microfibrilas de celulose cobertas por xiloglicanas e ligadas também por pontes de xiloglicanas, formam o principal componente da parede primária de dicotiledôneas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Portanto, para que ocorra a expansão da parede celular é necessário que haja a quebra das pontes entre as xiloglicanas e/ou a quebra das pontes de hidrogênio da interação entre xiloglicanas e celulose, de forma a remodelar a arquitetura da parede celular (McCANN; CARPITA, 2008).

As expansinas são proteínas que se encontram ligadas à parede celular e estão envolvidas na quebra das pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e as xiloglicanas (MELLEROWICZ *et al*, 2001), mas não estão envolvidas diretamente na hidrólise de celulose. No entanto, sinergisticamente promovem a hidrólise de celulose pelas celulases, pois expõem as glicanas na superfície das microfibrilas de celulose permitindo assim, o fácil ataque enzimático (McQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995). ESTs para dois genes codificadores de expansinas foram identificados em abundância em bibliotecas de câmbio de *Pinus*, ambas correspondendo a  $\alpha$ -expansinas (MELLEROWICZ *et al*, 2001).

Diversas funções têm sido atribuídas às xiloglicanas endotransglucosilases/hidrolases (XTHs), como por exemplo, o relaxamento (FRY *et al*, 1992), fortalecimento da parede (ANTOSIEWICZ *et al*, 1997; BAUMANN *et al.*, 2007), integração de novas cadeias de xiloglicanas na parede (THOMPSON; FRY, 2001), amolecimento de frutos (REDGWELL; FRY, 1993; SALADIE *et al.*, 2006) e hidrólise de xiloglicanas (FARKAS *et al*, 1992) e, particularmente durante a formação do xilema (BOURQUIN *et al*, 2002; MATSUI *et al*, 2005; PIENS *et al.*, 2007).

As xiloglicanas endotransglicosilases (XETs), especificamente, quebram o esqueleto de xiloglicanas e religam novas cadeias de xiloglicanas através de ligações glicosídicas no final da cadeia livre. Em uma biblioteca de câmbio de *Populus*, três cDNAs codificadores das XETs foram encontrados (MELLEROWICZ *et al*, 2001), em outro trabalho com *Eucalyptus* (CARVALHO *et al.*, 2008) um cDNA foi encontrado para esse gene. Já durante a formação da madeira de tração em *Populus*, esse mesmo gene apresentou um aumento de expressão significativo (ANDERSSON-GUNNERAS *et al.*, 2006). A expressão dos genes da família das XTHs é alta em regiões de ativa formação de parede celular, que são as regiões de alongação celular e regiões em que a deposição da parede continua depois que a expansão da célula cessa ou onde outras formas de remodelamento da parede ocorrem (HYODO *et al*, 2003; YOKOYAMA *et al*, 2004; ANTOSIEWICZ *et al*, 1997).

As endoglicanases são enzimas que catalisam a endo-hidrólise de 1,4- $\beta$ -D-glucana. Podem estar envolvidas na degradação de celulose não-cristalina (OHMIYA *et al.*, 2003) ou na biossíntese de celulose durante o crescimento (DEL CAMPILLO, 1999).

OHMIYA et al (2003) examinaram duas dessas enzimas em *Populus* (PopCel1 e PopCel2) e apresentaram indiretamente evidências de que essas enzimas digeriam regiões de celulose não-cristalina. A superexpressão de *PopCel1* em *Arabidopsis thaliana* resultou em aumento do crescimento da planta e extensibilidade das células. Já a supressão antisense dessas enzimas em *Populus* resultou na diminuição do crescimento das folhas em mais de 32% (OHMIYA et al., 2003).

Outro ponto importante a ser considerado no desenvolvimento do xilema é o metabolismo de degradação das pectinas. As pectinas são responsáveis pela porosidade e adesão celular. Portanto, a degradação das pectinas resulta em paredes mais acessíveis às enzimas modificadoras (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Em *Zinnia*, a pectato liase (*ZePel*) foi encontrada associada ao tecido vascular através da técnica de hibridização *in situ* e seu genes foi altamente expresso em cultura de células xilemáticas na fase inicial do desenvolvimento antes da formação da parede secundária (DOMINGO et al, 1998). Outra enzima importante é a endopoligalacturonase (pectinase) encontrada também em bibliotecas de xilema e câmbio, bem como na madeira de tração de *Populus* (MELLEROWICZ et al, 2001; ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006). Portanto, as enzimas envolvidas na degradação de pectinas estão associadas à tecidos sob alta atividade de crescimento e expansão celular.

#### **2.2.4 Biossíntese de lignina**

A lignificação é um dos estádios finais da diferenciação xilemática, quando a lignina é depositada entre a matrix de carboidratos da parede celular preenchendo os espaços interlamelares e formando ligações químicas com carboidratos não-celulósicos (DONALDSON, 2000). A lignificação começa nos cantos da lamela média e regiões da camada S1 da parede celular, e se difunde pela parede secundária até o lúmen. A lignificação da lamela média e da parede celular primária se inicia depois de começada a formação da parede celular secundária, enquanto que a lignificação da parede celular secundária geralmente ocorre quando a formação da parede celular secundária está completa (DONALDSON, 1992 e 2000).

Atualmente a lignina é considerada como sendo o segundo biopolímero mais abundante da Terra, representando uma reserva significativa de carbono na biosfera

(BOUDET et al., 2003). É responsável pela resistência mecânica da planta, permitindo o transporte de água e minerais através do xilema sob pressão negativa sem que ocorra o colapso do tecido (JONES et al., 2001).

A lignina é resultado da polimerização de subunidades monoméricas conhecidas como monolignóis sintetizados no citoplasma (Golgi e retículo endoplasmático) e liberados na parede celular através de vesículas (DONALDSON, 2001). Monolignóis são compostos C3 - C6 fenilpropanóicos. Três monolignóis diferentes podem ser incorporados para formar a molécula de lignina: álcool  $\beta$ -coumaril, álcool coniferil e o álcool sinapil, dando origem às unidades p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (BOERJAN et al., 2003). Algumas enzimas presentes na parede celular, como as peroxidases e oxidases, são fundamentais na polimerização dos monolignóis (ROGERS; CAMPBELL, 2004; CARVALHO et al., 2008). A atividade oxidase está associada aos estádios iniciais da lignificação e a atividade peroxidase aos estádios finais (STERJIADES et al., 1993).

Os precursores de lignina são produzidos a partir da via dos fenilpropanóides, que se inicia com a desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL), gerando ácido cinâmico. Este ácido é então, convertido a ácido coumárico através de uma segunda enzima denominada cinamato 4-hidroxilase (C4H) e, em seguida, encaminhado para a síntese de tioésteres, precursores dos monolignóis. Na sequência da via de produção da lignina, o gene da enzima 4-coumarato: coenzima A ligase (4CL) produz tioésteres-CoA a partir de ácidos hidroxicinâmicos (CARVALHO et al., 2008).

As enzimas PAL, C4H e 4CL estão presentes em plantas como pequenas famílias gênicas com isoformas que exibem expressão tecido-específica e que vem sendo correlacionadas a funções distintas no metabolismo dos fenilpropanóides em cada tecido (KAO et al., 2002; RAES et al., 2003; LU et al., 2006). Embora estas enzimas realizem reações centrais do metabolismo dos fenilpropanóides, já que catalisam os passos iniciais da via, nenhuma alteração nos seus níveis de expressão da maioria desses genes foi observada durante a formação da madeira de tração (caracterizada pela redução no conteúdo de lignina) em *Populus*. Ao contrário, foram observadas reduções no número de transcritos para as enzimas que catalisam passos

posteriores, específicos em cada braço da via que leva à formação das subunidades H, S e G de lignina. Esses genes são ácido cafeil-O-metiltransferase (COMT), cafeil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), S-adenosil metionina sintase (SAMS) e lacase (ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006).

O último passo na síntese de lignina é o da polimerização dos monolignóis que pode ser conduzida por peroxidases e/ou lacases (BAUCHER et al., 2003). Nenhuma redução significativa na expressão de peroxidases foi observada em madeira de tração no caso de *Populus*, enquanto o gene *lac3* para lacase foi co-regulado com genes envolvidos na biossíntese de lignina (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006). Embora a construção antisense desse mesmo gene *lac3*, não tenha afetado o teor de lignina em *Populus* (RANOCHA et al., 2002). Esses resultados demonstram que os genes envolvidos nas etapas finais da lignificação não são tão importantes na regulação do processo quanto àqueles genes OMTs (COMT, CCoAOMT, SAMS), envolvidos na rota de metilações dos monolignóis.

A biossíntese de lignina corresponde a uma via metabólica bastante complexa e sujeita a diversos níveis de regulação, sendo a regulação transcricional considerada a mais comum (ROGERS; CAMPBELL, 2004).

### **2.2.5 Regulação da biossíntese do xilema secundário**

Embora muitos genes envolvidos no processo de formação do xilema secundário tenham sido catalogados, os mecanismos regulatórios responsáveis por esses processos ainda não são totalmente claros. Sabe-se que sinais celulares e ambientais estão envolvidos na regulação da formação da madeira (McCARTHY et al., 2009)

Os fitormônios são importantes moléculas de sinalização que atuam na iniciação do procâmbio, na divisão celular, expansão da parede primária e formação da parede secundária (SUNDBERG et al, 2000). Recentes trabalhos demonstraram a existência de um gradiente de auxina (ácido endole-3-acético-IAA) durante o desenvolvimento do tecido vascular em *Pinus* e *Populus*. Outros hormônios, além das auxinas, têm sido relacionados com a xilogênese interagindo com IAA de modo sinérgico (giberelinas, citoquininas e etileno) ou de uma maneira inibitória (ácido absísico) (MAURIAT; MORITZ, 2009;; PESQUET et al., 2005; NILSSON et al., 2008).

Além das moléculas sinalizadoras (os fitormônios), os fatores de transcrição exercem determinantes alterações no padrão de expressão dos genes. Considerável progresso tem sido feito no entendimento do funcionamento de fatores de transcrição que controlam genes da lignificação (LACOMBE et al., 2000; SABLONSKI et al., 1994; TAMAGNONE et al., 1998; PATZLAFF et al., 2003; ROGERS et al., 2004). Outros trabalhos também demonstram que fatores de transcrição fibra-específicos, como NAC e SND1, são essenciais na deposição da parede celular secundária de fibras xilêmicas, mas não nos vasos condutores (ZHONG et al., 2006; MITSUDA et al., 2007). Fatores de transcrição como MYB e LIM, envolvidos na regulação de alguns genes responsáveis pela lignificação, também têm sido identificados (CARVALHO et al., 2008; PAUX et al., 2005; McCARTHY et al., 2009).

OH et al. (2003), utilizando microarranjos em xilema de *Arabidopsis thaliana*, fizeram a importante observação de que uma série de fatores de transcrição encontraram-se superexpressos no xilema secundário quando comparado ao xilema primário. Esta observação levou os autores a concluir que o crescimento secundário em plantas é função da regulação da expressão gênica e não da presença de genes estruturais diferenciados nas plantas lenhosas, o que torna possível a indução do crescimento secundário em espécies não lenhosas.

Uma família de microRNAs (miRNAs) também foi bastante estudada como reguladores da diferenciação vascular através da clivagem de transcritos em *Arabidopsis thaliana* de cinco genes HD-ZIP (*class III homeodomain-leucine zipper*). Estes genes possuem complementariedade com a família miR165/166, o que resulta em clivagem dos transcritos e conseqüentemente modulação da expressão dos mesmos (EMERY et al., 2003; JUAREZ et al., 2004, revisado por LI et al., 2006).

### **2.3 Madeira de Reação**

A madeira de reação possui características anatômicas e químicas diferentes da madeira normal. A formação deste tipo de madeira ocorre em resposta à inclinação de troncos e galhos, causada naturalmente pelo efeito do vento contínuo ou carga de neve (JOUREZ et al., 1997). O deslocamento dos troncos ou galhos fora de seu ponto de equilíbrio faz com que seja necessário o surgimento de um suporte de resistência. Este

suporte é conseguido devido às alterações que ocorrem na estrutura e composição do xilema secundário sendo definido como madeira de reação (WILSON; ARCHER, 1977).

O estímulo inicial para a formação da madeira de reação pode ser um estresse de compressão ou tração sobre as células do xilema que promovem alterações anatômicas e químicas na parede das células a fim de que o tronco suporte uma certa orientação. Parece que a gravidade define uma direção de referência que permite que as plantas se orientem no espaço (JOUREZ et al., 2001).

Os tipos de madeira de reação formadas em gymnospermas e angiospermas são diferentes. Em gimnospermas, é denominada de madeira de compressão e é formada na parte interna da inclinação, já nas angiospermas é denominada de madeira de tração, sendo formada no lado externo à inclinação do tronco, onde os tecidos são mantidos sob tração (Figura 6).

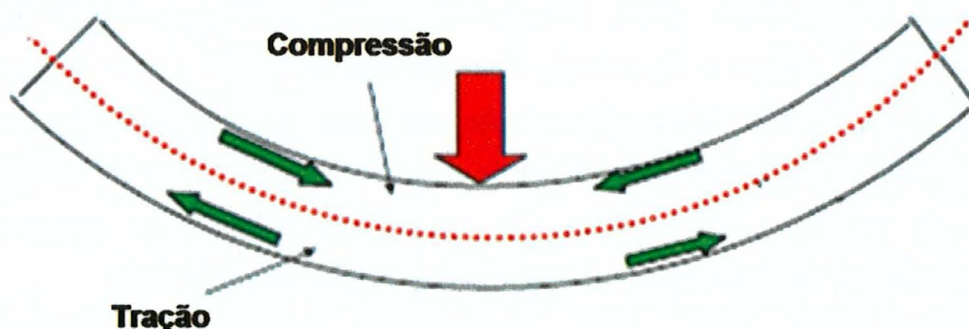


Figura 6 – Exemplo da atuação das forças de compressão e tração em uma madeira em resposta à inclinação

A formação da madeira de reação é freqüentemente acompanhada de um crescimento mais acentuado em diâmetro do caule ou galho, enquanto que do lado oposto esse crescimento é inibido, provocando assim uma ecentricidade (PILATE et al., 2004; TIMELL, 1986).

Do lado oposto à formação da madeira de reação, seja ela de compressão ou de tração, ocorre a formação da chamada madeira oposta, que se apresenta estrutural e quimicamente diferente da madeira normal e da madeira de reação. Geralmente a madeira normal é considerada como uma “intermediária” em relação às suas características entre a madeira de reação e oposta (WILSON; ARCHER, 1977). Timell

(1973) sugeriu que há um gradiente contínuo das características da madeira oposta para a normal e para a madeira de reação.

### **2.3.1 Indução da formação da madeira de reação**

Diversos são os estímulos iniciais para a formação da madeira de reação. Como já discutimos, os estresses de compressão e tração são os estímulos iniciais candidatos à formação da madeira de compressão e de tração, respectivamente (DU; YANOMOTO, 2007; TIMELL, 1986). As primeiras publicações de Cieslar (1896, citado por TIMELL, 1986) e Hartig (1896, citado por TIMELL, 1986) consideram a madeira de compressão como sendo um tecido de fortalecimento causado principalmente pela pressão exercida pelo vento no caule de gymnospermas. No entanto, experimentos feitos por Hartig (1981) e Jaccard (1938, revisado por SCURFIELD, 1973), mostraram que a gravidade seria responsável pela formação da madeira de reação. Jaccard (1938, revisado por SCURFIELD, 1973) demonstrou que a madeira de reação formada em galhos dobrados, depende da posição dos mesmos no caule, e não necessariamente do estresse de tensão ou de compressão (revisado por SCURFIELD et al., 1973). Outros pesquisadores (HARTMANN, 1942; SCOTT; PRESTON, 1955) comprovaram a indução da formação da madeira de compressão através de experimentos de centrifugação que serviram como um estímulo de hipergravidade.

Não obstante, muitos resultados que implicam em estresses mecânicos também foram responsáveis pela indução da formação da madeira de reação (ONAKA, 1935; SINNOTT, 1952). KWON et al. (2001) utilizaram a tecnologia da NASA para obter evidências de que o estresse mecânico de inclinação é o responsável inicial pela formação da madeira de compressão. O experimento foi realizado em um ambiente de microgravidade na *Space Shuttle Columbia (Life e Microgravity Mission STS-78)* e mostrou que a madeira de compressão foi formada em plântulas de gymnospermas inclinadas sob um ângulo de 45°.

Até agora, nenhuma hipótese parece esclarecer de fato qual é o estímulo que desencadeia a formação da madeira de reação. Porém, a idéia de que a formação da madeira de reação ocorre devido à tendência que a árvore possui em se reorientar no



espaço é consistente com as observações feitas e nos fornece um modelo prático para a indução, mesmo não especificando o tipo de estímulo.

Além dos estímulos gravitacionais ou mecânicos, um mecanismo interno pode controlar a formação da madeira de reação. É o que acontece quando, por exemplo, o broto apical de uma árvore é removido e um galho adjacente se inclina devido à formação da madeira de reação para ocupar o espaço cedido pela remoção do broto (WESTING et al, 1965).

### **2.3.2 Fitormônios e a formação da madeira de reação**

Os fitormônios por muito tempo vêm sendo estudados como reguladores chave do processo de xilogênese (revisado por SUNDBERG et al, 2000; MELLEROWICZ, 2001). Em plantas transgênicas de *Populus* com modificações no metabolismo de auxinas, a formação da madeira apresentou-se alterada (TUOMINEN et al, 1995). Uma concentração radial de auxina na região cambial foi associada à regulação do desenvolvimento do xilema e, particularmente, à duração da expansão celular das fibras (TUOMINEN et al., 1997).

A atuação dos fitormônios, principalmente as auxinas, na formação da madeira de reação também têm sido extensivamente estudada. Postulou-se que a madeira de compressão formada no lado inferior à inclinação de um tronco em gynospermas, está relacionada à alta concentração de auxinas, enquanto que a madeira de tração formada do lado superior ao da inclinação de troncos de angiospermas, está associada à baixa concentração (TIMELL, 1986). Desta maneira, NECESANY (1958), através da aplicação de auxinas na parte superior de troncos de plantas de *Populus* inclinados, impediu o desenvolvimento da madeira de tração. Complementando, CRONSHAW; MOREY (1965) utilizaram um inibidor do transporte de auxina (TIBA) e encontraram a formação da madeira de tração logo abaixo do ponto de aplicação do inibidor. Esses resultados deram força à idéia de que a madeira de tração se forma sob deficiência de auxina. No entanto, o trabalho de HELLGREN et al. (2004) que envolveu a mensuração de IAA (auxina natural) na região cambial de *P. tremula*, demonstrou que a madeira de tração poderia ser formada sem alterações no balanço de IAA, contradizendo a teoria anterior de que a baixa concentração de auxinas induziria a formação da madeira de

tração. No entanto, diversos trabalhos reportam a expressão diferencial de genes da família AUX/IAA, responsáveis pela transdução de sinais via auxina durante a indução da madeira de tração (MOYLE et al., 2002).

Outro grupo de fitormônios que pode estar agindo de maneira sinérgica com as auxinas são as giberilinas que estimulam a atividade meristemática e a alongação das fibras (ERIKSSON et al., 2000). O envolvimento das giberelinas na formação da madeira de tração foi sugerida por DENHARD e FEUCHT (1971). Neste trabalho aplicou-se GA<sub>3</sub> (forma ativa do ácido giberélico) em brotos verticais de *Prunus avium* que resultou na formação de fibras de madeira de tração. Outros estudos não mostraram efeitos durante a aplicação da giberelina (CRONSHAW; MOREY, 1968). Portanto, a regulação da formação da madeira de tração através das auxinas e giberelinas permanece obscura apesar de tantos trabalhos na área.

De maneira contrária, o etileno, aparece em altos níveis em *Eucalyptus* sob indução da madeira de tração (NELSON; HILLS, 1978) e genes como 1-aminocyclopropano-1-carboxylate oxidase, responsável pela produção de etileno, é superexpresso na madeira de tração de *Populus* (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2003).

### 2.3.3 Madeira de Tração

Neste tecido ocorre uma frequência menor de vasos em relação à madeira normal formada na ausência de estímulo e esses vasos são de menor diâmetro. Mas, a principal modificação está na composição das fibras deste tecido, ou mais precisamente na parede celular das fibras. Na madeira de tração, geralmente, a camada S<sub>3</sub> e parte da S<sub>2</sub> da parede secundária das fibras é trocada por uma camada espessa composta basicamente por alto teor de celulose cristalina e baixo teor de lignina e hemiceluloses. Esta camada (Figura 7), facilmente destacável das demais camadas S, é denominada de camada G (gelatinosa) por causa de suas propriedades ópticas incomuns quando comparada ao restante da parede da célula (WARDROP; DADSWELL, 1948).

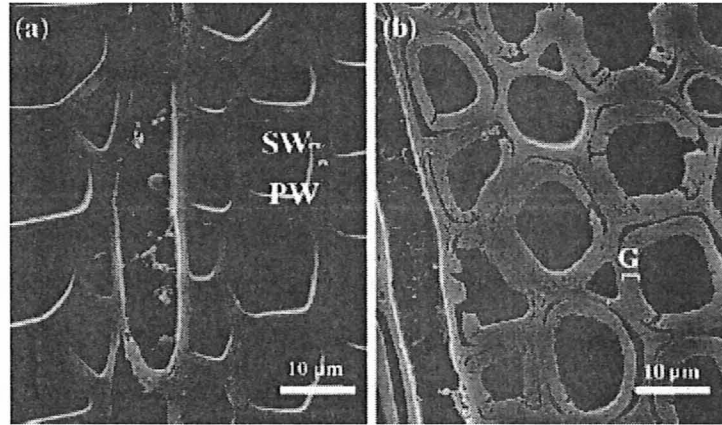


Figura 7- Microscopia eletrônica da madeira de *Populus*. (a) Fibras da madeira oposta a madeira de tração; (b) Fibras G presentes na madeira de tração com a presença adicional de uma espessa camada na parede celular secundária (camada G). PW, parede celular primária; SW, parede celular secundária; G, camada gelatinosa (PILATE et al., 2004)

Outra característica notável da camada G é a orientação das microfibrilas (Figura 8) de celulose quase que paralelamente em relação ao eixo da fibra, contribuindo para alta resistência mecânica da madeira de tração. Dessa maneira, durante a maturação, as fibras da madeira de tração se contraem fortemente na direção longitudinal, criando um estresse de tração que parece tentar puxar o tronco inclinado para a orientação normal (DU; YAMAMOTO, 2007; NORBERG; MEIER, 1966; TIMELL, 1969).

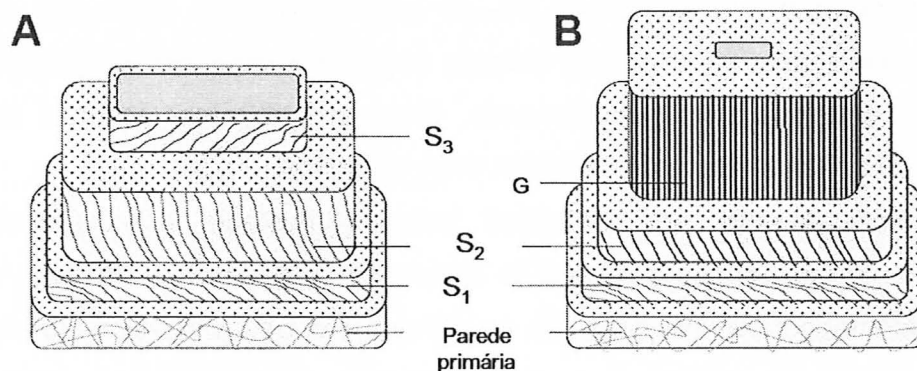


Figura 8 - Estrutura tridimensional de uma fibra. A parede celular é dividida em diferentes camadas, cada uma com seu arranjo particular das microfibrilas de celulose o que determina as propriedades mecânicas e físicas da madeira. Essas microfibrilas podem estar alinhadas irregularmente (como na parede celular primária), ou sob um ângulo particular em relação ao eixo da fibra (é o caso das camadas S1, S2 e S3). A) Fibra de uma madeira normal. B) Fibra-G: parte da camda S2 e S3 é substituída pela camada gelatinosa (G) (Retirado de ANDERSSON-GUNNERAS, 2005)

### 2.3.4 Composição da camada G

Os primeiros trabalhos sobre a composição de carboidratos da camada G em *Populus* sugeriram que a mesma seria composta basicamente por pura celulose (NORBERG; MEIER, 1966). Em trabalhos mais recentes, a análise química da composição de carboidratos de camadas G isoladas da madeira de tração de *Populus tremula* mostrou que essa camada contém menos celulose do que se acreditava e maior teor de outros carboidratos. As seguintes porcentagens de açúcares foram encontradas: 0,6% de raminose; 1,3% de fucose; 0,7% de arabinose; 5,6% de xilose; 2,1% de manose; 1,1% de galactose e 88,6% de glicose (NISHIKUBO et al., 2007). Além dessa análise de polissacarídeos, Nishikubo et al. (2007) sugeriram a presença de aproximadamente 10% a 15% de xiloglucanas na camada G.

Outros componentes importantes encontrados são as arabinogalactanas. Este polímero forma a cadeia de glicanas das proteínas-arabinogalactanas (AGPs). Assim, a presença de arabinogalactanas na camada G é um indicativo da presença de AGPs (MELLEROWICZ et al., 2008). A presença de AGPs na camada G foi demonstrada através do uso de anticorpos monoclonais (LAGARGUETTE et al., 2004; BOWLING; VAUGHN, 2008) e são consistentes com os resultados de expressão gênica obtidos (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006) mostrando a superexpressão de uma classe de AGPs na madeira de tração comparada à madeira normal e oposta. Nishikubo et al. (2007) sugeriram a presença de 2% de arabinoglucanas. Além das xiloglucanas e arabinogalactanas, os mesmos autores sugeriram que aproximadamente 2% dos açúcares pertencem às glucomananas. Em outro trabalho, pectinas também foram imunolocalizadas na camada G (BOWLING; VAUGHN, 2008).

Adicionalmente aos trabalhos acima, Joseleau e colaboradores (2004) imunolocalizaram unidades siringil de lignina na camada G de *Populus deltoides*, em uma porcentagem de 40% presente na camada S2. Esses dados sugerem que o baixo teor de lignina da camada G é especificamente enriquecido pela lignina S (siringil). Estudos realizados em diferentes espécies arbóreas encontraram correlações entre o teor de lignina Klason e a composição da lignina: alta quantidade de lignina G (guaiacil) correlaciona-se com alto teor de lignina enquanto que baixo teor dessa, corresponde à

grande quantidade de lignina S (siringil). Dessa forma, a madeira de tração parece seguir um aumento na relação S/G das unidades de lignina (PILATE et al., 2004).

Portanto, nota-se que a composição química da camada G é bem diferente do que se postulava no passado. Isso se deve principalmente ao avanço nas tecnologias de análise química e de imunolocalização. Muito ainda precisa ser feito no que diz respeito às técnicas, uma vez que o isolamento da camada G não é uma tarefa trivial, pois perdas de carboidratos são comuns nesse processo.

### **2.3.5 Madeira de tração como modelo de estudo**

A madeira de tração mostra-se como um excelente modelo de estudo dos processos da formação da madeira. Por apresentar uma xilogênese diferenciada com características químicas e anatômicas peculiares extremamente relacionadas à qualidade da madeira, cada vez mais surgem trabalhos que se baseiam em experimentos realizados com a indução da madeira de tração. Esses trabalhos exploram a dinâmica da formação da madeira, as características das fibras e a biossíntese de polissacarídeos como celulose e hemiceluloses.

Estudos genômicos que empregam o sistema de indução da madeira de tração através da inclinação artificial das árvores têm sido frequentes. Em 2004, Déjardin e colaboradores, prepararam 4 bibliotecas de cDNA a partir do xilema de árvores de *P. tremula* x *P. Alba* induzidas para a formação da madeira de tração. Através do agrupamento funcional, alinhamento e anotação de mais de 10.000 ESTs, sugeriram uma mudança na distribuição de ESTs entre as bibliotecas da região cambial e de xilemas (tração, oposta e maduro), considerando-se que possivelmente estão ligadas à mudança do processo de expansão celular para o processo de construção da parede celular secundária. A maior parte dos agrupamentos funcionais realizados correspondem a genes requeridos na construção da parede celular secundária: síntese de celulose (celulose sintases, sacarose sintase), metilação de precursores de lignina (S-adenosilmetionina sintase, ácido cafeil 3-O-metiltransferase, cafeil-CoA O-metiltransferase) e organização de microtúbulos do citoesqueleto ( $\alpha$  - tubulinas).

No trabalho de PAUX et al (2005), 196 genes relacionados a mudanças estruturais e de composição da parede celular secundária foram encontrados

expressando-se diferencialmente entre árvores de eucalipto com xilema normal e xilema de tração. Dentre esses genes, um gene que codifica uma celulose sintase foi correlacionado ao aparecimento da camada G, além de outros genes envolvidos na regulação da biossíntese de lignina.

Em 2008, Lu et al. clonaram três genes de celulose sintases de uma biblioteca de cDNAs de xilema em desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* (EgraCesA1, EgraCesA2 e EgraCesA3), todas elas envolvidas com a biossíntese da parede celular secundária. Através de análises de expressão gênica em materiais sob tração observou-se um aumento na expressão das celulosas sintases *EgraCesA2* e *EgraCesA3*, sugerindo-se que ambas estão envolvidas no processo de biossíntese da celulose encontrada na camada gelatinosa da madeira de tração, o que leva a concluir-se que *EgraCesA1*, encontrado em baixos níveis na madeira de tração, não deve ser uma subunidade do complexo *EgraCesA2* – *EgraCesA3*, mesmo estando associada à deposição de parede secundária.

Estudos envolvendo o metabolismo das ligninas também utilizam a madeira de tração como modelo. Embora seja bastante complexa a resposta dos genes de lignina ao modelo da madeira de tração, novas descobertas têm sido feitas sobre a regulação dessas vias metabólicas. Genes como CCR e CAD, envolvidos nos últimos passos da biossíntese de monolignol, exibiram padrões similares de expressão na madeira de tração e oposta. Já os genes COMT e CCoAOMTs, envolvidos nos passos de metilação, se comportaram de forma contrária na madeira de tração e oposta, ou seja, o aumento da expressão em um tipo de madeira, diminui a expressão na outra, e vice versa. Essa correlação inversa indica interdependência na regulação desses genes (PAUX et al., 2004).

Interessante foram os resultados mostrados por Chen et al. (2000). Nesse caso, dois genes CCoAOMT foram induzidos em todos os tipos celulares na presença da indução da madeira de tração, enquanto que na ausência do estímulo, a expressão dos mesmos foi restrita a vasos e raios xilemáticos.

Poucos trabalhos envolvendo análise de proteínas na madeira de tração foram produzidos. Baba et al. (2000) identificou 5 proteínas anexas à parede celular e à membrana plasmática que são específicas da madeira de tração. Mais recentemente,

Kaku et al. (2009) identificaram 111 proteínas a partir da camada G isoladas da madeira de tração de *Populus*. Proteínas relacionadas à biossíntese de lignina, xiloglicana endotransglicosilase, e *fasciclin-like* arabinogalactana são exemplos de proteínas encontradas na camada G.

Como relatado, o modelo experimental da madeira de tração oferece a oportunidade de novos avanços e descobertas de genes chaves, envolvidos nos diversos processos de formação da madeira permitindo assim, o acesso à regulação da qualidade da madeira. É com esse objetivo que cada vez mais estudos globais de transcritos, proteínas e metabólitos estão sendo conduzidos (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006).

## 2.4 Proteômica

No contexto da genética atual, o fenótipo pode ser observado a partir dos pontos de vista morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular. Sob a visão molecular, o fenótipo pode ser descrito em termos de RNAm e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente. Dessa maneira, a relação entre genótipo e fenótipo torna-se bastante complexa (MATTICK, 2003). A sequência de um gene não deve ser mais considerada isoladamente na predição de sua função, e a análise do RNAm é somente um pouco mais informativa. Já a atividade das proteínas está proximamente associada à função do gene, uma vez que é o produto final da regulação da atividade gênica. Nesse sentido, a proteômica, que visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento, surge como mais uma ramificação entre as ômicas para complementar os estudos sobre a biologia molecular das células (WILKINS et al., 1996). A proteômica é também uma poderosa ferramenta no melhoramento genético, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Muitas das tecnologias hoje utilizadas na proteômica foram desenvolvidas muito antes do início da “proteômica”. No entanto, foi o avanço na tecnologia de sequenciamento de proteínas por meio da espectrometria de massas que possibilitou o

seu surgimento e desenvolvimento (TYERS; MANN, 2003). A tecnologia de géis bidimensionais associada à espectrometria de massas é a principal estratégia empregada pelos grupos de pesquisa, apesar de antiga (JORRÍN et al., 2007).

A grande maioria dos estudos de proteômica de plantas se concentra na produção de perfis de proteoma de vários órgãos, tecidos, células e organelas das principais culturas cultivadas (FUKUDA et al., 2003; SHEN et al., 2002; DAÍ et al., 2007).

A identificação de proteínas relacionadas à xilogênese e abundantes no xilema em desenvolvimento foi iniciada em *Populus* (MIJNSBRUGGE et al., 2000) e em *Pinus* (PLOMION et al., 2000). Ambos trabalhos utilizaram géis bidimensionais seguidos de micro sequenciamento. Muitas estratégias tem sido utilizadas para o estudo do processo de formação da madeira. A comparação entre tecidos juvenil e maduro foi feita no trabalho de PAIVA et al. (2008) onde o tecido cambial do topo (madeira juvenil) e da base (madeira madura) de árvores de *Pinus* foram coletadas e as proteínas analisadas. As diferenças entre esses perfis refletem às diferenças químicas e estruturais que ambas madeiras apresentam. Da mesma forma trabalhos envolvendo a formação da madeira de compressão em *Pinus* (PLOMION et al., 2000) e da madeira e tração em *Eucalyptus* (PLOMION et al., 2003), apresentaram as diferenças existentes no perfil do proteoma dessas espécies sob a influência de um estímulo gravitacional que provoca alterações na composição e na estrutura da parede celular das fibras. No entanto esses trabalhos apresentaram poucas proteínas identificadas devido principalmente às dificuldades da técnica utilizada como baixa automação da técnica de géis 2D seguida do micro sequenciamento.

Com a utilização da espectrometria de massas os trabalhos envolvendo a proteômica na xilogênese passam a ser mais robustos. Gion et al. (2005) detectaram 1039 *spots* dos quais 240 foram analisados via LC - MS/MS e 57 analisados via MALDI-MS. Nesse trabalho, os autores identificaram as proteínas em 6 tipos diferentes de tecido: madeira juvenil e madura, madeira de compressão e oposta, e madeira de lenho tardio (*late wood*) e de lenho inicial (*early wood*). Utilizando os benefícios da espectrometria de massas na caracterização em larga escala de proteínas envolvidas na xilogênese, Celedon et al. (2007) identificaram 240 proteínas do xilema em



desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* associadas à formação da madeira juvenil nessa espécie. Nesse trabalho diversas proteínas relacionadas ao processo de lignificação e ao metabolismo de carboidratos foram identificadas.

Mais recentemente, o emprego da estratégia *shotgun* permitiu a identificação em larga escala de proteínas do xilema em desenvolvimento de *Populus* (KALLURI et al., 2009). Nesse trabalho, aproximadamente 6.000 proteínas foram identificadas. Além disso, uma técnica de extração de proteínas nucleares foi desenvolvida, permitindo a identificação de fatores de transcrição e proteínas remodeladoras da cromatina, que geralmente se encontram sob baixa abundância.

Como se vê, o surgimento da espectrometria de massas para o desenvolvimento da proteômica possibilitando os experimentos em larga escala foi decisivo. Plataformas de análise rápida, direta e sensível são utilizadas, dentre elas os géis 2D e o *shotgun*, que tornou as análises ainda mais dinâmicas. No entanto, apenas a geração de dados proteômicos não resolve por si só a complexidade dos sistemas biológicos. É necessária a integração de dados oriundos da proteômica, com a genômica, transcritômica e metabolômica, o que não é uma tarefa trivial. A combinação desses dados requer parâmetros normalizadores, controle experimental rígido e uma visão holística para associar resultados estatísticos aos mecanismos moleculares da atividade celular. Nesse sentido, Bylesjö et al. (2008) apresentaram uma estratégia de integração de dados oriundos do estudo do transcritoma, proteoma e metaboloma de genes associados à biossíntese de lignina. Eles demonstram que através dessa estratégia é possível caracterizar funcionalmente genes candidatos.



### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal o estabelecimento de um plataforma de dados de proteômica e de transcritômica relacionados às alterações no direcionamento do metabolismo de carboidratos para os componentes da parede celular que ocorrem durante a indução da madeira de reação de *Eucalyptus grandis*. Além disso, este trabalho abrangeu também os seguintes objetivos específicos:

- Identificação das proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração e oposta em comparação às árvores normais.
- Estabelecer um perfil de expressão dos principais transcritos envolvidos na biossíntese dos componentes da parede celular
- Associar as diferenças de expressão à formação da camada G na parede celular secundária da madeira de tração



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do Material

O experimento foi implantado em novembro de 2006 no município de Itapetininga, São Paulo, na fazenda Estrela da Suzano Papel e Celulose. De um talhão de *Eucalyptus grandis*, foram escolhidos aleatoriamente, 25 indivíduos do clone 617 com 1,8 anos de idade. As árvores escolhidas apresentavam as dimensões representadas na tabela 1.

Tabela 1 – Medidas de diâmetro médio, altura total (T) e altura comercial (C) e os respectivos desvios padrões em relação à média de árvores de *Eucalyptus grandis* coletadas após 15, 30 e 60 dias da instalação do experimento. (cm): centímetros, (m): metros

Coletas e tempos de indução	Árvores inclinadas			Árvores não inclinadas		
	Diâmetro (cm)	Altura C (m)	Altura T (m)	Diâmetro (cm)	Altura C (m)	Altura T (m)
1ª Coleta - 15 dias	8,7 ± 0,5	5,8 ± 0,2	12,1 ± 0,5	9,2 ± 0,3	8,2 ± 0,3	13,5 ± 0
2ª Coleta - 30 dias	9,8 ± 0,5	8,6 ± 0,4	14,5 ± 0,5	10,5 ± 0,7	9,0 ± 0	15,0 ± 0
3ª Coleta - 60 dias	10,4 ± 0,2	9,4 ± 0,5	14,8 ± 0,2	10,7 ± 0,3	9,5 ± 0,7	15,2 ± 0,3

Para a indução da formação da madeira de tração, as árvores escolhidas foram inclinadas com a ajuda de cordas e estacas sob um ângulo constante, como mostra a figura 9.

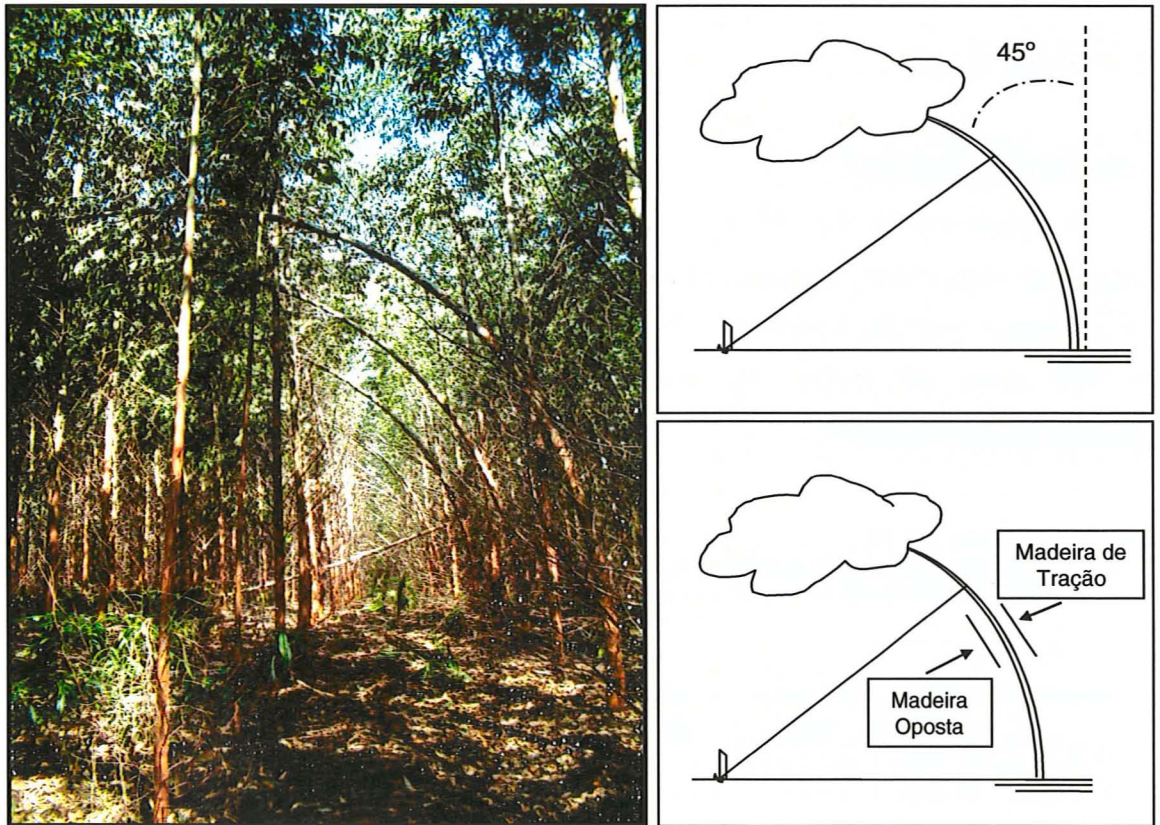


Figura 9– Instalação do experimento no campo

Para o experimento, considerou-se 3 períodos de coleta após a indução da formação da madeira de tração em que as árvores permaneceram inclinadas no campo por 15, 30 e 60 dias.

O tecido vegetal utilizado neste trabalho para a extração de proteínas e de RNA total correspondeu ao xilema em diferenciação (LEV-YADUN; SEDEROFF, 2000) que abrange diferentes camadas da região cambial. Para a coleta deste tecido, retirou-se um retângulo de aproximadamente 20 x 15cm da casca do tronco das árvores seguido de raspagem utilizando-se uma lâmina do tecido existente entre a casca e o xilema lignificado (Figura 10). A raspagem deste tecido foi realizada no tronco e na casca, visto que uma parte das células permanece aderida à casca.



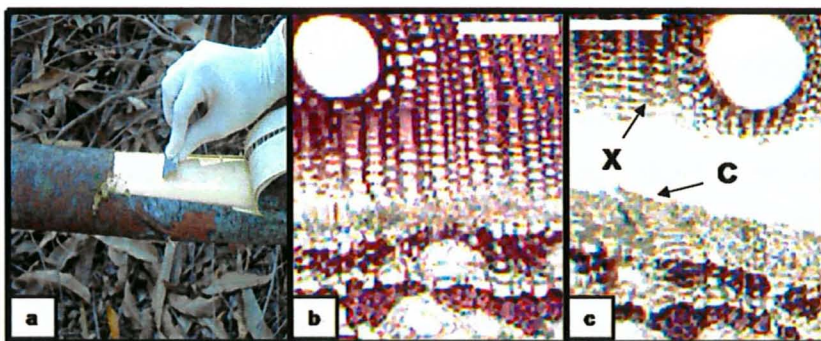


Figura 10 - Coleta do material biológico. (a) Remoção da casca e raspagem do tecido cambial. (b) Secção transversal de *Eucalyptus* antes da remoção da casca. (c) Secção transversal de *Eucalyptus* depois da remoção da casca. Barra = 100  $\mu$ m. X = xilema, C = região cambial. Modificado de Celedon et al., 2007

A raspagem deste tecido em diferenciação foi realizada na altura da inclinação das árvores onde a mesma era mais intensa, local em que ocorre a formação da madeira de reação (madeira de tração e oposta). Assim, a coleta foi realizada, tanto no lado oposto à inclinação correspondendo à madeira de tração, assim como no mesmo lado da inclinação correspondendo à madeira oposta (Figura 9). Da mesma forma, foram coletadas amostras em árvores que não foram inclinadas, ou seja, de madeira normal, correspondendo ao controle. A coleta da madeira normal foi realizada na mesma altura da coleta realizada na madeira de tração e oposta. Portanto, os tratamentos foram chamados da seguinte forma: T15 e O15 (madeira de tração e oposta após 15 dias de indução); T30 e O30 (madeira de tração e oposta após 30 dias de indução); T60 e O60 (madeira de tração e oposta após 30 dias de indução) e, C15, C30 e C60 corresponderam às árvores controle (não inclinadas) coletadas nos mesmos períodos de indução (15, 30 e 60 dias) da formação das madeiras de tração e oposta.

Imediatamente após a coleta, o material foi congelado em nitrogênio líquido e macerado em almofariz com auxílio do pistilo até a obtenção de um pó fino. Para o transporte, o macerado foi acondicionado em tubos Falcon de 50 mL em gelo seco. No laboratório o material foi armazenado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

Discos de madeira de 4 cm de espessura, obtidos pelo seccionamento dos troncos das árvores, na altura da madeira de reação, foram mantidos em condições normais de laboratório. Estes discos foram utilizados para análise anatômica através da microscopia óptica.

## 4.2 Microscopia óptica

Para caracterizar a formação da madeira de reação (tração e oposta) através do experimento de indução realizado, discos foram coletados após 15, 30 e 60 dias de indução para a análise microscópica. Essas coletas foram realizadas tanto do lado da formação da madeira de tração, como do lado da madeira oposta. Além disso, árvores não inclinadas, consideradas controle também foram coletadas.

O preparo das lâminas semi-permanentes foi realizado no Laboratório de Anatomia da Madeira e Identificação de Madeiras do IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) sob a responsabilidade da Ms Maria José Miranda.

Os cortes realizados no IPT foram realizados utilizando-se discos de madeira de cada tratamento. Estes discos foram emergidos em água destilada fervente para amolecimento do material. Assim, com o auxílio de um micrótomo de deslize Reichert equipado com navalha de aço, obteve-se cortes dos mesmos. Os cortes de 15-20  $\mu\text{m}$  de espessura no plano transversal foram alvejados com hipoclorito de sódio 20% para clareamento do material, seguido de três lavagens com água destilada, antes de serem submetidos a uma coloração dupla de safranina (1% p/v) e azul de astra (1% p/v) em solução aquosa. Os cortes corados foram transferidos para uma lâmina para observação em microscópio óptico e documentação das imagens com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio.

## 4.3 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada segundo Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações. Para cada condição, foram realizadas 3 extrações independentes. Aproximadamente 2g de material vegetal macerado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi homogeneizado em 15 mL de tampão de extração (ANEXO A) e mantido sob agitação durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida adicionou-se 15 mL de fenol saturado em Tris HCl pH 8,5. Novamente, os tubos foram mantidos sob agitação por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após centrifugação de 30 minutos sob  $10.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi transferido para tubos novos e o precipitado descartado. A estes tubos acrescentou-se fenol até atingir-se o volume inicial seguindo-se nova homogeneização por 30 minutos.



Novamente, a amostra foi centrifugada recuperando-se o sobrenadante. Desta forma, a seqüência de homogenização e centrifugação foi realizada três vezes, sempre acrescentando-se fenol a cada recuperação do sobrenadante, garantindo assim, um bom rendimento da extração e boa purificação das amostras.

Em seguida, as proteínas foram precipitadas *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$  através da adição de 5 volumes de 0,1M de acetato de amônio preparado em metanol. Após a precipitação, o material foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O precipitado recuperado foi lavado 2 vezes com 0,1M de acetato de amônio em metanol, seguido de mais uma lavagem com metanol (100%) e outra com acetona (100%). Entre cada lavagem, o material permaneceu por 1 hora, a  $-20^{\circ}\text{C}$  e em seguida, foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado resultante foi submetido à secagem em dissecador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.1 Solubilização de proteínas**

Depois de extraídas do tecido vegetal, as proteínas foram solubilizadas em 1 mL do tampão de solubilização (ANEXO B). Nesta etapa, realizou-se a redução e alquilação das proteínas promovendo maior solubilização, de acordo com Vâlcu e Schlink (2006).

A redução das proteínas foi efetuada pela presença de DTT no tampão de solubilização a fim de romper-se as pontes dissulfeto entre os aminoácidos de cisteína. Já a alquilação, foi realizada com a adição de 15mM de iodoacetamida e permanência das amostras no escuro por aproximadamente 1 hora, com o propósito de adicionar-se o radical alquil nas extremidades rompidas prevenindo assim a restauração das ligações. A solubilização foi finalizada pela adição de 2 M de tiouréia às proteínas promovendo-se assim, uma melhor solubilização das mesmas.

#### **4.3.2 Quantificação das proteínas**

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

Uma curva padrão foi estabelecida utilizando-se BSA (albumina de soro bovino) como proteína padrão. Diferentes concentrações de BSA foram empregadas e a

obtenção das respectivas absorvâncias a 595nm foram utilizadas para a construção da curva padrão (absorvância x quantidade de proteínas).

A metodologia utiliza reações de 5 µL do extrato de proteínas, 5 µL de HCl (0,1 N), 3 mL de reagente corante diluído em água milliQ (1:4). Essas reações foram feitas em triplicatas, transferidas para cubetas de vidro, seguida de leitura da absorvância no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Essas leituras foram então interpoladas na curva padrão construída com BSA para a obtenção da concentração de proteínas totais no extrato protéico.

#### **4.3.3 SDS-PAGE (Mini-Gel)**

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

As amostras (10µg) de proteínas totais, adicionadas ao dobro do volume de tampão de desnaturação (ANEXO C) foram mantidas a 100°C por 2 minutos. As amostras e um marcador de peso molecular pré-corado (BioRad) foram então aplicadas em gel de poliacrilamida 10 cm x 8,5 cm (Mini- PROTEAN II Cell, BioRad). Para a realização da eletroforese, o gel foi preparado com duas concentrações de poliacrilamida. Para o *stacking*, ou seja, os primeiros 2 cm, junto às canaletas de aplicação, utilizou-se a concentração de 4% (p/v) e as amostras foram submetidas a uma voltagem fixa de 50 V. A extensão seguinte, chamada de gel de corrida, foi preparada com uma concentração de 12,5% (p/v) de acrilamida e as amostras submetidas a uma voltagem de 80 V até atingirem o limite inferior do minigel. Para a corrida utilizou-se tampões Laemmli (LAEMMLI, 1970) inferior e superior (ANEXO D).

#### **4.4 Eletroforese bidimensional**

A técnica de eletroforese bidimensional consiste de duas etapas: a focalização isoeétrica (primeira dimensão) e a separação por peso molecular através da eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão). Para cada condição foram obtidos no mínimo 3 géis bidimensionais, provenientes de 3 extrações protéicas independentes. Dessa maneira, foram confeccionados pelo menos 2 géis de cada

extração independente, sendo escolhidos os melhores de cada réplica, formando uma triplicata, para a análise de imagens.

#### **4.4.1 Focalização isoeétrica (Primeira Dimensão)**

A focalização isoeétrica foi conduzida em sistema Ettan IPGPhor (GE Healthcare), a 20°C, utilizando-se fitas IEF de pH 4-7 (Fitas IPG, GE Healthcare).

Cerca de 900 µg de proteínas totais foram submetidas à focalização isoeétrica. O tampão de focalização consiste do tampão de solubilização (ANEXO B) acrescido de 1% de anfólitos (0,75% tampão IPG pH 4-7 e 0,25% tampão IPG pH 3-10) (GE Healthcare).

O programa de focalização foi estabelecido seguindo-se os passos: reidratação a 50 µA por 1 h, 30 V por 11 hs, 100 V por 1 h, 200 V por 1 h, 400 V por 1 h, 100 V por 1h, 5000 V por 10 hs e 8000 V até atingir 80.000 Vh. Após a focalização as fitas foram estocadas a -80°C, até o momento de uso.

#### **4.4.2 Eletroforese (Segunda Dimensão)**

Para a realização da corrida de eletroforese de segunda dimensão em gel de poli(acrilamida), as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio (ANEXO E) da seguinte maneira: inicialmente, as fitas foram submetidas à redução pela imersão das mesmas em solução de equilíbrio acrescida de 2 % (p/v) de dithiothreitol (DTT) por 15 minutos. Em seguida, realizou-se a alquilação na mesma solução contendo 4 % (p/v) de iodoacetamida (IAA) e traços do corante azul de bromofenol por 15 minutos.

As fitas foram moldadas na parte superior de um gel vertical de poli(acrilamida) e seladas com 0.5 % de agarose em tampão Laemmli superior. A eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada em gel de 12,5% de poli(acrilamida) com 1,5 mm de espessura usando-se o sistema SE-630 (GE Healthcare). A migração das proteínas foi efetuada sob amperagem fixa (30mA) por gel, até o corante alcançar a base do mesmo.

#### **4.4.3 Coloração dos géis**

Tanto os minigéis unidimensionais como os géis bidimensionais, foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad) de acordo com Candiano et al. (2004).

Após 60 minutos em solução fixadora (ANEXO F), realizou-se duas lavagens com água milli-Q por 10 minutos para a retirada do excesso de solução fixadora e em seguida, adicionou-se a solução de coloração (ANEXO G) que permaneceu por no mínimo 12 horas em contato com os géis. Todas essas etapas foram realizadas sob leve agitação, com auxílio de um agitador de mesa horizontal.

O excesso de corante foi removido com água MilliQ e os géis mantidos em 5 % (v/v) de ácido acético a 4°C, até a análise das imagens e retirada dos *spots*.

#### 4.5 Obtenção e análise das imagens

A digitalização das imagens dos géis foi feita com auxílio de um *scanner* modelo UTA-1100, através do programa LabScan versão 5.0 (GE Healthcare) e as imagens foram analisadas automaticamente pelo programa Image Master 2D Platinum 7 software (GE Healthcare).

As imagens dos géis bidimensionais foram primeiramente trabalhadas no sentido da detecção dos *spots*, ora feita automaticamente pelo *software*, ora manualmente, no caso da detecção automática não ter sido satisfatória. Em seguida, as imagens das triplicatas, provenientes de extrações independentes, foram sobrepostas para a avaliação dos *spots* com reprodutibilidade considerável. Para compensar pequenas diferenças existentes na quantidade de proteínas carregadas no gel, na coloração e descoloração, o volume de cada *spot*, foi normalizado de forma a se obter um volume relativo.

A quantificação relativa de uma determinada proteína nos géis de cada tratamento foi obtida pela normalização do volume de cada *spot* em relação ao volume total de *spots* detectados em cada gel ( $\text{volume individual do spot} / \text{volume total spots} \times 100$ ). Apenas os *spots* que apresentaram coeficiente de variação inferior a 30% entre as triplicatas foram considerados reprodutíveis. *Spots* com coeficiente de variação maior que 30%, ou seja, considerados não reprodutíveis, foram ignorados na análise de imagens.

Na última etapa da análise de imagens, os géis provenientes de cada tratamento foram contrastados com os géis da amostra controle de cada tempo de indução da formação da madeira de tração e oposta. Ou seja, os volumes normalizados dos *spots*

correspondentes entre esses géis foram comparados para se estimar a expressão diferencial das proteínas presentes nos mesmos. Para isso, realizou-se análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa SAS e as médias foram comparadas através do teste-T ao nível de significância de 1%.

Os pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) experimentais das proteínas foram determinados automaticamente pelo programa a partir de 5 pontos de referência, provenientes da utilização de um marcador de peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad range, BioRad), e os teóricos, foram sugeridos pelo banco de dados do SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

#### **4.6 Digestão de proteínas**

Cada *spot* isolado, de cada uma das repetições do gel, foi fragmentado com auxílio de um bisturi e submetido a uma solução de descoloração (ANEXO H) até total retirada do corante.

Após serem desidratados com 100% de acetonitrila (ACN), procedeu-se a redução e alquilação dos *spots*. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida os fragmentos de gel foram mantidos no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com 100 % de ACN, os fragmentos foram reidratados com solução de 10 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de tripsina (Promega V5111) em 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0. Após a reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão, realizada a 37°C por 16 horas.

A ação da tripsina foi bloqueada pela adição de solução bloqueadora (ANEXO I) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas, com solução de eluição I (ANEXO J), solução de eluição II (ANEXO L), seguidas da lavagem final com 100% de ACN. Em cada uma das etapas de eluição, os fragmentos de gel foram

sonicados por 20 minutos a 45°C (sonicador Ultra Som, Thronton-IPEC Eletrônica Ltda) e o sobrenadante transferido.

Os sobrenadantes de cada *spot* foram transferidos para um único tubo eppendorf, sendo o volume reduzido em concentrador a vácuo (Eppendorf modelo 5301), à temperatura ambiente.

#### 4.7 LC-MS/MS

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

A separação dos peptídeos foi realizada utilizando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H<sub>2</sub>O, 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H<sub>2</sub>O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo usado foi de 5 µL.min<sup>-1</sup> nos primeiros 15 min, 2 µL.min<sup>-1</sup> entre 15 e 40 min, e de 5 µL.min<sup>-1</sup> entre 40 e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 min, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 min, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 min, 45% a 80% em 5 min, mantido por 5 min a 80% (v/v) e os últimos 5 min em 10% (v/v).

A ionização por *electrospray* foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,0 KV e temperatura do cone igual a 90°C, na presença de 5 psi de nitrogênio. A energia de colisão por gás argônio foi mantida em 15 psi. Todos os parâmetros foram definidos através do programa MassLynx v 2.1 (Waters Corporation).

O Q-TOF modelo Ultima API, utilizado nas análises, conta com um sistema *Nanolock Spray* (Waters), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição dos espectros de cada amostra. Todas as aquisições foram

calibradas com um peptídeo padrão GFP (GLU<sup>1</sup>-fibrinopeptide B; Sigma), em concentração igual a 100 fmol.μL<sup>-1</sup> e injeção automática de 1 μL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.8 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas**

Os espectros de massas das amostras foram processados utilizando-se os programas *MassLynx NT BioLynx V.4.0* e *ProteinLynx V.2.1* da Waters. Os arquivos de espectros assim processados, foram contrastados com o banco de dados MSDB (*Mass Spectrometry protein sequence Data Base*), através da utilização da ferramenta MASCOT (2010).

A escolha dos parâmetros (Fig 9) utilizados no MASCOT (2010) tem grande influência na precisão da identificação das proteínas. Além da escolha correta do banco de dados, outros parâmetros são muito importantes. Dessa maneira, como as amostras foram reduzidas e alquiladas, selecionou-se a carbamidometil (C) como modificação fixa. Também selecionou-se a oxidação da metionina como modificação variável e tolerância de massa de 50 ppm. Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores *scores*, área de cobertura e número de peptídeos, verificando-se também a correspondência entre massa molecular e ponto isoelétrico dos *spots* com as proteínas encontradas nos bancos de dados.

**MASCOT MS/MS Ions Search**

Your name: FERNANDA      Email: fersalvato@gmail.com

Search title: eucalipto madeira reação

Database: MSDB

Taxonomy: ... Viridiplantae (Green Plants)

Enzyme: Trypsin      Allow up to: 1 missed cleavages

Fixed modifications: Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Carbamyl (N-term)

Variable modifications: NIPCAM (C), Oxidation (HW), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y)

Quantitation: None

Peptide tol. ±: 50 ppm      MS/MS tol. ±: 0.2 Da

Peptide charge: 2+      Monoisotopic:  Average

Data file: [Browse...]

Data format: Micromass (.PKL)      Precursor: m/z

Instrument: ESI-QUAD-TOF      Error tolerant:

Decoy:       Report top: AUTO hts

Figura 11 – Parâmetros utilizados no *software* MASCOT (2010) para a identificação das proteínas

#### 4.9 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada segundo o método desenvolvido por Zeng e Yang (2002) a partir de 1g de tecido cambial de *Eucalyptus grandis*. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, ao qual adicionou-se 10mL de tampão de extração (ANEXOM) pré-aquecido a 65°C. A mistura após homogeneização foi mantida por 15 minutos a 65°C, sendo agitada a cada 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a adição de um volume de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente). A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1.000 x g, durante 8 minutos. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo, repetindo-se a extração com CIA mais duas vezes, sendo a última centrifugação feita durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual adicionou-se 0,25 volumes de 10M LiCl para precipitação do RNA total. Após homogeneização, as amostras foram mantidas durante 16 horas, a 4° C. Após centrifugação (16.000 x g) durante 30 minutos, a 4° C, os *pellets* de RNA total resultantes, foram lavados três



vezes com etanol 75% (v/v), secos à temperatura ambiente durante 10 minutos e ressuspensos em 110 µL de água DEPC.

#### 4.9.1 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à pureza e quantificadas com auxílio da espectrofotometria em dois comprimentos de onda, 260nm e 280nm. A razão entre as absorvâncias ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ), é utilizada como uma medida de qualidade das amostras. Valores entre 1,6 a 2.0 indicam boa qualidade de RNA extraído. Já a absorvância a 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) é utilizada para a quantificação do RNA total extraído segundo a fórmula (Figura 10):

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260\text{nm}} \times F_c \times F_d}{1000}$$

Figura 12 – Fórmula para o cálculo da concentração de RNA ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ).  $A_{260\text{nm}}$  absorvância a 260 nm,  $F_c$ : fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorvância no comprimento de onda de 260 nm correspondente a 40  $\mu\text{g RNA.mL}^{-1}$ .  $F_d$  é o fator de diluição da amostra. O valor final é dividido por 1000 para expressar a unidade de concentração de RNA em  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Fonte: Sambrook et al (1989)

#### 4.9.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA

Alíquotas de 50 µg de RNA total armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  foram utilizadas para a purificação de seus respectivos RNAm. O isolamento do RNAm, foi realizado com o auxílio do *kit Dynabeads<sup>®</sup> mRNA purification* (Invitrogen), que se baseia em uma separação magnética. Microesferas contendo Oligo (dT)<sub>25</sub> em sua superfície que capturam e purificam RNA poliadenilado. Outros RNAs desprovidos de cauda poli-A e DNA genômico são imediatamente eliminados.

Cada 200 µL de microesferas são capazes de purificar 75 µg de RNA total, produzindo até 2 µg de RNAm. Assim, conduziu-se duas purificações de 50 µg de cada material de acordo com as instruções do fabricante. O RNAm purificado de cada 50 µg de RNA total foi ressuspensado em 17,5 µL de água DEPC. As duas purificações foram agrupadas totalizando 35µL.

A fita de cDNA de cada gene (Tabela 2) foi sintetizada com o auxílio do *kit* SuperScript™ One-Step RT-PCR Platinum® *Taq* (Invitogen), em uma mistura de reação contendo 6,25 µL de Tampão 2X concentrado (contendo 0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO<sub>2</sub>), 1,25 µL de cada *primer* (400 nM), 0,25 µL de RT/Platinum® *Taq* e 3,5 µL de RNAm, totalizando 12,5 µL de volume final. Os tubos com as misturas de reação foram colocados em um termociclador com a seguinte programação: 1 ciclo de 50°C por 30 minutos e 94°C por 2 minutos para síntese de cDNA e pré-desnaturação da enzima transcriptase reversa; e 10 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos e 30 segundos para amplificação dos fragmentos.

#### 4.9.3 Seleção de genes e *primers*

Foram escolhidos 23 genes relacionados às modificações, biossíntese e deposição de parede celular secundária e lignificação (Tabela 2) A escolha dos genes foi baseada nas diferenças químicas e estruturais descritas entre os vários tipos de madeira (madeira de reação, juvenil e madura) e também de acordo com os resultados obtidos por Carvalho et al. (2008) em um estudo que envolveu a análise de expressão gênica através da tecnologia SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) da região cambial de *Eucalyptus grandis*.

Os *primers* (Tabela 2) utilizados foram sintetizados em trabalho anterior realizado no mesmo laboratório (CARVALHO et al., 2008) e estavam disponíveis para uso.

Tabela 2 – *Primers* escolhidos relacionados à biossíntese da parede celular para realização do PCRsq  
(continua)

Gene	gi(NCBI)	Pares de <i>primers</i>
Cafeil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT)	3319277	L: TCTTCCTGATGACGGAAAGATT R: ATAGGGTGTTGTCGTAGCCAAT
Sacarose sintase (SuSy)	80973755	L: GAAATCCTTCCACCCTGAGAT R: TTCATCTCAGACTGCTCTTCCA
UDP-glicose pirofosforilase (UGPase)	103475065	L: TTCCAGTGAAAGCAACTTCAGA R: AAGATGCTTCAAACGGAATTGT
Pectinesterase (PE)	103474979	L: AGCTTCGCTTCACGAATTTATC R: ATCCGTCAAATTCATTCCATTC

Tabela 2 – *Primers* escolhidos relacionados à biossíntese da parede celular para realização do PCRsq  
(conclusão)

Gene	gi(NCBI)	Pares de <i>primers</i>
Endo 1,4-glucanase (KOR)	70779690	L: CATTTCACAATCAGACCAGCAT R: TGTAGCTCATTTTCCGAGGATT
Celulose sintase 1 (CesA1)	67003906	L: CGATCGCAGTGATCGATATG R: TCCAAGGTTGAAGATGGCGGCATT
Celulose sintase 2 (CesA2)	67003908	L: ACATGTGATTGCTGGCCTTC R: TTCTGAGACATGAGCGATGA
Celulose sintase 3 (CesA3)	67003910	L: CTGTGATTGCTGCCCATGCT R: CGCCACCCTGTTCCATCAA
Celulose sintase 4 (CesA4)	67003912	L: AGCCAAAGCAGAGAAAGTCA R: ATAAGCGTAGAGGCCACAAA
Celulose sintase 5 (CesA5)	67003914	L: GGAAGGGTGGCAATAAGAA R: AACAGGAGACTGACCGAATC
Fenilalanina amônia liase (PAL)	5690432	L: CCTGATCTCATCAAGGAAGACC R: GAGCAGGTCCCTCTCACAGTAG
Cafeil O-metil transferase (COMT)	437776	L: AAATCCTCATGGAAAGCTGGTA R: GTCGAAGTTGATCCCTTTTCATC
$\beta$ -Tubulina-1 (B-Tub1)	103481142	L: GTTGAATTGCCGATGAAGGT R: TGGATTTGCACCACTCACAT
$\beta$ -Tubulina-2 (B-Tub2)	103477591	L: ACCCAACCATGAAGAAGTGC R: TCCCTTCCCCTAAGGTGTCT
Actina-1 (Act1)	103479213	L: CCCAAAGCTAACCGTGAGAA R: GCTCAGCTGGGGTAGTGAAG
Laccase (LAC)	51555713	L: CACCAAGTTAGTGGAAATCTTCTCAT R: TGTATTCATGTATAGCTTGCCAAAA
Cinamil-CoA Redutase (CCR)	2058312	L: CCTCCCTGTCTTGAATCCCTTT R: GTTCACCTCATCAGAGCACCT
Xiloglucan Endo-transglicosilase/hidrolase 3 (XTH3)	70779684	L: TGCAAGGACACGGCGCGGTTCC R: GGAAGATATCAAAGAACACGGAGA
Polygalacturonase (POLY)	32163864	L: AACCTGACGAGCCACATGAC R: TGTGTGGTTAAGAAGCTTTTGG
Fator de transcrição MYB2 (MYB2)	39725412	L: CCTCCTTCCCTTTTCTTGATTT R: AAGCTTCCGTTGCTGTTATCTC
Peroxidase (PER)	88659653	L: CAGCGGCACTATAATCAGTGAG R: AAGTGTTGTTGGAGCAGGAAT
Arabinogalactan Protein (AGP15, FLA 1)	153799886	L: TCAACGCGCAACTTAACAAC R: TGTTTGGTCCACTGTTGCAT

#### 4.9.4 PCR semi-quantitativo (PCRsq)

A mistura de reação usada para o PCRsq era composta de 400 nM de cada *primer*, 12,5 µL de SYBR green (SYBR Green real-time RT-PCR SuperMix-UDG) e 3 µL de cDNA diluído ( $10^{-2}$ ), num volume final de 25 µL. Para cada gene as reações foram feitas em triplicata e processadas no equipamento iQ5 (BioRad) com a seguinte programação: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos para desnaturação da amostra; 40 ciclos de: 95°C por 20 segundos, 54° a 62°C (dependendo dos *primers*) por 30 segundos e 72°C por 30 segundos para amplificação dos fragmentos, com leitura da fluorescência a 72°C; 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 1 ciclo de 55°C por 30 segundos e 1 ciclo para construção de curvas de dissociação dos *primers* com a temperatura se elevando de 55°C até 95°C, e a cada minuto leituras da fluorescência.

A análise semi-quantitativa da expressão gênica, foi realizada com o auxílio do aplicativo LingRegPCR (RAMARKERS et al., 2003) que nos fornece uma regressão linear dos dados brutos da PCR possibilitando o cálculo da eficiência individual de cada *primer* nas reações e as concentrações iniciais de RNAm de cada amostra. Já a normalização dos dados de expressão foi feita através da escolha de genes de referência feita pelo *software* Norm-finder (discutido no próximo item).

#### 4.9.5 Seleção dos genes de referência

Com base em resultados prévios desenvolvidos no mesmo laboratório (CARVALHO et al., 2008), foram selecionados 4 genes de referência potencialmente ideais para a normalização da expressão gênica. Os genes selecionados foram os que mostram menores variações de expressão entre o tecido foliar e cambial de árvores de *Eucalyptus* (CARVALHO et al., 2008). Os genes escolhidos foram: ubiquitina, isocitrato desidrogenase,  $\alpha$ -tubulina e piruvato quinase. A estabilidade da expressão de cada um desses genes foi calculada pelo *software* Norm-finder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>). O Norm-finder é um aplicativo do Excel (Microsoft) que etima a estabilidade de expressão com base nas variações intra e intergrupos de genes candidatos (ANDERSEN et al., 2004).

Como o *software* Norm-finder nos fornece a melhor combinação de dois genes param serem utilizados como normalizadores, ous seja, a dupla de genes mais

estáveis, optou-se pela utilização de dois genes na normalização dos dados de expressão. Os dados de expressão dos dois genes escolhidos pelo Norm-finder foram submetidos à análise de variância (ANOVA,  $P \leq 0,05$ ) para comprovar a estabilidade da expressão desses genes ao longo dos materiais testados.

Um fator de normalização foi gerado a partir da média geométrica dos genes selecionados como normalizadores (VANDERSOMPELE et al., 2002). A partir de então, os valores de concentração dos genes alvos foram divididos pelo fator de normalização (média geométrica dos genes de referência), obtendo-se assim o valor de expressão.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A formação da madeira de tração, possui 3 principais diferenças em relação à madeira normal. A taxa de produção da madeira é aumentada, o número de elementos de vasos é reduzido e a biossíntese da parede celular das fibras é modificada com a deposição da camada G. Decisões sobre o crescimento e sobre o desenvolvimento são determinadas pelas células meristemáticas da região cambial, enquanto que a formação da camada G ocorre durante a diferenciação do xilema (TIMELL, 1986). Este trabalho está focado no estudo da formação da camada G, porém o material coletado (xilema em desenvolvimento) permitiu a presença de células nos estádios iniciais de diferenciação, o que nos levou a identificar proteínas relacionadas a esses estádios iniciais também. Em analogia com a madeira de compressão induzida em coníferas (TIMELL, 1986) e outros trabalhos com angiospermas (QIU et al., 2007; PAUX et al., 2005), pode-se assumir que células do xilema em desenvolvimento respondem ao estímulo gravitacional durante o desenvolvimento da parede celular secundária. Portanto, o tecido analisado nos revela tanto genes e proteínas envolvidos na indução desse tipo de madeira como na biossíntese da camada G.

A decisão de se verificar esses efeitos durante a formação da madeira de reação (tração e oposta) ao longo de um tempo de indução (60 dias) está baseada na hipótese de que os genes e proteínas que intervêm nas etapas iniciais da formação da madeira de reação devem influenciar as características da madeira formada posteriormente. Diferentemente do que se observa em outros trabalhos em que se examina o padrão de expressão de genes quando a madeira de reação já está completamente formada, geralmente sob efeito de um estímulo por vários anos, o trabalho que se discute aqui considera os estádios iniciais da indução da formação da madeira de reação avaliando-se o padrão de expressão da madeira de tração e oposta em contraposição à madeira normal. Dessa maneira, os perfis de expressão desenhados pelos experimentos desse trabalho, fornecem uma base sólida para a discussão de questões relacionadas aos mecanismos moleculares que coordenam a formação da madeira.

## 5.1 Microscopia óptica

Com o intuito de se constatar a formação da camada G e conseqüentemente a indução da madeira de tração, lâminas para microscopia óptica foram preparadas. Observou-se a presença da camada G no material com 60 dias de indução (Figura 13).

A presença da camada G pode ser observada na parte interna da parede celular secundária dessas células. Regiões tingidas de azul (azul de astra) correspondem às áreas ricas em deposição de celulose, enquanto que áreas em vermelho (safranina) indicam parede celular lignificada. Tal modificação da parede celular das fibras não foi observada nos materiais controle e na madeira oposta (Figura 13).

Verifica-se a diminuição visível do lúmen nas células do xilema da madeira de tração (Figura 13 A) quando comparado às células do xilema da madeira normal (Figura 13 B) e do xilema da madeira oposta (Figura 13 C) Isso ocorre justamente devido à deposição maciça de uma camada extra de celulose, a camada G. A deposição dessa camada está relacionada à necessidade de aumento da resistência das células contra a força gravitacional que age sobre o caule inclinado (TIMELL, 1986).

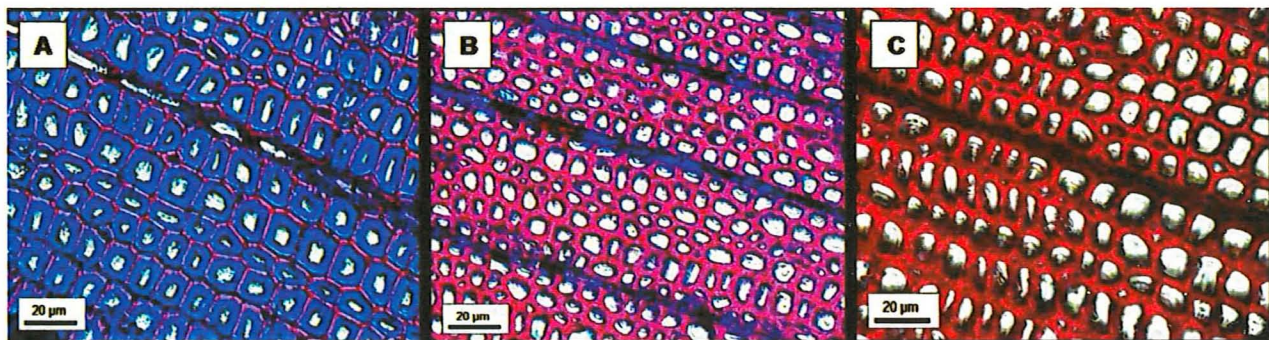


Figura 13 - Microscopia óptica de seções transversais da formação da madeira de tração em *Eucalyptus grandis* após 60 dias de indução. Seções com 10 µm de espessura e coloração dupla de safranina e azul de astra. A). Xilema da madeira de tração. B) Xilema normal, árvore não inclinada C) Xilema da madeira oposta. Barras = 20µm

## 5.2 Extração das proteínas

O método de extração fenólica bem como de solubilização das proteínas foram os mesmos realizados por Celedon et al (2007). A extração fenólica remove compostos secundários, carboidratos e ácidos nucleicos de uma mistura protéica que interferem na eletroforese bidimensional provocando, após a coloração, o aparecimento de manchas



nos géis (HURKMAN e TANAKA, 1986; FAUROBERT et al., 2006). Dessa maneira, foram obtidos géis de ótima resolução com *spots* bem definidos e evidentes, além de boa reprodutibilidade entre as réplicas técnicas.

Após a solubilização e quantificação das proteínas, procedeu-se a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante unidimensional para a avaliação da qualidade das extrações (Figura 14). Nesses géis, verificou-se a boa eficiência do método de extração que resultou em ótima qualidade da mistura de proteínas, sem sinais de degradação ou impurezas.

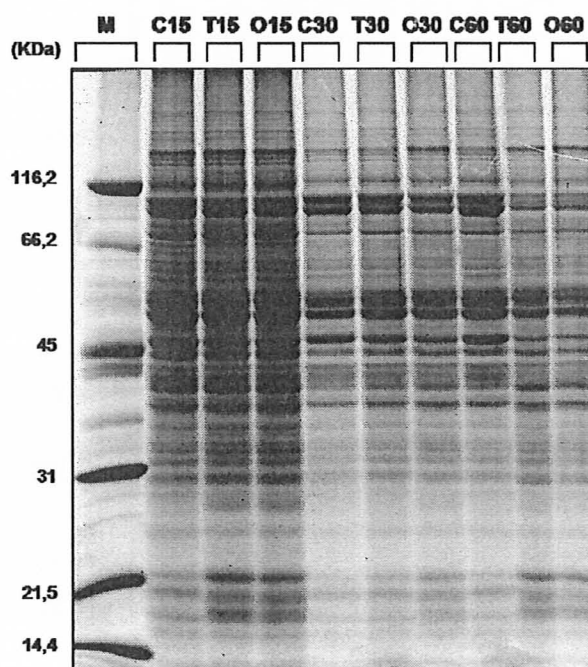


Figura 14 - Gel representativo de poliacrilamida com amostras de proteínas totais da região cambial de *Eucalyptus grandis* resultantes da extração fenólica. Madeira de tração (T15, T30 e T60) e oposta (O15, O30 e O60) coletadas após 15, 30 e 60 dias de indução. Controle (árvores não inclinadas) coletadas nos mesmos períodos (C15, C30 e C60). M = marcador de peso molecular (BioRad, Broad Range) em KDa

### 5.3 Géis bidimensionais

Segundo resultados preliminares obtidos em nosso grupo de trabalho (CELEDON et al., 2007), no tecido da região cambial, a grande maioria das proteínas possuem *pI* na faixa de 4-7 (CELEDON et al., 2007). Assim, a fim de se obter uma melhor resolução dos *spots*, confeccionou-se géis bidimensionais dentro dessa faixa de

pH (Figura 15). Os géis foram preparados em triplicata sendo cada réplica proveniente de uma extração fenólica diferente da mesma amostra, apresentaram boa resolução e perfil eletroforético semelhante.

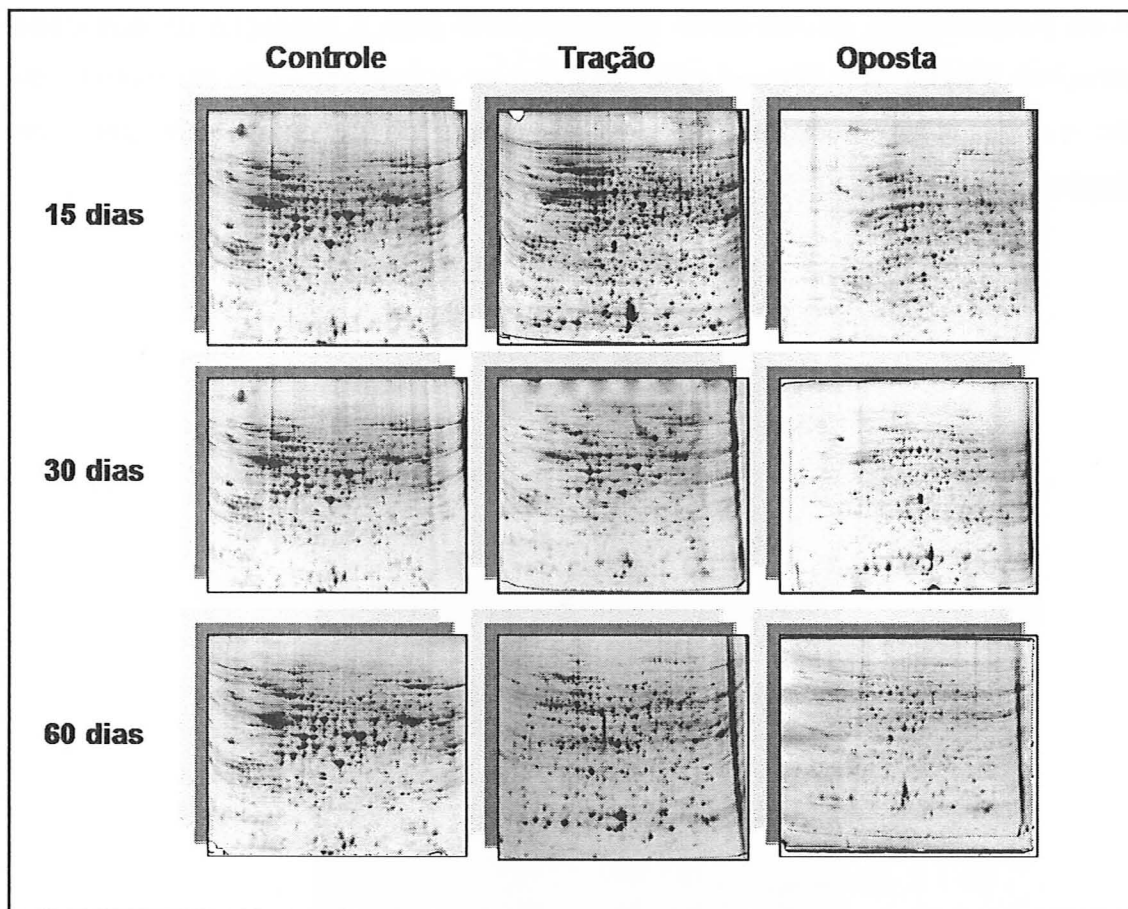


Figura 15 – Géis bidimensionais representativos na faixa de pH de 4 a 7 confeccionados em triplicata e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Tecidos utilizados na extração de proteínas: madeira de tração, madeira oposta e controle, nos três períodos de indução: 15, 30 e 60 dias

#### 5.4 Análise das imagens dos géis

Nas análises intra-específicas, ou seja, entre as réplicas de um mesmo tratamento, constatou-se boa reprodutibilidade avaliada de acordo com o número de *spots* detectados e no coeficiente de correlação entre as mesmas (Figura 16). Em geral, observou-se coeficientes de correlação muito bons ( $R=0,95$ ), indicando boa reprodutibilidade entre as extrações (Tabela 3).

pl 4-7

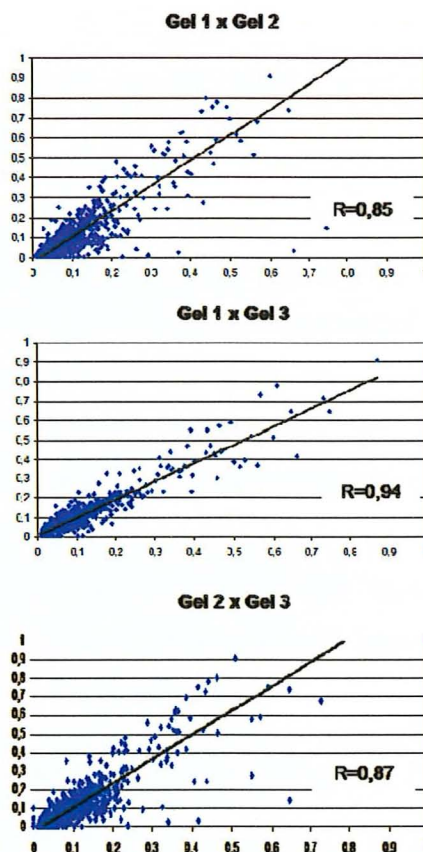
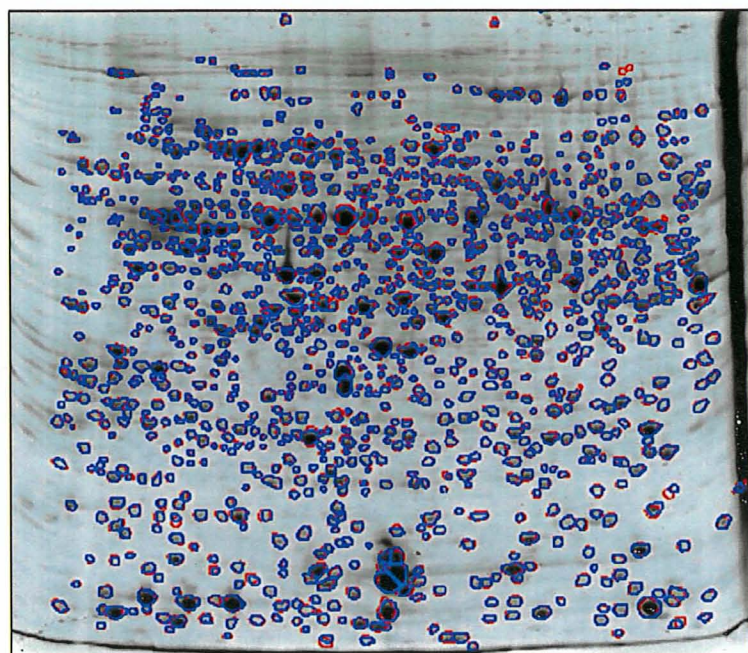


Figura 16 – Géis bidimensionais sobrepostos do tratamento T15 e correlações entre as triplicatas utilizando o programa ImageMaster (GE Healthcare). No gel, *spots* azuis correspondem a uma réplica de gel e *spots* vermelhos a outra réplica

Tabela 3 – Coeficiente de correlação entre as triplicatas de géis em cada tratamento utilizado. T e O são os tratamentos utilizados, madeiras de tração e oposta, respectivamente. C, madeira controle (não inclinada). Tempos de indução da madeira de reação: 15, 30 e 60 dias.

Tratamentos	Coeficiente de correlação (R)			médias
	Gel 1 x Gel 2	Gel 1 x Gel 3	Gel 2 x Gel 3	
C15	0,9498	0,9730	0,9609	0,9612
T15	0,8570	0,9448	0,8713	0,8910
O15	0,8810	0,8637	0,9109	0,8852
C30	0,9434	0,9945	0,9978	0,9786
T30	0,9660	0,9611	0,9918	0,9730
O30	0,9808	0,9740	0,9870	0,9806
C60	0,9812	0,9956	0,9840	0,9869
T60	0,9936	0,9955	0,9955	0,9949
O60	0,9902	0,9833	0,9799	0,9845

Para alcançarmos uma confiança ainda maior na análise das imagens, *spots* que apresentaram variação de volume normalizado maior que 30% entre as triplicatas, foram desconsiderados na análise. Essas variações, bem como as diferenças no número de *spots* detectados entre as triplicatas são causadas por variações na focalização isoeétrica e na eletroforese, inerentes às técnicas.

Já na análise inter-específica, observou-se grande variação entre o número de *spots* detectados (Tabela 4). Essa diferença se atribui ao estado fisiológico e metabólico dessas plantas que respondem ao tratamento aplicado ao longo do tempo. No material T15 foram detectados 1126 *spots* reprodutíveis, número esse muito maior que nos demais tratamentos, podendo ser interpretado como resultado de uma resposta mais imediata ao estímulo de inclinação das árvores.

Tabela 4 – Número de *spots* detectados nos diferentes tratamentos em cada réplica de gel bidimensional. T e O são os tratamentos utilizados, madeira de tração e oposta, respectivamente. C, madeira controle (não inclinada). Tempos de indução da madeira de reação: 15, 30 e 60 dias

Tratamentos	Número de <i>spots</i>		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>C15</b>	779	756	771
<b>T15</b>	1169	1130	1150
<b>O15</b>	270	263	264
<b>C30</b>	745	753	751
<b>T30</b>	530	528	466
<b>O30</b>	187	177	158
<b>C60</b>	712	722	713
<b>T60</b>	627	621	616
<b>O60</b>	278	239	220

Da comparação inter-específica entre os tratamentos e o material controle dentro de cada tempo de indução, foram detectados *spots* diferencialmente expressos através do alinhamento desses géis (Figura 17). Além dos *spots* diferencialmente expressos quanto ao volume apresentado, há os casos de ausência e presença, chamados aqui de *spots* exclusivos. De todos esses *spots*, os que apresentaram maior intensidade foram submetidos à análise de espectrometria de massas.



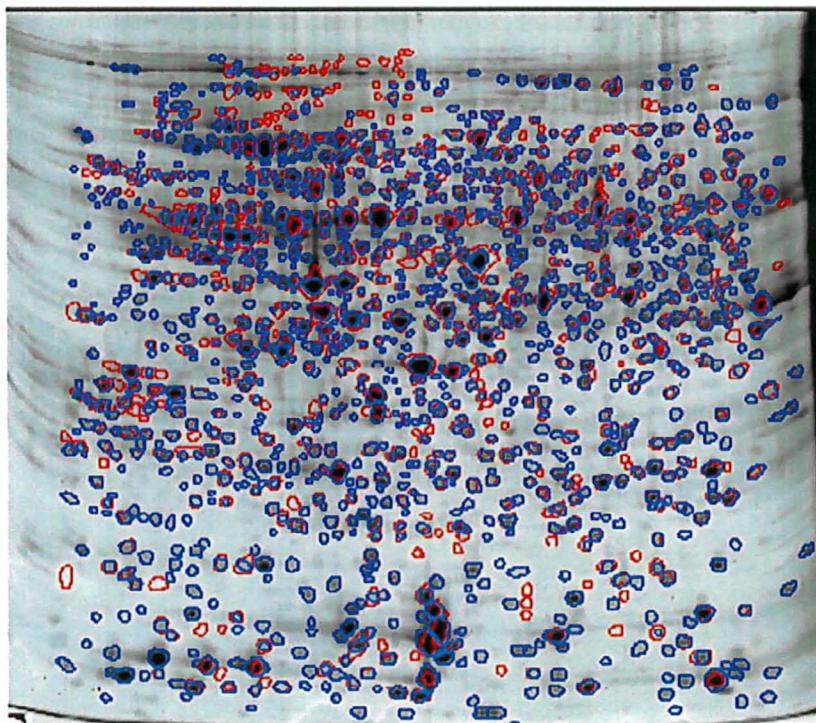


Figura 17 – Géis bidimensionais sobrepostos através do programa ImageMaster (GE Healthcare). *Spots* sobrepostos dos géis C15 (vermelho) e T15 (azul)

### 5.5 Espectrometria de massas: análise dos espectros

Os espectros MS/MS foram analisados utilizando-se o programa MASCOT (2010) e seleção dos parâmetros adequados, bem como o banco de dados utilizado, o MSDB, que se caracteriza por ser um banco conciso, não redundante, utilizado especificamente nas aplicações de espectrometria de massas.

Informações como massa molecular e  $pI$  teóricos foram obtidos no SWISS-PROT que é um banco de anotações de sequências de proteínas, onde podemos encontrar a descrição das funções das proteínas, modificações pós-traducionais e estrutura de seus domínios (BAIROCH et al., 2005).

Cada espectro foi analisado separadamente e o resultado, apresentado pelo *software* MASCOT (2010) na forma de um *score* que representa a somatória da pontuação gerada a partir da probabilidade de cada peptídeo presente no espectro de MS/MS ser um evento aleatório. O *match* correto, que não é um evento aleatório, possui uma probabilidade muito baixa. Para isso, um histograma (Figura 18) com a distribuição das 50 melhores proteínas encontradas (*matches*) é mostrado. *Scores* são

dados por  $-10 \cdot \log(P)$ , onde  $P$  é a probabilidade de uma proteína encontrada (*match*) ser um evento aleatório. *Scores* sombreados de verde representam os *matches* aleatórios, enquanto que o *match* correto (ou mais provável) possui um *score* de 108 (PERKINS, 1999). Conhecendo-se o tamanho da base de dados onde são feitas as procuras por *matches* e dada a probabilidade de um *match* ser aleatório, torna-se possível a medição de significância de um resultado. Um evento é significativamente aceitável se ocorrer aleatoriamente com uma frequência menor que 5%. No caso abaixo (Figura 18), *scores* maiores que 67 são significativos ( $p < 0,05$ ). Ou seja, *scores* maiores que 67 possuem mais de 95% de probabilidade de serem verdadeiros *matches* (MASCOT, 2010).

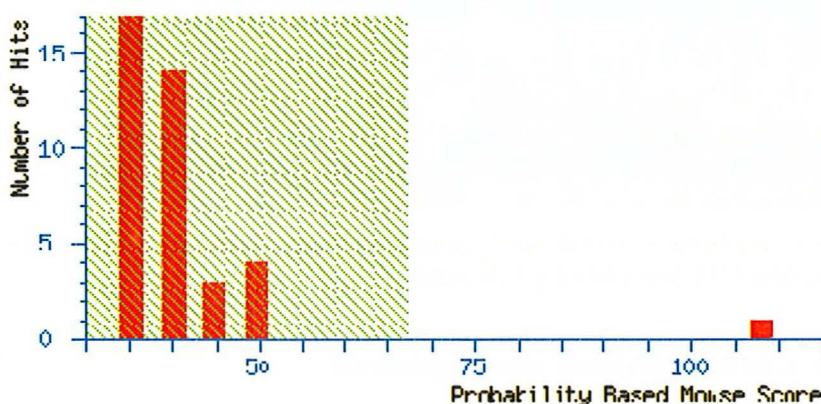


Figura 18– Histograma apresentado pelo software MASCOT (2010). A área sombreada em verde indica eventos aleatórios de *matching*, enquanto que o *outlier* (*score* = 108), fora da área sombreada, representa o evento não aleatório, ou seja, o *match* com maior probabilidade de identidade da proteína

## 5.6 Proteínas Identificadas

Até o momento 700 *spots* aproximadamente foram submetidos à espectrometria de massas, sendo que aproximadamente 68% desses *spots* apresentaram similaridade com proteínas dos bancos de dados SWISS PROT e MSDB.

Poucas proteínas apresentaram similaridade com proteínas de *Eucalyptus ssp.*, devido ao reduzido número de seqüências depositadas nos bancos de dados públicos como SWISS PROT.

A presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína pode indicar a ocorrência de modificações pós-traducionais, variações alélicas, variações isoenzimática e eventos de *splicing alternativo* resultando em isoformas de uma mesma proteína. Esses eventos



ou até mesmo a manipulação das amostras durante o preparo das mesmas, podem ser apontados como causadores do aparecimento de novos *spots* de uma mesma proteína (JORGE et al., 2005). A grande variedade de isoformas transcricionais e pós-transcricionais pode desempenhar diferentes funções sendo dessa maneira, essencial no mecanismo de regulação dos processos celulares (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005). A ocorrência de múltiplos *spots* de uma mesma proteína em caule já foi relatada em trabalhos envolvendo diferentes lenhosas como *Pinus pinaster* e *Populus trichocarpa* (COSTA et al., 2000; MIJNSBRUGGE et al., 2000; GION et al., 2005).

### **5.6.1 Proteínas identificadas ao longo do processo de indução da madeira de reação (tração e oposta)**

A mudança na biossíntese de uma parede celular constituída por camadas S compostas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, para uma parede celular com camadas G ricas em celulose, envolve mudanças no direcionamento do carbono produzido pelas plantas.

Os resultados das proteínas identificadas mostram que ao longo da indução da madeira de reação (tração e oposta) a planta responde de forma diferente ao estímulo gravitacional. Nas etapas iniciais (15 dias) de indução da madeira de tração verifica-se um aumento da expressão de proteínas relacionadas principalmente ao metabolismo da celulose, e uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas à biossíntese de lignina. Aos 30 dias, observou-se um aumento transitório da expressão de algumas proteínas relacionadas à lignificação, que ao final dos 60 dias de indução da madeira de tração possuem sua expressão diminuída novamente. Esse é um indicativo da necessidade de que além da formação da camada G, o processo de lignificação deve ser importante na construção de um tecido que resista ao estresse gravitacional sem colapsar.

Além das proteínas diretamente relacionadas ao metabolismo da parede celular, proteínas relacionadas ao processo de indução também foram identificadas nos dois tipos de madeira. Essas proteínas são àquelas envolvidas na geração de energia, já que se tratam de tecidos sob alta atividade de diferenciação e divisão celular, além das proteínas sinalizadoras que atuam na regulação de diversas funções biológicas e as

proteínas responsáveis pelo *turnover* de outras proteínas, garantindo assim o *pool* metabólico necessário para satisfazer as demandas desses tecidos (tração e oposta) sob intensa atividade metabólica.

#### **5.6.1.1 Classificação das proteínas em categorias funcionais**

As proteínas identificadas foram classificadas em categoriais funcionais (Figura 19 e 20) como proposto por Rison et al. (2000) e modificado por Carvalho et al. (2008). Essa classificação fornece uma visão global do metabolismo dos dois tipos de madeira (tração e oposta) ao longo do período de indução da madeira de reação. Durante a análise das imagens de géis 2D, foi possível identificar além dos *spots* diferencialmente expressos (Anexo N-U, Figura 19), *spots* “exclusivos” de um tratamento. Os *spots* chamados aqui de “exclusivos” são aqueles que só foram detectados em um tratamento quando comparados ao controle, ou seja, são *spots* que estão presentes em um tratamento e ausentes no controle. Até o momento, foram submetidos à espectrometria de massas apenas os *spots* “exclusivos” da madeira de tração e madeira oposta após 15 dias de indução (Anexo T e U, Figura 20). Dessas proteínas exclusivas, grande parte foi também identificada como proteínas diferencialmente expressas em outros *spots* durante a comparação com o material controle. A detecção de proteínas em múltiplos *spots* caracteriza provavelmente a ocorrência de isoformas e possíveis modificações pós-traducionais.



### Proteínas diferencialmente expressas identificadas

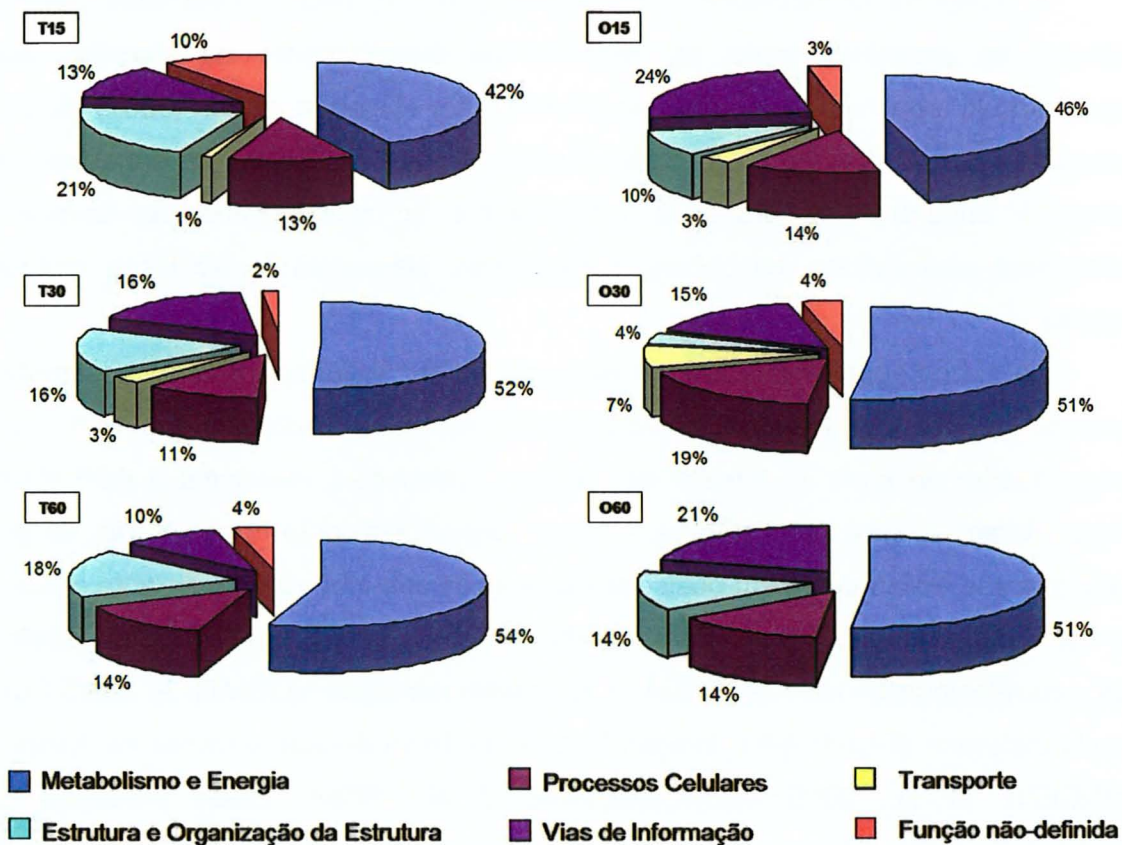


Figura 19 – Classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas identificadas na madeira de tração (T) e oposta (O) em relação ao material controle (árvore não inclinada) nos três intervalos de indução (15,30 e 60 dias)

### Proteínas exclusivas identificadas

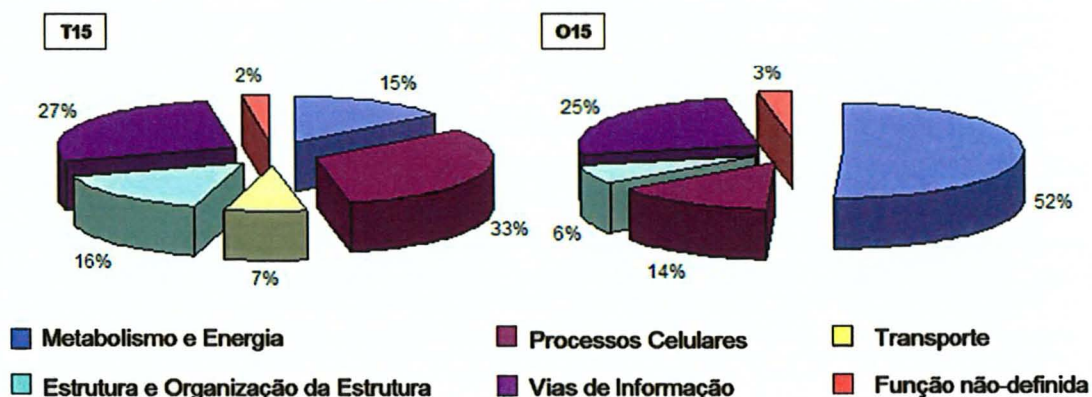


Figura 20 – Proteínas exclusivas identificadas após 15 dias de indução da madeira de tração e oposta. T15, madeira de tração; O15, madeira oposta

A categoria *Metabolismo e Energia* (Figura 19) está representada pelo maior número de proteínas tanto na madeira de tração como na madeira oposta, corroborando com os resultados observados por Celedon et al. (2007) durante a caracterização do proteoma da região cambial da madeira juvenil de eucalipto. Nessa categoria encontram-se proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, compostos secundários, nitrogênio, carboidratos, pequenas moléculas e síntese de energia.

Na subcategoria *Metabolismo de aminoácidos* incluiu-se a S-adenosilmetionine sintetase (SAMS) que sintetiza S-adenosil-D-metionina (AdoMet) que é o principal grupo doador de metil na síntese de lignina, a partir de L-metionina e ATP (KENDE, 1993). Assim, o ciclo metil (Figura 21) é o responsável pelo fornecimento de grupos metil que são adicionados em posições específicas dos monolignóis durante o processo de lignificação das células do xilema (CÁNTON et al., 2005). A atividade da SAMS têm sido correlacionada com a Cafeil 3 O metiltransferase (COMT) e cafeil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), indicando a importância dessas enzimas na lignificação (VINCENT et al., 2005; MIJNSBRUGGE et al., 2000). Essas proteínas estão classificadas dentro da subcategoria *Metabolismo da Parede Celular*. Proteínas como a Cinamil álcool desidrogenase (CAD) relacionada à biossíntese de lignina e uma proteína *cp-wap13* possivelmente relacionada ao processo de biossíntese de celulose foram identificadas (DELGADO et al., 1998), também foram classificadas dentro dessa subcategoria.

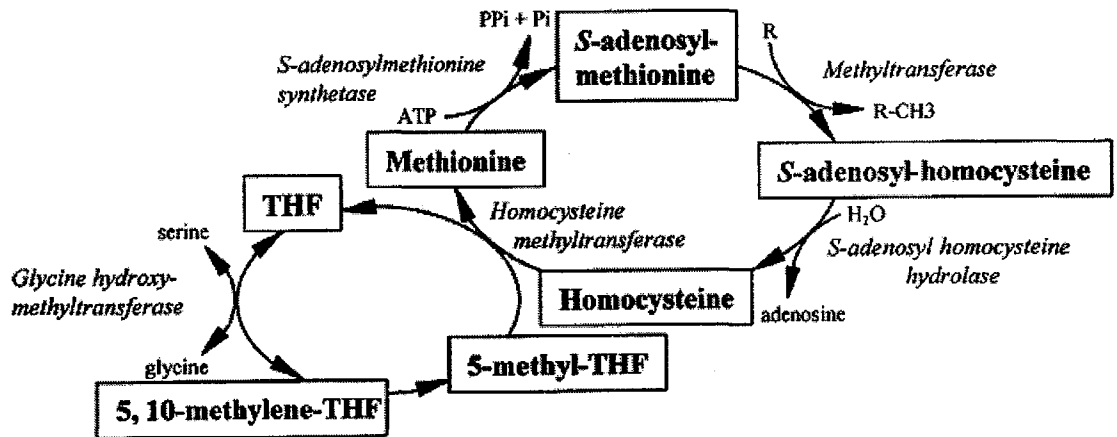


Figura 21 – Ciclo metil em plantas. THF: tetrahidrofolato. Retirado de MIJNSBRUGGE et al. (2000)

Outra subcategoria bastante representada foi a de *Metabolismo secundário* onde foram incluídas as isoflavona redutases e éter benzílico fenilcumarino redutases. Esta última está envolvida na biossíntese de isoflavonóides e lignina (SHOJI et al., 2002; MIJNSBRUGGE et al., 2000).

No *Metabolismo de nitrogênio*, a glutamina sintetase e a glutamate desidrogenase foram identificadas. Segundo Cantón et al. (2005) um sistema eficiente de reciclagem de nitrogênio é necessário para prevenir uma deficiência severa em plantas durante lignificação intensa. Assim, eles propuseram um mecanismo no qual o nitrogênio liberado é reciclado localmente e incorporado na forma de glutamina através da enzima glutamina sintetase. A alteração da expressão da glutamina sintetase provavelmente se reflete na taxa de lignificação. Nas primeiras etapas da lignificação, grande quantidade de amônio é liberado a partir da desaminação de L-fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) e muito provavelmente esse amônio é reciclado pela glutamina sintetase, principal enzima da assimilação do amônio em plantas (CANTÓN et al., 2005). Já a glutamate desidrogenase é uma enzima mitocondrial capaz de incorporar amônio em 2-oxoglucurato, para formar glutamate, ou para funcionar na direção oposta oxidando glutamate (DUBOIS et al., 2003).

Em tecidos não fotossintetizantes, carboidratos são consumidos através da respiração para produzir energia e cadeias de carbono que são utilizadas no

metabolismo e na biossíntese da estrutura celular que inclui a síntese dos componentes da parede celular. A quantidade de  $O_2$  na região cambial é limitada pela barreira física que a casca exerce, e pelo consumo através da respiração. Dessa forma, parte da produção de energia provavelmente provém da fermentação alcoólica (KIMMERE; STRINGER, 1988). Assim, foram identificadas em múltiplos *spots* a *álcool desidrogenase*, possivelmente relacionadas a esse processo. Outros trabalhos mais recentes mostraram a presença de transcritos e proteínas da *álcool desidrogenase* durante a formação do xilema e crescimento secundário (CARVALHO et al., 2008; CELEDON et al., 2007; GION et al., 2005; RANIK et al., 2006).

A subcategoria *Metabolismo de carboidratos* engloba as proteínas envolvidas na glicólise e no metabolismo da sacarose. Exemplo de enzimas identificadas nesta categoria: glicose-6-fosfato 1-desidrogenase, frutoquinase, sacarose sintase, fosfoglicose isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enolase, ribulose bífosfato carboxilase (Rubisco), triosefosfato isomerase e UDP-glicose pirofosforilase.

Já a subcategoria *Metabolismo de pequenas moléculas*, foi representada pela *adenosina kinase (ADK)*, que possui a função de regular os níveis intracelulares de adenina e adenosina, e ainda especula-se a função na regulação da formação da madeira através do controle dos níveis de citocininas muito importantes na proliferação celular (KWADE et al., 2005). A reciclagem de adenosina nas regiões cambiais ocorre a partir da hidrólise de S-adenosil-L-homosisteína (*SAH*), subproduto das reações de metilação dependentes de S-adenosil-L-metionina. Caso, a adenosina não seja reciclada, a hidrólise de *SAH* é inibida, com isso ocorre um acúmulo de *SAH* e a utilização de metionina acaba sendo limitada pelo ciclo de reações (Figura 22) (MOFFAT et al., 2002).

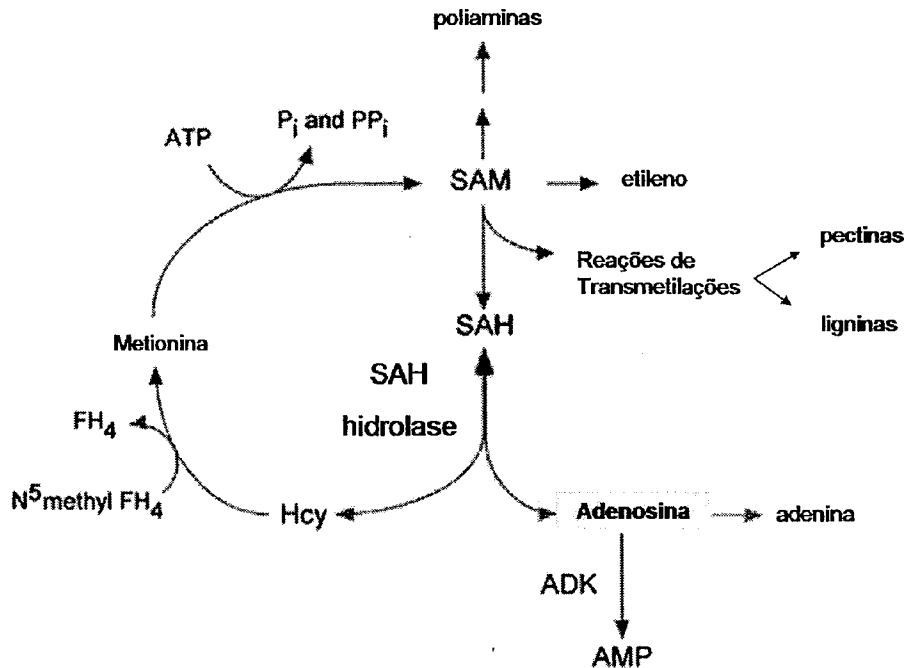


Figura 22 - Principais intermediários do ciclo de metilações via SAH. SAM é o principal doador de radicais metil para reações de transmetilações incluindo àquelas durante a síntese de pectinas, ligninas e metilações de DNA. SAM, S-adenosil-metionina; SAH, S-adenosil hidrolase; ADK, adenosina quinase; Hcy, homocisteína. Retirado de Moffat et al., 2002

Em relação à produção de energia para o metabolismo primário, muitas ATPases e ATPase vacuolares foram identificadas em múltiplos *spots*.

Na madeira de tração, a segunda maior categoria representada foi a de *Estrutura e Organização da Estrutura*, correspondendo a aproximadamente 20% das proteínas identificadas. Nessa categoria funcional estão proteínas relacionadas à organização do citoesqueleto e metabolismo da parede celular. Na subcategoria *Citoesqueleto* foram identificadas  $\beta$  e  $\alpha$  tubulinas e actina em vários *spots* o que está de acordo com resultados de Gion et al. (2005) estudando o xilema em desenvolvimento de *Pinus*. O citoesqueleto é formado por filamentos de actina e microtúbulos (tubulinas) e é responsável pela regulação da polaridade, morfologia e movimentação intracelular (vesículas, organelas). Os polissacarídeos da parede celular são sintetizados no complexo de Golgi e transportados através de vesículas ao local de destino. Essas vesículas são guiadas pelos microtúbulos do citoesqueleto (DELMER; STONE, 1988). Além dessas funções, o citoesqueleto atua na regulação da deposição ordenada de

microfibrilas de celulose na parede celular de células do xilema em desenvolvimento (ODA; HASEZAWA, 2006).

Na madeira oposta, as categorias *Vias de Informação* e *Processos Celulares* aparecem em segundo lugar de representatividade. A categoria *Vias de Informação* é representada principalmente pelas chaperoninas e pelas proteínas relacionadas à síntese e degradação de cadeias polipeptídicas e ácidos nucléicos (DNA e RNA). As chaperoninas exercem papel fundamental na conformação tridimensional das proteínas influenciando na determinação da especificidade e atividade das proteínas. Proteínas como *20S proteasome alpha 6 subunit* e *GBP16* envolvidas na proteólise foram identificadas. Já em relação ao metabolismo de DNA e RNA foram identificadas proteínas como *Aspartyl-tRNA synthetase*, *helicases* e *60s acidic ribosomal protein*. Fatores de alongação (*translation elongation factor EF-Tu*) da tradução de proteínas também estão incluídas nesta categoria. Quanto às proteínas relacionadas à via de degradação, como as *20S proteasome* identificadas neste trabalho, podem estar relacionadas à via de resposta a auxina. Segundo Gray e Stelle (2000), a regulação da via de resposta às auxinas depende da ação dos complexos proteasoma (ECKARDT et al., 2001). Como o metabolismo das auxinas é estimulado na madeira de tração (PAUX et al., 2005; HELLGREN et al., 2004), possivelmente o proteasome identificado nesse trabalho pode estar relacionado a esta via, apesar de estarem envolvidos em diversas vias regulatórias (SCHALLER, 2004).

A categoria *Processos Celulares* reúne as proteínas relacionadas à divisão e regulação celular e aos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. Proteínas ligadas à divisão e ao processo de crescimento celular como as proteínas *cell division FtsZ* e *cell division cycle 48* foram encontradas, visto que além de células xilemáticas em diferenciação, também coletou-se células meristemáticas em fase de divisão celular. Outra proteína importante identificada dentro dessa categoria foi a 14-3-3 que possui função importante na transdução de sinais através da ligação a outras proteínas sinalizadoras como quinases, fosfatases e receptores transmembrana (FU et al., 2000; FERL, 2004). No entanto, alguns trabalhos relatam que as 14-3-3 de plantas ligam-se a fatores de transcrição e outras proteínas sinalizadoras, agindo sobre a regulação do desenvolvimento e respostas a estresses (ROBERTS, 2003). Além

dessas proteínas, identificou-se a proteína *GTP binding*, reguladora da proteína G, e, portanto envolvida na regulação temporal e espacial de diversas funções específicas celulares (TAKAI et al., 2001). Proteínas com função de defesa contra estresses como *ascorbate peroxidase*, relacionada ao estresse oxidativo e a *Vicilin precursor* que é um peptídeo antimicrobiano de proteção contra patógenos (bactérias e fungos) também foram identificadas.

Com menor representatividade nos dois tipos de madeira, mas não menos importante, a categoria *Transporte* inclui as *Ran* e *Rab* que regulam diversas etapas do transporte membranar, incluindo a formação e movimento de vesículas ao longo das redes de actina e tubulinas. Dessa maneira, proteínas da superfície celular se movem do Golgi para a membrana plasmática permitindo também que sejam recicladas (STENMARK; OLKKONEN, 2001). Essas proteínas têm ganhado atenção dos pesquisadores que estudam o processo de formação da madeira uma vez que dentre as moléculas sintetizadas no Golgi e transportadas para a parede celular estão os polissacarídeos que a compõem (celulose, hemiceluloses, pectinas), além dos complexos protéicos envolvidos na biossíntese de celulose (ODA et al., 2005).

As proteínas identificadas nos bancos de dados como *hipotéticas* ou *unknown* foram agrupadas na categoria *Função não definida*.

Sob uma visão geral, observou-se que na madeira de tração a categoria *Estrutura e Organização da Estrutura*, destacou-se em relação à madeira oposta independente do tempo de indução (Figura 17). Isso se deve ao fato de que nesta categoria estão inseridas as proteínas relacionadas ao citoesqueleto, à síntese de polissacarídeos e lignificação. Esse resultado era esperado, já que na madeira de tração ocorrem diversas alterações estruturais e químicas na parede celular que não são observadas, pelo menos não com tanta intensidade, na madeira oposta. É importante lembrar que nessas categorias estão classificadas apenas as proteínas que apresentaram diferenças na expressão em relação aos controles. Portanto, os gráficos representam as alterações encontradas no perfil protéico devido à indução da formação da madeira de tração e oposta ao longo dos tempos de indução. Sendo assim, em geral, as proteínas representadas na categoria *Estrutura e Organização da Estrutura* sofreram alterações de expressão que não foram observadas na madeira oposta.

### 5.6.1.2 Proteínas identificadas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos da parede celular secundária

A síntese dos polissacarídeos que compõem a parede celular primária e secundária é realizada a partir do precursor comum UDP-D-glicose, o qual pode ser dirigido para a síntese de hemiceluloses e pectinas e para a síntese de celulose.

A parede celular secundária é caracterizada principalmente pela deposição padronizada de microfibrilas de celulose, para as quais o UDP-D glicose é o precursor. A principal via de produção deste substrato nas células da região cambial de *Eucalyptus grandis* parece ocorrer pela sacarose, através da sacarose sintase (SUSY), que foi identificada na madeira de tração (*spot* 1908) aos 15 dias de indução (T15) com expressão duas vezes maior que na madeira normal. Segundo Joshi et al. (2004), a sacarose sintase possui a importante função de direcionar UDP-glicose diretamente para as enzimas do complexo de celuloses sintases, evitando uma competição pelo *pool* celular de *UDP-glicose* e possibilitando, conseqüentemente, as elevadas taxas de síntese de celulose observadas durante o crescimento secundário. O gene SUSY foi altamente expresso durante a formação da madeira de tração de *Populus* (ANDERSON-GUNNERAS et al., 2006). Portanto, o aumento da quantidade dessa enzima na madeira de tração deve estar relacionado à biossíntese de celulose.

Como conseqüência da intensa atividade da SUSY, provendo UDP-glicose para a biossíntese de celulose, ocorre um acúmulo de frutose no citoplasma, o qual requer a ativação do metabolismo da frutose (Figura 23). Assim, a frutoquinase foi identificada na madeira de tração aos 15 (*spots* 1167 e 512) e 30 dias de indução (*spot* 512), sendo que o *spot* 512 na madeira de tração aos 15 dias possuiu expressão 4,7 vezes maior que no material controle, e após os 30 dias houve uma redução em relação ao controle ficando com expressão 1,5 vezes maior que o controle. Esses *spots* não foram detectados na madeira oposta. Na madeira de tração, transcritos do gene que codifica a frutoquinase foram um dos mais expressos em *Populus* (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006). Esses resultados estão de acordo com o modelo de partição do carbono durante a biossíntese de celulose proposto por Delmer e Haigler (2002).



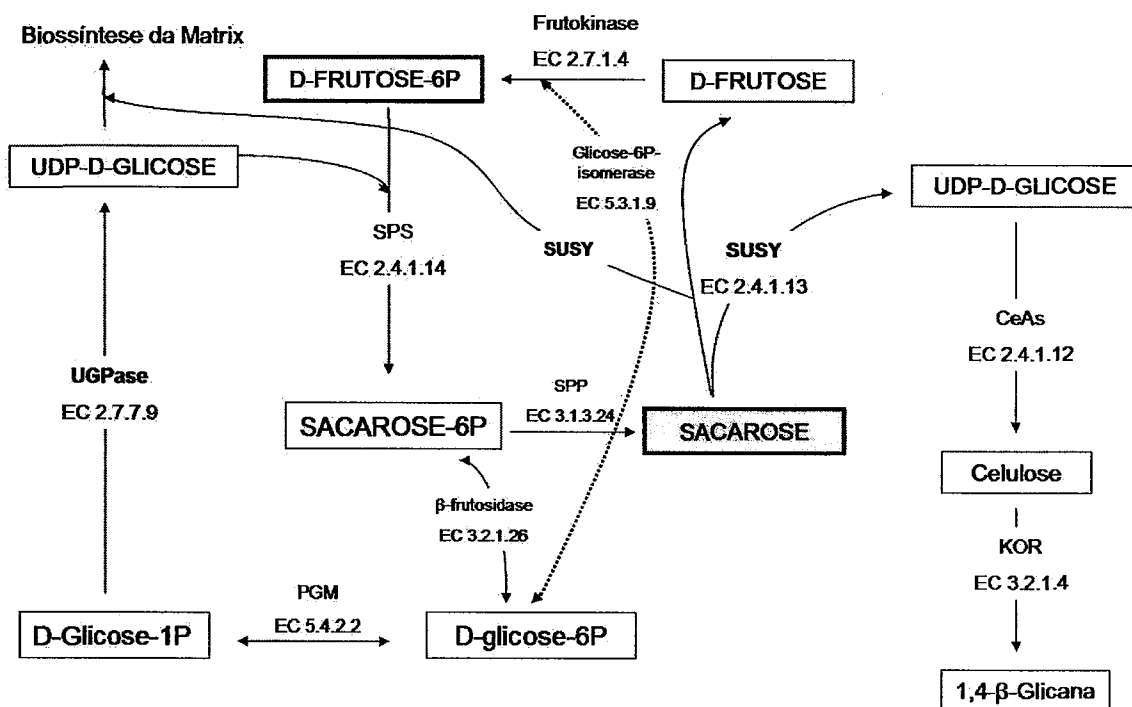


Figura 23 – Produção de UDP-glicose pela sacarose sintase (SUSY). UGPase, UDP-glicose-pirofosforilase; CeAs, celulose sintases; KOR, endoglicanases; PGM, fosfoglicomutase; SPS, sacarose fosfato sintase; SPP, sacarose fosfato fosfatase. Modificado de Andersson-Gunneras et al (2006)

O excesso de frutose-6-fosfato na madeira de tração está relacionado à regeneração de sacarose, enquanto que na madeira normal esse excesso deve ser direcionado à biossíntese de lignina, através das vias das pentoses e shikimato, além da biossíntese de hemicelulose. Na madeira de tração nenhuma das enzimas envolvidas no ciclo das pentoses ou na do shikimato foi identificada, já na madeira oposta a *transketolase* (*spot 19*) foi identificada como *spot* exclusivo, ou seja, ausente na madeira normal e presente na madeira oposta. A *transketolase* é uma enzima plastídica chave do ciclo das pentoses (Figura 24) no controle do fluxo de carboidratos para a via do shikimato. A supressão dessa enzima em Tabaco levou a efeitos drásticos no desenvolvimento e crescimento da planta, incluindo a supressão do metabolismo de fenilpropanóides e do processo de lignificação (HENKES et al., 2001). Essa proteína foi identificada apenas na madeira oposta. Em *Populus*, a *transketolase* teve sua expressão reduzida na madeira de tração (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006).

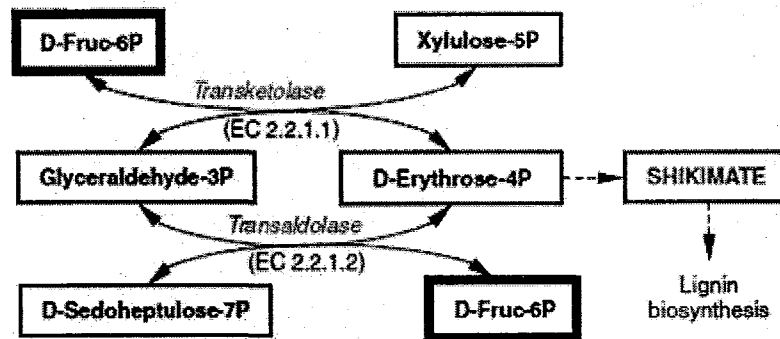


Figura 24– Ciclo das pentoses. Envolvimento da Transketolase na via do shikimate e conseqüentemente na biossíntese de lignina. Retirado de ANDRESSON-GUNNERAS et al. (2006)

O *pool* de UDP-glicose destinado à síntese de celulose e hemiceluloses é produzido pela UGPase (UDP-glicose-pirofosforilase) e pela *SUSY*. A UGPase também participa da regulação da reciclagem de sacarose no sistema. É através da produção de UDP-glicose pela UGPase que a sacarose fosfato sintase (SPS) produz sacarose 6-fosfato utilizada na regeneração de sacarose (Figura 23) A UGPase pode também estar envolvida na biossíntese de hemicelulose (ANDERSSON-GUNNERAS et al. 2006, DELMER; HAIGLER, 2002).

Na madeira de tração aos 15 dias de indução, essa enzima apresentou expressão diferencial em relação à madeira normal em dois *spots* (1758 e 2489 –Anexo N). Os dois *spots* identificados apresentaram um aumento de expressão (2x) em relação à madeira normal. Ambos os *spots* apresentaram homologia com uma seqüência de *Arabidopsis* (*At5g17310*) correspondente à UGPase2. Além desses *spots*, a UGPase2 também foi identificada em outro *spot* exclusivo presente na madeira de tração após os 15 dias de indução e ausente no controle. Essa mesma enzima também foi identificada após 30 dias de indução na madeira de tração mantendo o aumento de expressão em relação ao controle. A superexpressão da UGPase em *Populus* resultou no aumento do teor de celulose e diminuição de lignina (COLEMAN et al., 2007). Em outro trabalho, a UGPase2 aparece superexpressa na madeira de tração de *Populus*

(ANDRESSON-GUNNERAS et al., 2006). Esses resultados indicam que a UDP-glicose produzida deve estar sendo direcionada à síntese de celulose.

Recentemente Meng et al. (2009) caracterizaram a UGPase2 em *Arabidopsis* como sendo co-regulada a respostas a estresses, no entanto parece haver uma funcionalidade importante quando se têm altos níveis de celulose sintetizados (madeira de tração induzida) como os trabalhos citados acima apontam. Outro ponto importante, é que os experimentos de Meng et al. (2009) foram feitos com *Arabidopsis* que não é uma espécie arbórea não sendo a mais indicada para se estudar a formação de parede celular secundária, sendo que tais genes podem apresentar respostas diferentes em espécies diferentes.

Adicionalmente, foi identificada a UDP-glicose-6P-desidrogenase (UGDH), responsável pela biossíntese de hemicelulose e pectinas. Essa enzima apresentou redução de expressão após os 15 dias iniciais de indução da madeira de tração. Esse resultado corrobora com o encontrado sobre a UGPase, mostrando que realmente a UDP-glicose produzida pela UGPase deve estar sendo direcionada à biossíntese de celulose, já que a UGDH encontra-se reprimida na madeira de tração.

A UGDH identificada foi similar a uma seqüência (gi: 6164590) de *Populus* que é mais expressa, comparada às outras isoformas, durante a formação da parede celular secundária (JOHANSON et al., 2002). Portanto, a redução na expressão dessa enzima acarreta provavelmente a limitação da síntese de hemiceluloses e pectinas. A UGDH não possui expressão tão alta quanto às demais enzimas responsáveis por reações subseqüentes da mesma via metabólica. Por isso mesmo, sugere-se que a UGDH pode ser considerada como fator limitante na síntese dos polissacarídeos da matrix da parede celular (DALESSANDRO ; NORTHCOTE, 1977).

As enzimas acima, relacionadas ao metabolismo de carboidratos, não foram identificadas na madeira oposta. Provavelmente, essas enzimas não apresentaram diferenças significativas em relação ao material controle que permitissem a análise proteômica. Mesmo entre os *spots* exclusivos da madeira oposta aos 15 dias de indução, não houve identificação de proteínas envolvidas diretamente no metabolismo de carboidratos.

Apesar da identificação de várias enzimas relacionadas ao metabolismo de celulose na madeira de tração aos 15 e 30 dias de indução, na análise anatômica observou-se a presença da camada G apenas no material com 60 dias de indução. A expressão alterada dessas proteínas pode ser um indicativo da ocorrência de mudanças na parede celular que se tornam visíveis anatomicamente somente após 60 dias de indução. Provavelmente nesse período, a diferença entre a espessura da parede celular da madeira de tração e da madeira normal é maior, e por isso visível à microscopia óptica. Qiu et al. (2008), analisaram a madeira de tração de *Eucalyptus* e observaram poucas células com deposição da camada G, mas com alterações no teor de lignina e na orientação de microfibrilas de celulose. Esses pesquisadores concluíram que a camada G pode não ser essencial para o reforço da parede celular secundária durante a indução da madeira de tração. Porém, é importante lembrar que as diferenças entre as condições experimentais adotadas, como por exemplo a intensidade do estímulo aplicado (ângulo de inclinação) ou diâmetro do caule, podem influir na resposta metabólica. Assim, a presença maior ou menor de células com camada G pode ser reflexo das condições experimentais empregadas. Neste trabalho, sugere-se a ocorrência um incremento gradual da camada G na parede celular secundária, que passa ser visível apenas após 60 dias de indução.

### **5.6.1.3 Proteínas identificadas envolvidas na organização do citoesqueleto**

A deposição organizada da parede celular secundária é dirigida pelos microtúbulos, que determinam a direção das microfibrilas de celulose na parede celular. Assim, eles são os responsáveis não somente pela deposição das microfibrilas de celulose na forma de rosetas, mas também pelo ângulo que estas são depositadas, principalmente na camada S2 da parede celular secundária (FUNADA, 2000).

Foram identificadas  $\beta$  e  $\alpha$  -tubulinas e actinas que estão diretamente relacionadas aos microtúbulos. Essas proteínas foram identificadas na madeira de tração e oposta ao longo do tempo de indução. Nos primeiros 15 dias de indução, essas proteínas apresentaram redução de expressão tanto na madeira de tração como na madeira oposta, sugerindo uma inicial desorganização do citoesqueleto, podendo ser uma possível resposta ao estresse de indução. No entanto, detectou-se 2 spots

(689 e 1602) que estiveram presentes apenas na madeira de tração e ausente na madeira normal (controle). Esses *spots* codificam uma  $\beta$ -tubulina-1 de *Eucalyptus*. A presença dessa proteína em múltiplos *spots* se deve à sua grande importância no remodelamento da parede celular secundária, principalmente no que diz respeito à organização e deposição das microfibrilas de celulose. Spokevicius et al. (2007) mostraram que a  $\beta$ -tubulina-1 está envolvida na determinação da orientação das microfibrilas de celulose na parede celular secundária de madeira madura de eucalipto.

Aos 30 dias de indução,  $\alpha$ -tubulinas e actinas, foram identificadas com aumento de expressão, enquanto que no final dos 60 dias, as diferenças de expressão na madeira de tração e oposta não foram significativas em relação à madeira normal.

#### **5.6.1.4 Proteínas identificadas envolvidas na biossíntese de lignina**

Como já comentado, a madeira de tração apresenta reduzido teor de lignina (Timell, 1969). A síntese de lignina é feita através do direcionamento dos carboidratos para a via do shikimato e dos fenilpropanóides (BOERJAN et al., 2003).

Na análise proteômica, foram identificadas apenas enzimas relacionadas às vias específicas dos monolignóis nas reações subseqüentes que utilizam o Cafeil-CoA (Figura 25) e proteínas envolvidas no ciclo de metilações. Proteínas envolvidas nas etapas iniciais do metabolismo dos fenilpropanóides não foram identificadas.

Nos primeiros 15 dias de indução as enzimas S-adenosilmetionina sintetase (SAMS) e adenosilhomocisteinase responsáveis pelo fornecimento de grupos metil aos monolignóis durante o processo de biossíntese de lignina (Figura 25), apresentaram aumento de expressão na madeira de tração. Já na madeira oposta, apenas a SAMS foi identificada com menor expressão que o material controle.

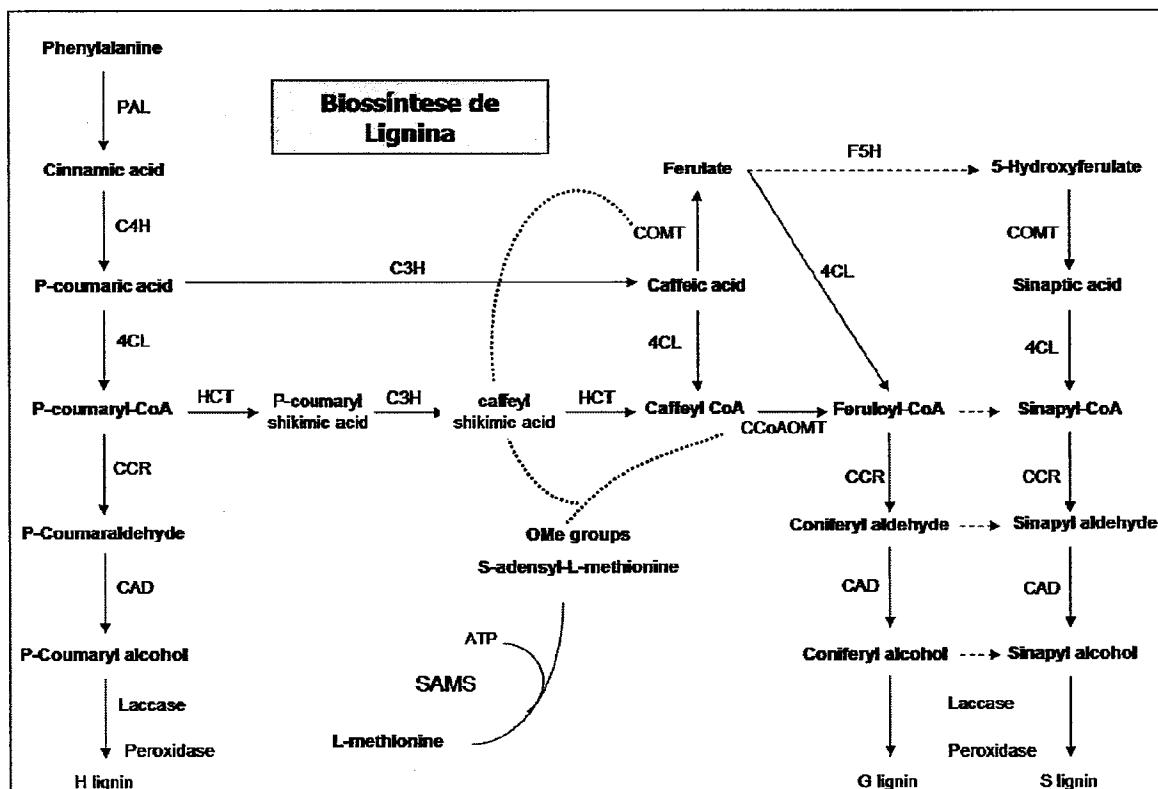


Figura 25 – Via de biossíntese da lignina. Retirado e modificado de CARVALHO et al. (2008)

De acordo com Cantón et al. (2005), SAMS atua no fornecimento de grupamentos metil para as enzimas Cafeil-CoA-O-metiltransferase (CCoAOMT) e Cafeil-3-O-metiltransferase (COMT). Assim sendo, apesar da elevada expressão das enzimas envolvidas no ciclo metil aos 15 dias de indução, as enzimas COMT e CCoAOMT encontram-se menos expressas na madeira de tração e também na madeira oposta em relação ao controle. Como observamos, nos momentos iniciais da indução da madeira de reação, se intensifica o ciclo metil (SAMS) e, ao mesmo tempo ocorre repressão da atividade das enzimas chaves específicas da síntese de monolignóis (COMT e CCoAOMT) a fim de regular a síntese de lignina. Outra proteína também envolvida no processo de lignificação, a Cinamil álcool desidrogenase (CAD), relacionada aos passos subsequentes à CCoAOMT e COMT, também reduziu significativamente sua expressão na madeira de tração aos 15 dias de indução, ocorrendo uma co-regulação dessas duas proteínas.

A proteína CCoAOMT identificada na madeira de tração (15 dias) com redução da expressão em relação ao controle (*spots* 661, 674 e 719; Anexo N), também foi detectada como *spot* exclusivo da madeira de tração (*spot* 3358). Todos esses *spots* apresentaram similaridade à CCoAOMT2 (gi:3023419) de *Eucalyptus gunii*. Essa isoforma é a principal das CCoAOMTs atuando durante o processo de lignificação em diversas espécies (RAES et al., 2003). Zhong et al. (2000) mostraram a importância da CCoAOMTs no processo de lignificação. Nesse trabalho, a redução da expressão dessas enzimas resultou na diminuição do teor de lignina do tecido. Na análise das proteínas exclusivas da madeira oposta, a enzima CCoAOMT2 (*Eucalyptus*) também foi detectada no *spot* 239.

Na madeira de tração, aos 30 dias de indução, ocorre um aumento transitório da expressão da CCoAOMT (*spot* 674, Anexo P) que ao final dos 60 dias encontra-se reprimida juntamente com a SAMS em relação ao controle. Acompanhando a expressão da CCoAOMT, a CAD também foi identificada com aumento de expressão na madeira de tração, havendo dessa maneira novamente uma co-regulação dessa proteína com uma proteína OMT (COMT e CCoAOMT).

Aos 60 dias de indução, a COMT (*spot* 460, Anexo R) e SAMS (*spots* 2310 e 1280 Anexo R) diminuíram sua expressão na madeira de tração. Os *spots* 2310 e 1280 (Anexo R), onde foi identificada a proteína SAMS, reduziram a expressão em aproximadamente 4 vezes em relação ao material controle. Na madeira oposta (Anexo S), a COMT (*spot* 501, Anexo S) apresentou expressão 5 vezes maior que o controle e, quase que 3 vezes menor na madeira de tração (*spot* 460, Anexo R) em relação ao controle. No entanto, as enzimas CAD (*spots* 490 e 1548, Anexo R) e peroxidase (*spot* 2176, Anexo R) foram mais expressas na madeira de tração quando comparadas ao controle. Esses resultados corroboram com os obtidos por Paux et al. (2005), onde a enzima COMT apresentou um aumento significativo na madeira oposta e diminuição na madeira de tração comparada ao controle.

A regulação do processo de biossíntese de lignina é bastante complexa, no entanto tem sido alvo de muitos estudos. Analisando o padrão de expressão de diversos genes envolvidos na lignificação da madeira de tração de *Eucalyptus*, Paux et al. (2005) observaram que a COMT e CCoAOMT estão sob os mesmos efeitos

regulatórios durante a formação da madeira de tração, indicando possivelmente uma co-regulação. Já os genes 4CL, CAD e CCR, foram agrupados em outro cluster com padrões de expressão similares durante a indução da madeira de tração. Nesse trabalho, os autores apontam para uma importância maior dada aos genes COMT e CCoAOMT na determinação do teor de lignina durante a formação da madeira. A COMT é provedora de unidades S de monolignóis, enquanto que a CCoAOMT é responsável pela síntese de unidades S e G de monolignóis. Sabendo-se que o balanço de unidades S e G está relacionado ao teor de lignina (PILATE et al., 2004), fica clara a importância dessas duas enzimas no processo.

De acordo com os resultados da proteômica empregada, verifica-se que ao longo do processo de formação de uma parede celular rica em celulose e pobre em lignina, os genes COMT, CCoAOMT e SAMS são essenciais. Observou-se que as proteínas COMT e SAMS apresentaram expressão reduzida na madeira de tração aos 60 dias. Esse resultado pode ser apoiado pela análise anatômica em que se observou grande quantidade de células xilemáticas com deposição da camada G (rica em celulose) na parede celular secundária.

No entanto, o conteúdo S/G de lignina entre os tipos de madeira não pode ser sugerido apenas com base nesta análise proteômica, visto que não foram submetidos à espectrometria de massas todos os *spots* detectados nesse experimento. Porém, pode-se dizer que a relação S/G provavelmente variou durante o longo período de indução visto que, a expressão de algumas proteínas alterou consideravelmente. Apesar das mudanças de expressão observadas, é indispensável a análise química desses materiais para a avaliação das alterações no teor de lignina Klason e solúvel.

#### **5.6.1.5 Proteínas identificadas não relacionadas diretamente com o metabolismo da parede celular**

Grande quantidade de *spots* associados à produção de energia e a outros processos inerentes ao tecido cambial, como a divisão celular, foram identificadas. Mesmo todas essas proteínas sendo incluídas nessa categoria, todas elas possuem importância na produção de precursores requeridos no processo de formação da madeira.



De maneira geral, as proteínas envolvidas na produção de energia, apresentaram redução de expressão na madeira de tração aos 15 dias de indução e aumento na madeira oposta. No entanto, ao longo do processo de indução a expressão dessas proteínas aumenta tanto na madeira de tração como na madeira oposta.

Observa-se, portanto, que provavelmente a geração e consumo de energia deve estar ocorrendo em maior intensidade na madeira oposta durante as etapas iniciais (15 dias) da indução da madeira de reação e por isso, a necessidade de maior quantidade dessas proteínas. É comum a modulação da expressão dessas proteínas em resposta ao estresse celular (KÜLTZ, 2005). A indução dessas enzimas durante o estresse pode ser útil para gerar equivalentes redutores (NADH, NADPH), que são necessários aos sistemas antioxidantes, como durante glicólise ou fotossíntese. A atividade da *enolase* é modulada em resposta a diversos tipos de estresses provocados pela seca, frio, sal e anaerobiose em diversas espécies de plantas (FUKAO et al., 2003; RICCARDI et al., 1998; MINHAS; GROVER, 1999; YAN et al., 2005). A expressão dessa enzima diminui em raízes de arroz expostas ao estresse salino, chegando a desaparecer após 72 horas de tratamento (YAN et al., 2005). De maneira contrária, em um estudo recente (PARK et al., 2009), o efeito de VOCs (*Volatile Organic Compounds*) como tolueno e formaldeído, provocaram o aumento da expressão de diversas enzimas, entre elas a enolase, envolvidas no metabolismo de carboidratos e na produção de energia. Tanto a proteína enolase (CELEDON et al., 2007), como seu transcrito (CARVALHO et al., 2008) foram identificados na região cambial da madeira juvenil de *Eucalyptus grandis*, sugerindo a necessidade dessa enzima em um tecido sob intensa atividade de divisão e diferenciação celular, como é o caso da madeira de reação. Já a enzima identificada como *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, também relacionada à glicólise, é uma enzima dependente de NAD<sup>+</sup> (HIGUCHI, 1997). Essa enzima foi encontrada no proteoma da região cambial de *Eucalyptus* (CELEDON et al., 2007) e em bibliotecas de xilema maduro e em desenvolvimento (PILATE et al., 2004; CARVALHO et al., 2008). Na biblioteca de xilema em desenvolvimento essa enzima foi 2,4 vezes mais expressa que no xilema maduro (PILATE et al., 2004). Na madeira de compressão de *Pinus taeda* (WHETTEN et al., 1998) e *Pinus pinaster* (PROVOST et al., 2003), os transcritos dessa enzima encontraram-se altamente expressos. Estas observações sugerem que o

aumento de expressão dessas proteínas, bem como no número de cópias de RNAm, deve estar relacionada à intensa atividade cambial dos tecidos amostrados, a qual demanda grande quantidade de energia.

A subunidade maior da *Rubisco* foi identificada na madeira de tração com diminuição na sua expressão aos 15 dias e posteriormente nos demais tempos de indução, foi identificada com aumento da sua expressão em relação ao controle. Subunidades maior e menor da *Rubisco* foram identificadas na região cambial de árvores de *Populus* com 4 anos de idade (JUAN et al., 2006), enquanto que somente a subunidade maior foi encontrada em *Eucalyptus* com idades de 6 meses, 3 e 6 anos, não ficando clara se essa enzima encontra-se completamente ativa nesse material (CELEDON et al., 2007), pois segundo Andrews et al. (1987) quando a subunidade menor está presente é que o sítio catalítico da subunidade maior encontra-se ativo. Além de vários *spots* identificando a subunidade maior da *Rubisco*, também foi identificada uma ativase de *Rubisco* na madeira de tração (*spot* 2298 ANEXO P e R)) sugerindo a presença da *Rubisco* ativa e a alta taxa de produção celular nesse tecido.

Proteínas envolvidas na divisão celular (proteínas Ftz), na transdução de sinais (14-3-3), degradação de proteínas (proteasoma 26S, carboxipeptidases), fatores de alongação da tradução, proteínas ribossomais, helicases, chaperonas, HSPs (*heat shock protein*), metabolismo de nitrogênio e de isoflavonóides, aumentaram a expressão em comparação à madeira normal, indicando mais uma vez a intensa atividade metabólica desses tecidos (tração e oposta).

### **5.7 PCR semi-quantitativo (PCRsq)**

Para complementar o estudo proteômico, genes responsáveis pela biossíntese de polissacarídeos e de lignina da parede celular foram escolhidos para a quantificação de seus transcritos (Tabela 5). A quantificação da expressão de genes relacionados à formação da camada G na madeira de tração, bem como genes ligados ao processo de lignificação foram escolhidos para validar os dados de expressão de proteínas identificadas, como também complementar o estudo sobre esse complexo processo que é a formação da madeira.

### 5.7.1 Escolha dos genes de referência

Baseando-se em resultados preliminares de comparação da expressão de genes através de PCRsq entre o tecido foliar e cambial (CARVALHO, 2007), verificou-se que os seguintes genes: ubiquitina (UB), isocitrato desidrogenase (ISO), piruvato quinase (PK) e  $\alpha$ -tubulina-2 (ATUB2), apresentaram as menores variações de expressão entre esses tecidos. Diante desses resultados, admitiu-se que esses genes apresentavam potencial para tornarem-se genes de referência.

Dessa forma, a expressão desses genes foram analisadas nos diferentes tratamentos (madeira de tração e oposta) e no controle, nos 3 tempos de indução.

Através do *software* Norm-finder, calculou-se o valor de estabilidade dos possíveis genes de referência. Esse *software* fornece um *ranking* de estabilidade, sendo que os menores valores correspondem aos genes mais estáveis. O gene com menor valor de estabilidade foi da proteína isocitrato desidrogenase com 0,20, seguido da  $\alpha$ -tubulina-2 com 0,6, e a ubiquitina com 0,7. O gene menos estável foi o que codifica a piruvato quinase que apresentou valor de estabilidade de 1,21 (Figura 26). Além disso, o *software* Norm-finder fornece a melhor combinação de dois genes, que no caso foi a combinação dos genes isocitrato desidrogenase e  $\alpha$ -tubulina-2, com valor de estabilidade 0,32.

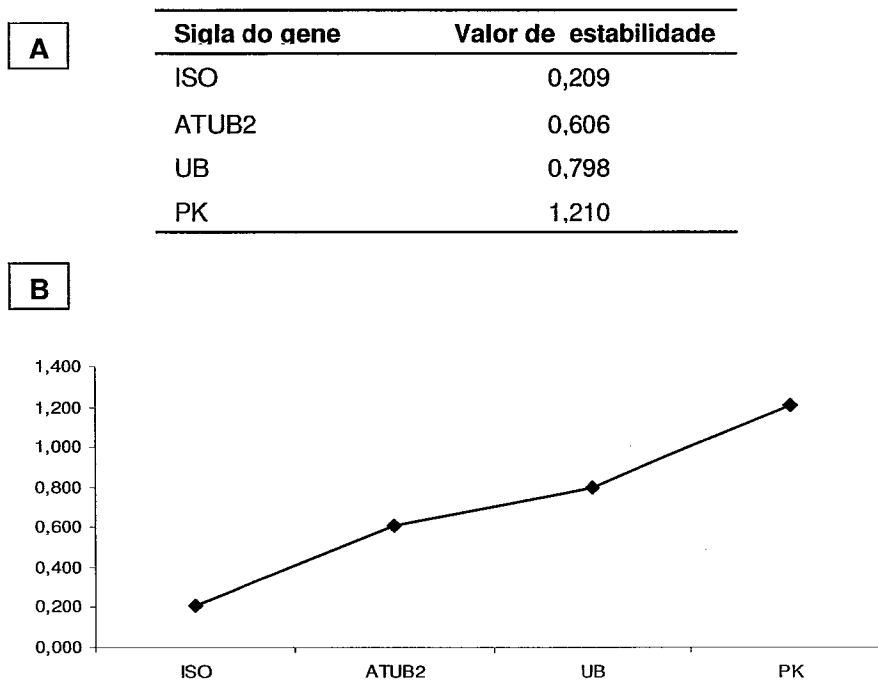


Figura 26 – Valores de estabilidade de expressão de genes com potencial para serem genes normalizadores de expressão obtidos através do software Norm-finder. A, tabela liberada pelo Norm-finder com os valores de estabilidade, B, valores de estabilidade plotados em gráfico. ISSO, isocitrato desidrogenase; ATUB2,  $\alpha$ -Tubulina-2; UB, ubiquitina; PK, piruvato quinase

A média geométrica da expressão dos dois genes escolhidos como melhor combinação (ISO e ATUB2) foi utilizada como fator de normalização. Assim, para a normalização de todos os dados de expressão, cada dado de expressão, obtido através do programa LinReg, foi dividido pelo fator de normalização calculado.

Tabela 5 – Genes analisados por PCRsq para a quantificação relativa na madeira de reação (tração e oposta) em relação à madeira normal

Gene	Símbolo	gi (NCBI)	Razão		Razão		Razão		Razão					
			T15/C15	O15/C15	T30/C30	O30/C30	T60/C60	O60/C60						
Cafeil O-metil transferase	COMT	437776	0,34	**	0,28	**	0,36	**	0,84	ns	3,38	**		
Cafeil-CoA O-metiltransferase	CCoAOMT	3319277	0,55	**	0,72	*	1,85	**	1,71	**	0,67	*	5,45	**
Fenilalanina amônia liase	PAL	5690432	0,09	**	0,30	**	0,80	ns	1,60	**	1,50	*	23,18	**
lacase	LAC	51555713	0,20	**	2,03	**	3,48	**	2,91	**	3,19	**	24,84	**
Cinamil-CoA Redutase	CCR	2058312	0,20	**	17,11	**	1,08	ns	4,30	**	2,97	**	350,39	**
Fator de transcrição MYB2	Myb2	39725412	1,36	ns	2,45	**	0,24	**	6,11	**	0,84	ns	23,04	**
Peroxidase	PEROX	88659653	7,02	**	33,53	**	8,78	**	6,59	**	28,61	**	1416,31	**
Celulose sintase 1	CesA1	67003906	7,46	**	2,90	**	38,15	**	8,12	**	3082,02	**	5,73	**
Celulose sintase 2	CesA2	67003908	9,28	**	2,09	**	15,89	**	1,00	ns	10,57	**	1,44	ns
Celulose sintase 3	CesA3	67003910	3,02	**	2,09	**	12,10	**	2,08	**	7,90	**	7,59	**
Celulose sintase 4	CesA4	67003912	0,05	**	0,29	**	2,66	**	1,17	ns	266,02	**	377,72	**
Celulose sintase 5	CesA5	67003914	0,10	**	0,18	**	1,09	ns	1,18	ns	9,59	**	29,09	**
Endo 1,4-glicanase	KOR	70779690	0,90	ns	0,17	**	27,64	**	1,34	*	12,54	**	1,88	*
Sacarose sintase	SUSY	80973755	4,89	**	0,15	**	3,73	**	1,26	*	2,65	**	0,82	ns
UDP-glicose pirofosforilase	UGPase	103475065	1,29	*	0,57	*	6,14	**	2,95	**	4,81	**	3,11	**
$\beta$ -Tubulina-1	$\beta$ -Tub1	103481142	0,34	**	0,44	**	17,11	**	0,07	**	4,57	**	1,37	ns
$\beta$ -Tubulina-2	$\beta$ -Tub2	103477591	0,55	**	0,70	**	2,14	**	0,49	**	10,57	**	1,21	ns
Actina-1	Act1	103479213	0,08	**	0,02	**	2,23	**	0,12	**	0,61	*	1,77	ns
Xiloglucana Endo-transglicosilase/hidrolase 3	XTH3	70779684	1,01	ns	0,40	**	6,58	**	0,07	**	45,60	**	8,17	**
Arabinogalactana FLA1	FLA	153799886	0,28	**	0,02	**	8,12	**	0,02	**	20,20	**	0,29	**
Poligalacturonase	Poly	103474979	0,97	ns	0,11	**	2,10	**	0,56	**	34,11	**	20,20	**
Pectinesterase	PE	32163864	1,37	*	0,48	**	12,13	**	0,42	**	12,53	**	1,51	**

Notas: Genes analisados através de PCRsq. Razões médias entre a expressão quantificada dos genes na madeira de reação (tração e oposta)

sobre a expressão dos mesmos genes na madeira normal. T15, T30 e T60: madeira de tração aos 15, 30 e 60 dias de indução. C15, C30 e

C60: madeira normal. O15, O30 e O60: madeira oposta aos 15, 30 e 60 dias de indução. Os asteriscos indicam genes diferencialmente

expressos em relação à madeira normal submetidos a ANOVA com  $P \leq 0,05$  - \*,  $P \leq 0,01$  - \*\*, ns: não significativo

### 5.7.2 PCRsq de genes envolvidos na biossíntese de celulose

A celulose é sintetizada na membrana plasmática pela expressão coordenada de diversas proteínas (SOMERVILLE, 2006; JOSHI; MANSFIELD, 2007). Essas proteínas estão arranjadas em complexos e utilizam como substrato o UDP-glicose para a elongação da cadeia de glicanas (DELMER, 1999; HOWLES et al., 2006).

As celulosas sintases (CesAs), envolvidas no processo de síntese de celulose, fazem parte do complexo tipo roseta localizado na membrana plasmática das plantas vasculares e de algumas algas (DELMER et al., 1999; TSEKOS et al., 1999). É neste complexo que as cadeias de glicanas são sintetizadas. Neste trabalho, foram analisadas celulosas sintases relacionadas à deposição da parede celular primária (EgCesA4 e EgCesA5) e também àquelas relacionadas à deposição da parede celular secundária (EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3).

A partir da quantificação da expressão de transcritos por PCRsq, verificou-se que tanto as celulosas sintases envolvidas na biossíntese da parede primária (EgCesA4 e EgCesA5), como as envolvidas na biossíntese da parede secundária (EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3), apresentaram diferenças significativas de expressão tanto na madeira de tração como na oposta, quando comparadas à madeira normal (controle) (Figura 27 e 28).

A EgCesA4 e a EgCesA5 apresentaram perfis de expressão parecidos ao longo do período de indução da madeira de reação (tração e oposta). Nos primeiros 15 dias de indução ocorreu uma redução significativa na expressão desses genes nos dois tipos de madeira (tração e oposta) em relação ao controle (Figura 27). Após 30 dias de indução, a expressão desses genes aumentou tanto na madeira de tração como na oposta, atingindo os mesmos níveis de expressão da madeira normal (controle), portanto sem apresentar diferenças significativas em relação a essa. A única exceção foi a expressão de EgCesA4 na madeira de tração que superou (2,6) a expressão na madeira normal (Tabela 5). Após os 60 dias de indução, a expressão desses genes continuou a aumentar nos dois tipos de madeira, atingindo níveis surpreendentes aos 60 dias de indução (Figura 27), o que indica que não somente a parede celular secundária sofre os efeitos da indução da formação da madeira de reação.

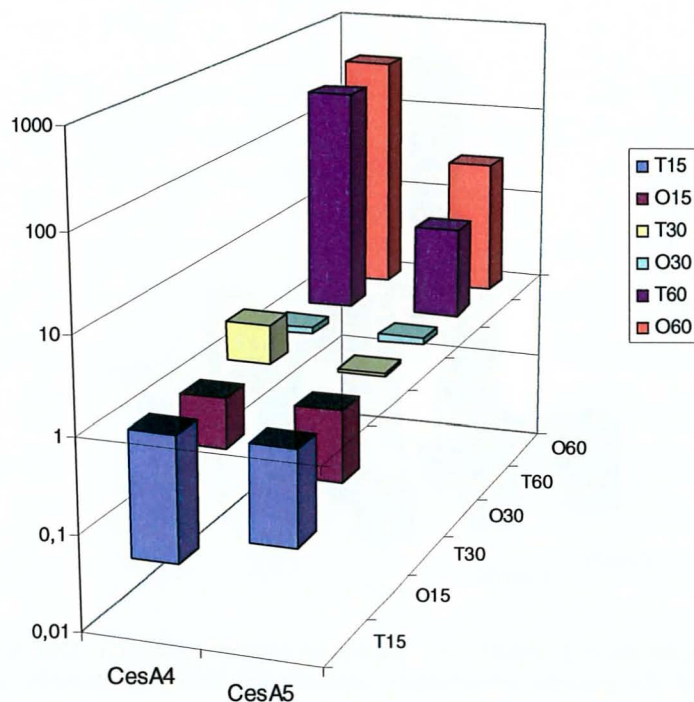


Figura 27 – Quantificação da expressão das celuloses sintases (CesA4 e CesA5) envolvidas na biossíntese da parede primária através de PCRsq. Valores expressos em relação à madeira normal. T, madeira de tração; O, madeira oposta. Tempos de indução da madeira de reação: 15, 30 e 60 dias

Já quanto às celuloses sintases relacionadas à síntese de parede secundária (EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3), essas apresentaram crescente expressão tanto na madeira de tração como na oposta em relação ao controle. Em geral, na madeira oposta, as celuloses sintases relacionadas à parede secundária mostraram menor expressão que na madeira de tração. Isso se deve à grande quantidade de celulose depositada na parede secundária (camada G) que a madeira de tração freqüentemente apresenta (Timell, 1986).

O comportamento da expressão desses genes durante a indução da madeira de reação foi parecido, sendo que o pico de expressão se deu aos 30 dias de indução (Figura 28), com exceção a EgCesA1 que atingiu níveis altíssimos de expressão aos 60 dias de indução na madeira de tração.



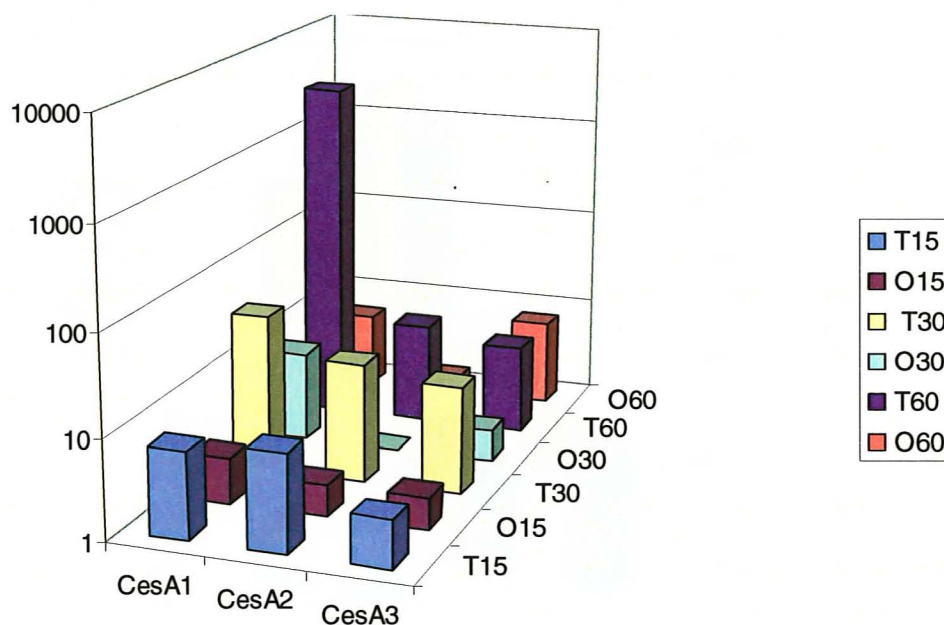


Figura 28 - Quantificação da expressão das celuloses sintases (CesA1, CesA2 e CesA3) envolvidas na biossíntese da parede secundária através de PCRsq. Valores expressos em relação à madeira normal. T, madeira de tração; O, madeira oposta. Tempos de indução da madeira de reação: 15, 30 e 60 dias

Esses resultados apontam para uma resposta imediata (aos 15 dias) ao estresse onde as celuloses sintases relacionadas à parede primária (EgCesA4 e EgCesA5) sofreram uma redução de expressão enquanto que as relacionadas à parede secundária (EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3) apresentaram resposta contrária, ou seja, aumentaram a expressão tanto na madeira de tração como na oposta. Essa resposta ocorre provavelmente devido à importância da parede secundária para o xilema em desenvolvimento sob o efeito do estresse gravitacional. De acordo com esses resultados, a resistência necessária para que não ocorra um colapso imediato nesse tecido é devido em grande parte à deposição da parede celular secundária, por isso um aumento considerável da expressão dos genes EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3 verificado ao longo de todo o período de indução.

Após, esse período de resistência e “adaptação” inicial (aos 15 dias) ao estresse gerado, a parede primária volta a ser sintetizada normalmente (aos 30 dias), quando EgCesA4 e a EgCesA5 atingem níveis similares de expressão aos encontrados no material controle. Ao final dos 60 dias de indução, os genes da parede primária aumentam sua expressão juntamente com os genes relacionados à parede secundária,



indicando a necessidade do tecido em manter o processo de biossíntese de celulose sob altas taxas tanto na parede primária como na parede secundária.

Em especial, o gene EgCesA1 apresentou um comportamento inigualável às demais CesAs (Figura 28). A expressão desse gene foi altíssima em relação ao controle aos 60 dias de indução. Curiosamente, foi nesse tempo de indução que visualizamos grande quantidade de fibras com camada G depositada na parede celular secundária. Esse é um indicativo de que a EgCesA1 é essencial para a formação dessa camada na madeira de tração. Carvalho et al. (2008) mostraram que esse gene é o mais expresso dentre os outros CesAs no xilema em desenvolvimento da madeira juvenil de *Eucalyptus*. Ou seja, tratando-se de um tecido sob intensa atividade e altas taxas de crescimento (madeira juvenil) esse gene se destacou na produção de parede secundária. Portanto, da mesma maneira, uma extraordinária atividade dessa isoforma se verifica frente à necessidade de se produzir uma parede celular resistente à força gravitacional. Paux et al. (2005) também detectaram aumento da expressão de EgCesA1 na madeira de tração de *Eucalyptus*.

Assim, o grande aumento de uma CesA específica possivelmente influencia o funcionamento dos complexos de celulose sintases nas células do xilema afetando a orientação da deposição de celulose, se a favor da parede primária ou secundária.

Apesar de serem observados aumentos consideráveis da expressão das CesAs desde os primeiros 15 dias de indução, a camada G só foi visualizada com 60 dias de indução, o que sugere que as modificações na madeira de tração que antecem o surgimento da camada G devem ser importantes para dar suporte à nova camada (G) que surge posteriormente e que gradualmente é depositada ao longo do tempo de indução.

Outra enzima extremamente importante na maquinaria de biossíntese de celulose é a KORRIGAN (KOR). Essa proteína está associada à membrana plasmática com atividade  $\beta$ -1,4-glicanase (PAREDEZ et al., 2006) e está provavelmente envolvida na remoção de cadeias de glicanas não cristalinas (MOLHOJ et al., 2002; SOMERVILLE, 2006). Sua atividade está relacionada à biossíntese de celulose na parede celular secundária (PENG et al., 2002).

Como está relacionada à parede celular secundária, e acompanhando os resultados obtidos de expressão das celulosas sintases (CesAs), a expressão da KOR foi também mais intensa na madeira de tração comparada ao controle e obteve seu pico de expressão aos 30 dias de indução (Figura 29). As diferenças de expressão entre a madeira de tração e a madeira oposta foram grandes, refletindo mais uma vez a necessidade da madeira de tração em manter a alta atividade da maquinaria biossintética e de celulose. Da mesma maneira, Bhandari et al. (2006) verificaram que a KOR responde à indução da madeira de reação, sendo sua expressão aumentada na madeira de tração e reprimida na madeira oposta. Além disso, verificaram que a KOR e as CesAs relacionadas ao desenvolvimento secundário apresentaram-se co-reguladas.

A sacarose sintase (SUSY) e a UDP-glicose pirofosforilase (UGPase2) apresentaram perfis de expressão similares nos dois tipos de madeira induzidos e estão de acordo com as proteínas identificadas. Tanto a SUSY como a UGPase apresentaram aumento crescente da expressão na madeira de tração e redução na madeira oposta. A SUSY atua principalmente no fornecimento do substrato UDP-glicose para a síntese de celulose (JOSHI et al., 2004). Já a UGPase, além da produção de UDP-glicose para a síntese dos componentes da matrix da parede celular, atua em uma importante via de reações para reciclagem de sacarose (KLECZKOWSKI et al., 1994).

Não diferente das demais enzimas analisadas e relacionadas à biossíntese de celulose, a SUSY e a UGPase mostraram-se sempre com maior expressão na madeira de tração (Figura 29). Da mesma maneira, na análise proteômica essas enzimas foram identificadas em *spots* que apresentaram aumento da expressão na madeira de tração. Esses resultados indicam a produção de um fluxo de UDP-glicose provavelmente para a produção de celulose, pois observa-se que na madeira oposta, geralmente com menor teor de celulose, a expressão dessas enzimas sempre foi menor que na madeira de tração.

Curiosamente, os níveis de expressão da SUSY na madeira de tração aos 60 dias de indução foram os mais baixos (ainda 2,6 vezes maior que na madeira normal) de todo o período de indução, justamente quando a diferença de expressão da EgCesA1 em relação ao controle foi máximo (Figura 29 e Tabela 5). Tal redução na expressão da SUSY foi acompanhada pelas demais CesAs relacionadas à parede

secundária, com exceção à EgCesA1. Indicando mais uma vez que a EgCesA1 deve ser essencial na produção da camada G (vizualizada neste período) sendo assim um ponto chave na regulação desse processo.

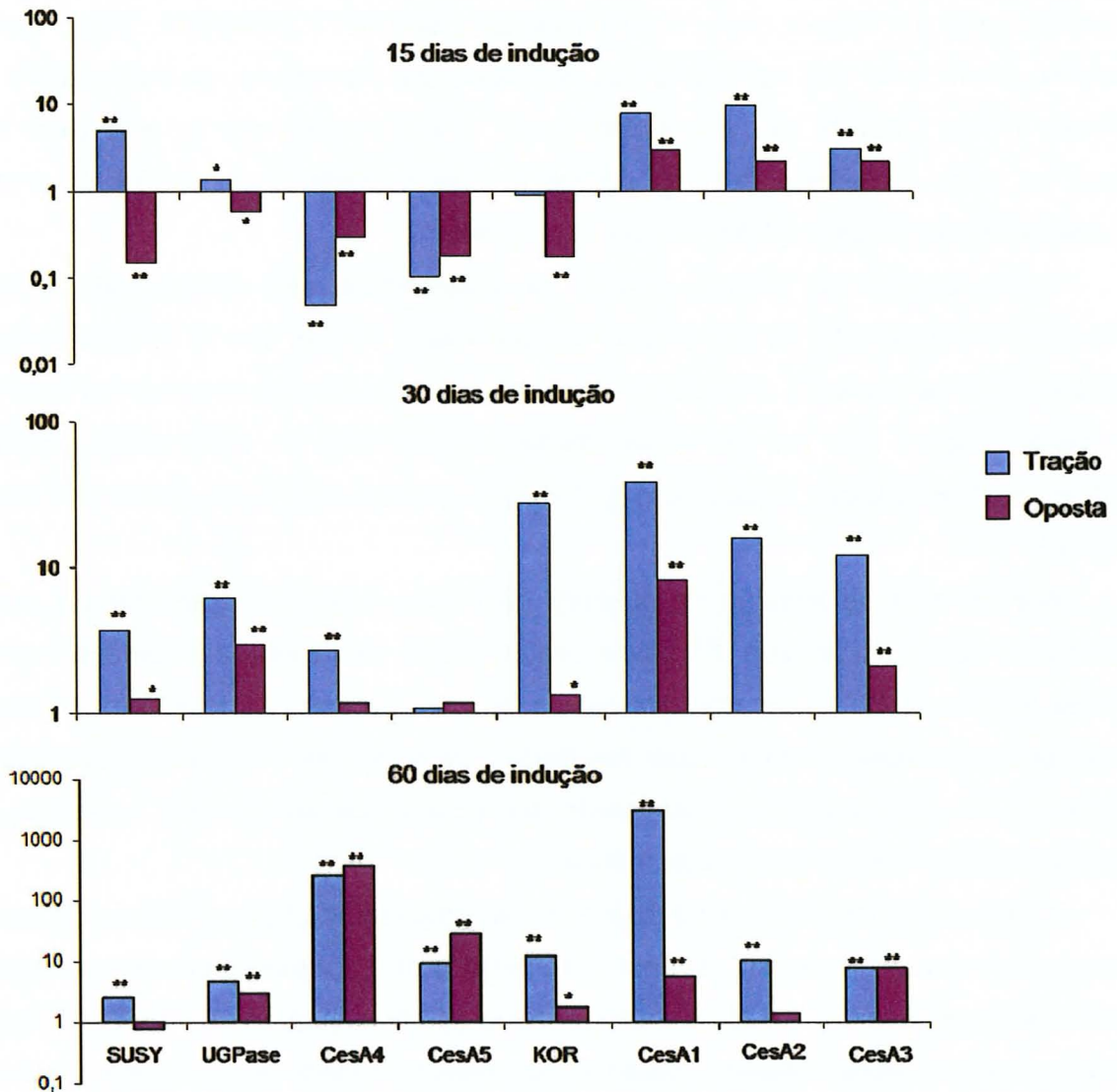


Figura 29 – Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes relacionados à biossíntese de celulose na madeira de tração e oposta por PCRsq. Valores expressos são relativos ao material controle. SUSY: Sacarose sintase; UGPase: UDP-glicose pirofosforilase, CesA4: Celulose sintase 4, CesA5: Celulose sintase 5, KOR: Endo 1,4-glicanase, CesA1: Celulose sintase 1, CesA2: Celulose sintase 2, CesA3: Celulose sintase 3. Os asteriscos indicam expressão diferencial em relação à madeira normal. ANOVA com  $P \leq 0,05$  \*,  $P \leq 0,01$  \*\*

O citoesqueleto também está associado na biossíntese de celulose. Está principalmente correlacionado à deposição ordenada das microfibrilas de celulose na

parede celular, bem como responsável pelo ângulo de deposição dessas microfibrilas. O ângulo com que as microfibrilas de celulose são arranjadas nas camadas da parede celular é que confere resistência e flexibilidade à mesma (PAREDEZ et al., 2006; CHAFFEY et al, 2000). Assim, quanto menor é o ângulo microfibrilar, maior é a rigidez, e quanto maior é o ângulo, maior é a flexibilidade (BARNETT; BONHAM, 2004). Dessa maneira, como uma das características principais da camada G, as microfibrilas de celulose nessa camada são arranjadas quase que paralelamente ao eixo axial das fibras, ou seja, conferindo extrema rigidez à essa camada e, conseqüentemente à parede celular secundária (WASHUSEN et al., 2005).

Os resultados de PCRsq obtidos se assemelham aos obtidos pela análise proteômica com redução da expressão das tubulinas e actinas aos 15 dias de indução nos dois tipos de madeira, seguido de aumento aos 30 e 60 dias somente na madeira de tração (Figura 30). Os genes escolhidos relacionados ao citoesqueleto para a análise por PCRsq foram:  $\beta$ -tubulina-1 ( $\beta$ -Tub1),  $\beta$ -tubulina-2 ( $\beta$ -Tub2) e actina-1 (Act-1) (Figura 30).

Aos 30 dias de indução da madeira de tração, a  $\beta$ -Tub1 apresentou a maior expressão, aproximadamente 17 vezes maior que a expressão na madeira normal (Tabela 5 e Figura 30). Enquanto que na madeira oposta essa expressão foi 14 vezes menor que na madeira normal. Esse resultado é apoiado pelos resultados das CesAs envolvidas no desenvolvimento da parede secundária que apresentam o máximo da expressão nesse mesmo período de indução.

Interessante notar também que apesar da expressão da EgCesA1 e da EgCesA3 serem altas na madeira oposta durante esse período (8 e 2 vezes maior que a madeira normal respectivamente), os genes relacionados ao citoesqueleto analisados ( $\beta$ -Tub1,  $\beta$ -Tub2 e Act-1) nesse mesmo material são baixos (Figura 30 e Tabela 5). Esse resultado indica que apesar de haver um aumento na síntese de celulose nesse período em relação ao controle (Figura 29), a organização das microfibrilas é feita possivelmente de forma diferente.

Aos 60 dias verificou-se aumento da expressão da  $\beta$ -Tub1 e da  $\beta$ -Tub2 em relação ao material controle (Figura 30). Nesse período detectou-se a camada G

formada, mostrando que as tubulinas devem estar associadas à organização das microfibrilas de celulose dessa camada.

Diversos trabalhos relatam a importância da  $\beta$ -Tub1 na determinação do ângulo microfibrilar de celulose na parede celular secundária (WASHUSEN et al., 2005; Spokevicius et al., 2007). Dentre esses trabalhos, Qiu et al. (2008) verificaram a importância desse gene na determinação do ângulo microfibrilar na madeira de tração de *Eucalyptus*. Nesse trabalho, esse gene foi mais expresso na madeira de tração e menos expresso na madeira oposta.

Portanto, a expressão dos genes relacionados ao citoesqueleto aqui analisados é modulada pelo estímulo da formação da madeira de reação e apresenta-se associado à formação da camada G.

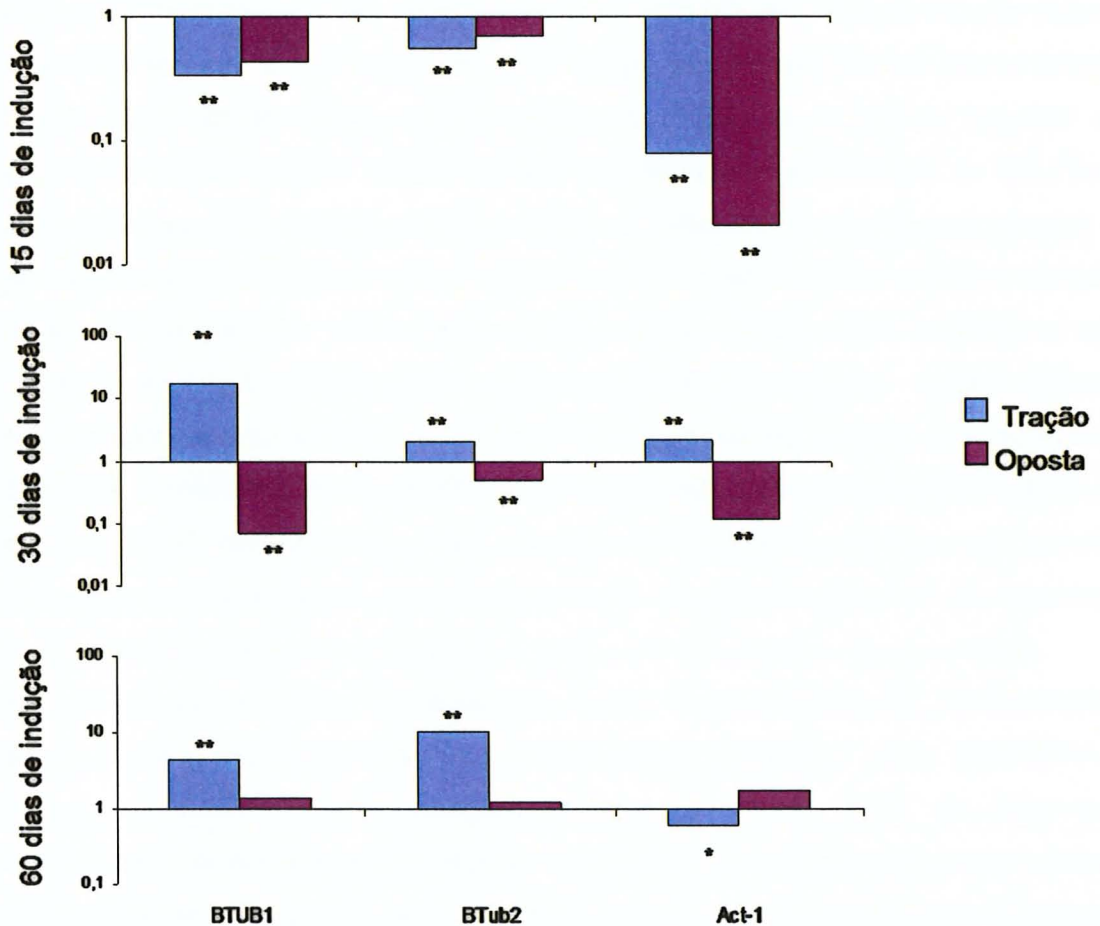


Figura 30 – Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes relacionados citoesqueleto na madeira de tração e oposta por PCRsq. Valores expressos são relativos ao material controle.  $\beta$ TUB1,  $\beta$ -tubulina-1;  $\beta$ Tub2,  $\beta$ -tubulina-2, Act1, actina-1. Os asteriscos indicam expressão diferencial em relação à madeira normal. ANOVA com  $P \leq 0,05$  \*,  $P \leq 0,01$  \*\*

### 5.7.3 PCRsq de outros genes envolvidos na modificação da parede celular e característicos da presença da camada G

Outro gene diferencialmente expresso avaliado na madeira de tração e oposta foi uma *fasciclin-like protein AGP* (EgrFLA1) homólogo à seqüência AtFLA12 de *Arabidopsis* pertencente ao subgrupo A (JOHNSON et al., 2003). As FLAs pertencentes a esse grupo foram já relatadas como intensamente expressas durante a síntese da parede celular secundária apesar de a real funcionalidade dessas proteínas não ter sido completamente desvendada (LAFARGUETTE et al., 2004; PILATE et al., 2004; ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006). Os membros do grupo AtFLA12 são induzidos durante a formação da madeira de tração (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006). Da mesma forma, no presente trabalho a expressão de EgrFLA1 sofreu crescente aumento a partir dos 30 dias de indução da madeira de tração. De maneira contrária, na madeira oposta houve severa redução da expressão comparada à madeira normal (Figura 31). No trabalho de Qiu et al. (2008) a alta expressão observada das FLAs (EgrFLA1 e EgrFLA2) na madeira de tração foi acompanhada pela alta expressão da  $\beta$ -tubulina-1. O mesmo ocorreu nesse trabalho, pois observou-se um aumento da expressão da  $\beta$ -tubulina-1 após os 30 dias de indução da madeira de tração. Esses resultados sugerem que a EgrFLA1 pode estar envolvida na orientação das microfibrilas de celulose na parede celular secundária. Recentemente, duas AGPs (FLA1 e FLA2) foram encontradas na análise proteômica da camada G isolada da parede celular secundária da madeira de tração de *Populus* (KAKU et al., 2009). Da mesma forma, aos 60 dias de indução, quando foi visualizada a presença da camada G nas fibras do xilema, a expressão de FLA1 foi máxima (20 vezes maior que na madeira normal) (Figura 31).

Avaliou-se a expressão de uma xiloglucana endo-transglicosilase (XTH3) anteriormente identificada como mais expressa na madeira juvenil de eucalipto (CARVALHO et al., 2008). Na madeira de tração verificou-se um gradual aumento da expressão da XTH3, enquanto que na madeira oposta verificou-se uma reação contrária com diminuição da expressão em relação à madeira normal (Figura 31). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Andersson-Gunneras et al. (2006) que observaram aumento da expressão das XTHs na madeira de tração de *Populus*. Mais recentemente, Kaku et al. (2009) identificaram XTHs através da análise proteômica da

camada G da madeira de tração de *Populus*. As XTHs são essenciais na incorporação de xiloglicanas na camada G (NISHIKUBO et al., 2007). São elas as responsáveis pelo reparo de redes de xiloglicanas que fazem a adesão entre as camadas G e S<sub>2</sub>. As microfibrilas de celulose da parede celular se contraem uniformemente durante a maturação, dessa forma a camada G irá se contrair de forma diferente das outras camadas, visto que possui ângulo microfibrilar diferente das demais camadas (PRODHAN et al., 1995). Assim, há a necessidade da atividade de enzimas (XTH) que fazem o reparo dessas conexões garantindo a integridade da parede celular (NISHIKUBO et al., 2007; MELLEROWICZ et al., 2008).

Logo, apesar das proteínas AGPs e XTHs estarem associadas à presença da camada G (NISHIKUBO et al., 2007; MELLEROWICZ et al., 2008; Kaku et al., 2009; DÉJARDIN et al., 2004), os níveis de expressão de seus transcritos foram altos já aos 30 dias de indução da madeira de tração, no entanto nesse período não verificou-se a presença da camada G. Porém, quando a camada G foi detectada (aos 60 dias) o nível de expressão desses transcritos foram muito superiores aos encontrados aos 30 dias de indução. Esse é mais um indicativo que essas proteínas estão associadas ao estabelecimento da camada G na parede celular secundária.



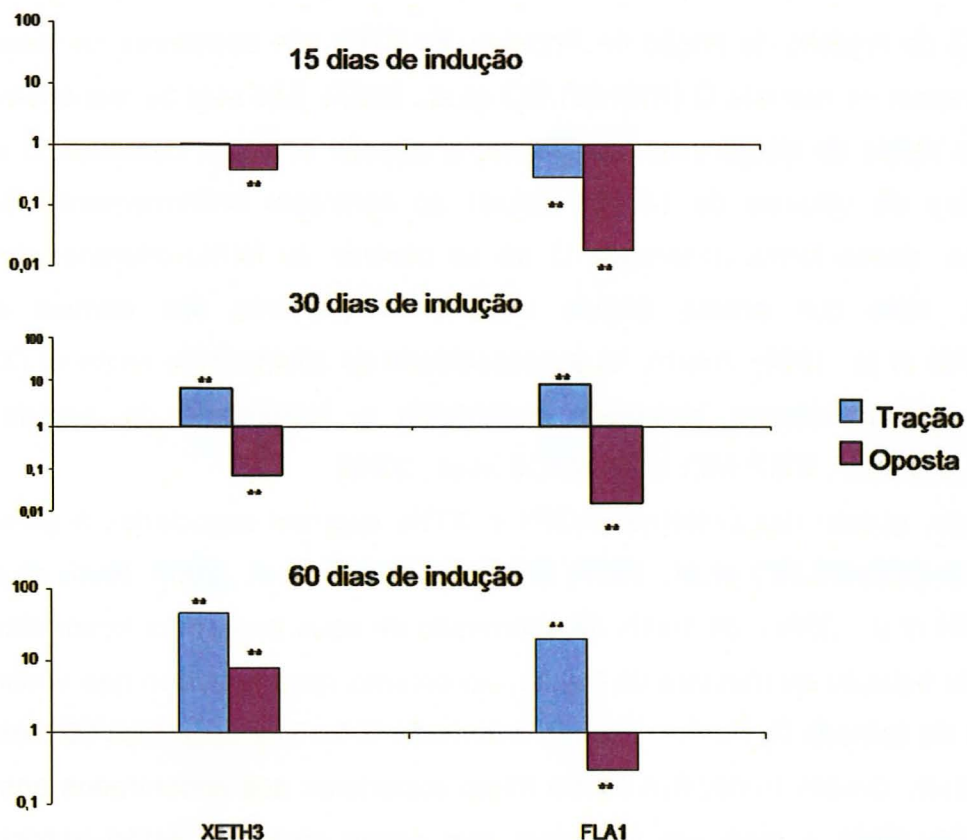


Figura 31 – Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes XETH3 (Xiloglicana Endo-transglicosilase/hidrolase 3) e AGP (Arabinoglectana FLA1) na madeira de tração e oposta por PCRsq. Valores expressos são relativos ao material controle.  $\beta$ TUB1,  $\beta$ -tubulina-1;  $\beta$ Tub2,  $\beta$ -tubulina-2, Act1, actina-1. Os asteriscos indicam expressão diferencial em relação à madeira normal. ANOVA com  $P \leq 0,05$  \*,  $P \leq 0,01$  \*\*

#### 5.7.4 PCRsq de genes envolvidos na degradação de pectinas

A pectinesterase (PE) e a poligalacturonase (POLY) são responsáveis pela degradação das pectinas e remodelamento da parede celular nos estágios de deposição da parede celular secundária e expansão celular (SIEDLECKA et al., 2008). A expressão desses genes portanto, está relacionada à transição entre a formação da parede celular primária para a formação da parede celular secundária (MELLEROWICZ; SUNDBERG, 2008).

O crescente aumento da expressão observado durante a indução da madeira de tração e a redução observada na madeira oposta (Figura 32) sugerem que menores mudanças na parede celular primária e/ou secundária ocorrem na madeira oposta, enquanto que na madeira de tração ocorre um intenso remodelamento da parede



celular. Como observado por Andersson-Gunneras et al. (2006) e Qiu et al. (2008) esses genes também apresentaram aumento de expressão na madeira de tração quando comparadas ao controle.

O aumento da expressão desses genes (POLY e PE) está associada ao intenso crescimento secundário durante a formação da madeira de tração (CARVALHO et al., 2008). Durante a síntese da parede celular secundária, genes relacionados à degradação de pectinas encontram-se altamente expressos juntamente aos genes envolvidos na síntese de celulose (GOU et al., 2007). A presença da camada G aos 60 dias é portanto, mais um indicativo dessa intensa deposição de parede celular secundária.

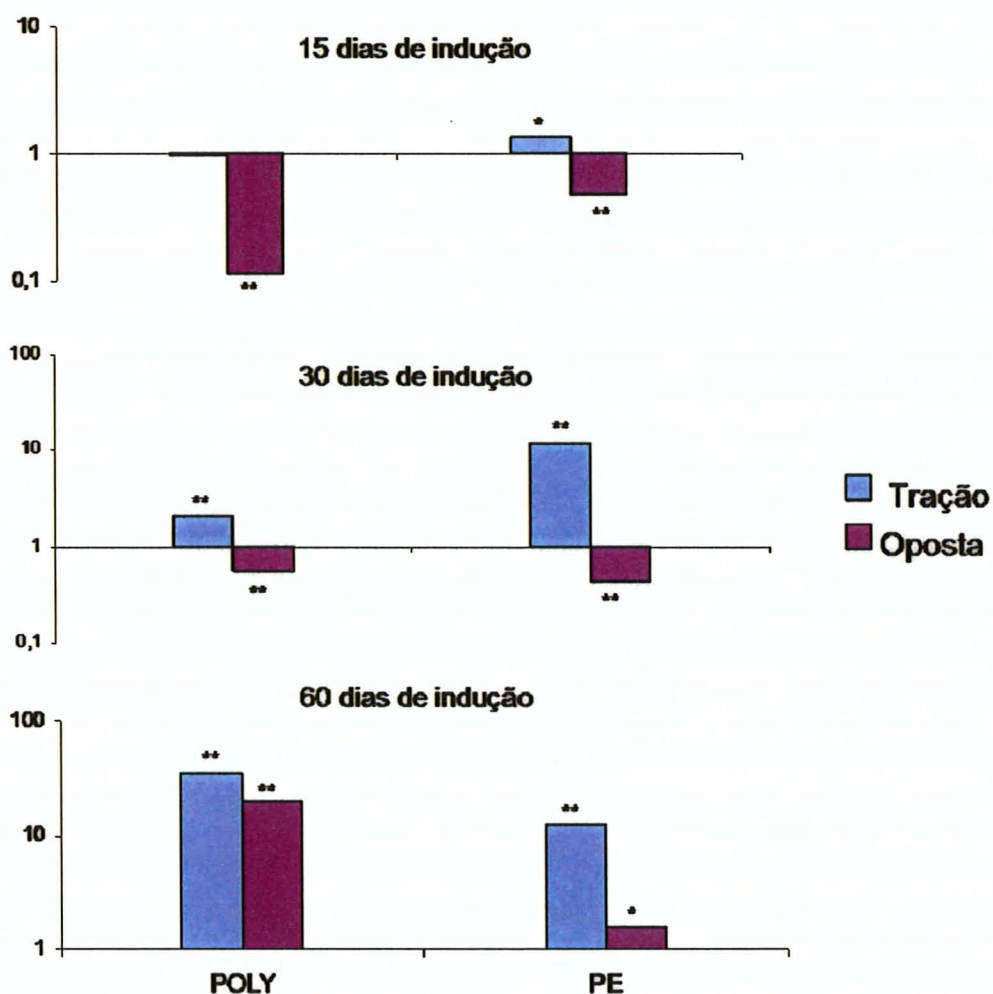


Figura 32 – Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes envolvidos na degradação de pectinas na madeira de tração e oposta por PCRsq. Valores expressos são relativos ao material controle. POLY, Poligalacturonase; PE, Pectinesterase. Os asteriscos indicam expressão diferencial em relação à madeira normal. ANOVA com  $P \leq 0,05$  \*,  $P \leq 0,01$  \*\*

### 5.7.5 PCRsq de genes envolvidos na biossíntese de lignina

O maior contraste da composição química da parede celular entre a madeira de tração e oposta está no aumento do teor de celulose na madeira de tração e aumento da lignina Klason (unidades G) na madeira oposta. A diferença entre esses dois tipos de madeira é um exemplo perfeito do redirecionamento do fluxo de carbono entre a biossíntese de celulose e lignina.

Nos primeiros dias de indução (15 dias), a maior parte dos genes envolvidos na lignificação testados foram reprimidos, o que indica que o fluxo de carbono deve estar a favor da biossíntese de celulose para a parede secundária já que os genes CesAs envolvidos nesse processo encontram-se mais expressos (Figura 29). Esse aparente direcionamento para a síntese de celulose ainda é verificado na madeira de tração aos 30 dias de indução, visto que a expressão dos genes envolvidos na síntese de celulose (Figura 29) (KOR, CesAs, SUSY, UGPase) encontram-se com níveis de expressões muito acima às verificadas nos genes envolvidos na lignificação (Figura 33).

Em geral os genes envolvidos na lignificação apresentaram maior expressão na madeira oposta durante o período de indução (Figura 33), como era de se esperar, pois essa madeira apresenta maior teor de lignina (Timell, 1986). Esse comportamento é um indicativo que na madeira oposta a preferência é dada à síntese de lignina ao invés de celulose.

Dessa maneira avaliou-se a expressão da fenilalanina amônia liase (PAL) envolvida nas etapas iniciais do processo de lignificação. Essa enzima apresentou crescente expressão na madeira oposta ao longo do tempo de indução, chegando a apresentar expressão 23 vezes maior que a madeira normal aos 60 dias (Figura 33). Já na madeira de tração, os níveis da PAL se reduziram drasticamente aos 15 dias e depois assumiram os níveis observados na madeira normal (Figura 33).

Os transcritos de genes associados às vias específicas de síntese de monolignóis, como COMT e CCoAOMT apresentaram expressão máxima aos 60 dias de indução, quando as diferenças entre a madeira de tração e oposta são maiores e visíveis na microscopia (camada G). Essas enzimas são consideradas pontos chaves de regulação da lignificação, já que são essenciais na determinação do teor de lignina e mais precisamente na razão S/G das unidades de lignina. Há uma correlação entre o

teor de lignina e a sua composição: alta concentração de unidades G está correlacionada a alto teor de lignina e, alta concentração de unidades S está ligada à baixo teor de lignina (PILATE et al., 2004). Assim, enquanto a COMT está essencialmente ligada à síntese de unidades S, a CCoAOMT produz tanto unidades S como G (PAUX et al., 2005).

Os resultados da quantificação de transcritos e os obtidos pela análise proteômica foram semelhantes e juntamente mostram que essas duas enzimas podem estar relacionadas ao teor de lignina na madeira de tração e oposta. Aos 60 dias de indução, na madeira de tração verifica-se redução na expressão de CCoAOMT (1,5 vezes) enquanto que os níveis de COMT são iguais aos encontrados na madeira normal, ou seja tem-se aqui a provável diminuição principalmente de unidades G de lignina. Apoiando os resultados obtidos, Joseleau et al. (2004) observaram a presença de unidades G e S na lignina encontrada na camada G da madeira de tração de *Populus* indicando que a pequena quantidade de lignina presente nessa camada possui uma relação S/G maior que na madeira normal.

Já na madeira oposta, ocorre aumento da expressão tanto da COMT como da CCoAOMT, sendo que o aumento da expressão CCoAOMT em relação ao controle foi superior à COMT (Figura 33). Esse resultado possivelmente deve estar relacionado a um maior teor de lignina na madeira oposta, com maior síntese tanto de unidades G como S. A importância da CCoAOMT na determinação do teor de lignina foi demonstrada através da superexpressão dessa enzima em *Populus* e tabaco onde verificaram o aumento considerável do teor de lignina e redução na razão S/G das unidades de lignina (ZHONG et al., 1998; ZHONG et al., 2000).

Outra enzima da via dos monolignóis associadas aos passos posteriores às OMTs, a cinamil CoA redutase (CCR), atua na síntese de unidades S, G e H de lignina (CARVALHO et al., 2008; RAES et al., 2003). Os transcritos dessa enzima apresentaram níveis de expressão superiores ao controle durante todo o período de indução na madeira oposta. Já na madeira de tração, a expressão desse gene foi reduzida em relação ao controle, indicando provavelmente também menor teor de lignina nessa madeira (Figura 33). A expressão de um gene que codifica a CCR,

também apresentou diminuição da expressão na madeira de tração de *Populus* (ANDERSSON-GUNNERAS et al., 2006).

Nas etapas finais da biossíntese de lignina, onde ocorre a polimerização dos monolignóis, as lacases e/ou peroxidases são as enzimas responsáveis por esse processo (BAUCHER et al. 2003). A expressão de ambos na madeira oposta foi alta como era de se esperar devido ao maior teor de lignina esperado nessa madeira. No entanto, curiosamente, essas mesmas proteínas apresentaram também alta expressão na madeira de tração aos 60 dias. Corroborando com esses dados obtidos, Andresson-Gunneras et al. (2006) verificaram que as peroxidases sofreram aumento de expressão e somente uma lacase (lac3) reduziu a expressão na madeira de tração. No entanto essa mesma lacase (lac3) não alterou o teor de lignina quando reprimida em *Populus* (RANOCHA et al, 2002). Kaku et al. (2009) na análise do proteoma da camada G de *Populus* identificaram diversas peroxidases nessa camada explicando os altos níveis de peroxidase na madeira de tração.

O gene *Myb2* de *Eucalyptus* codifica um fator de transcrição que promove a ativação de genes envolvidos na lignificação. Esse fator de transcrição se liga aos elementos AC ativando a transcrição dos genes envolvidos na biossíntese da lignina. São preferencialmente expressos no xilema em desenvolvimento (GOICOECHEA et al., 2005; BOMAL et al., 2008). No presente trabalho, a expressão do *Myb2* na madeira de tração foi menor ou igual a observada na madeira normal, enquanto que na madeira oposta ocorreu um aumento gradual atingindo ao final dos 60 dias expressão 23 vezes maior que a observada na madeira normal (Figura 33).

A participação desse fator de transcrição parece ser decisiva na lignificação já que a sua expressão é superior a de genes importantes como COMT e CCoAOMT (Figura 33). Aos 60 dias, por exemplo, a expressão de *Myb* é 26 vezes maior que o controle, enquanto que as expressões de COMT e CCoAOMT são apenas 3 e 5 vezes superiores à madeira normal (Tabela 5).

Esses resultados indicam que o *Myb2* deve estar ativando a expressão dos genes envolvidos na biossíntese da lignina na madeira oposta, visto que sua expressão é superior na madeira oposta (rica em lignina). No trabalho de Goicoechea et al. (2005) a superexpressão do gene em questão em plantas de Tabaco levou ao aumento da

expressão de genes relacionados a síntese de lignina, a alterações na estrutura da lignina e ao espessamento da parede celular secundária.

Em uma visão geral dos dados obtidos nesse trabalho, e levando-se em consideração os trabalhos produzidos nessa área, a resposta ao estímulo gravitacional em termos de síntese de lignina, se inicia com a redução da atividade dessa via com subsequente indução na madeira oposta e redução na madeira de tração, alcançando níveis finais que provavelmente determinam o teor de lignina em cada tecido.

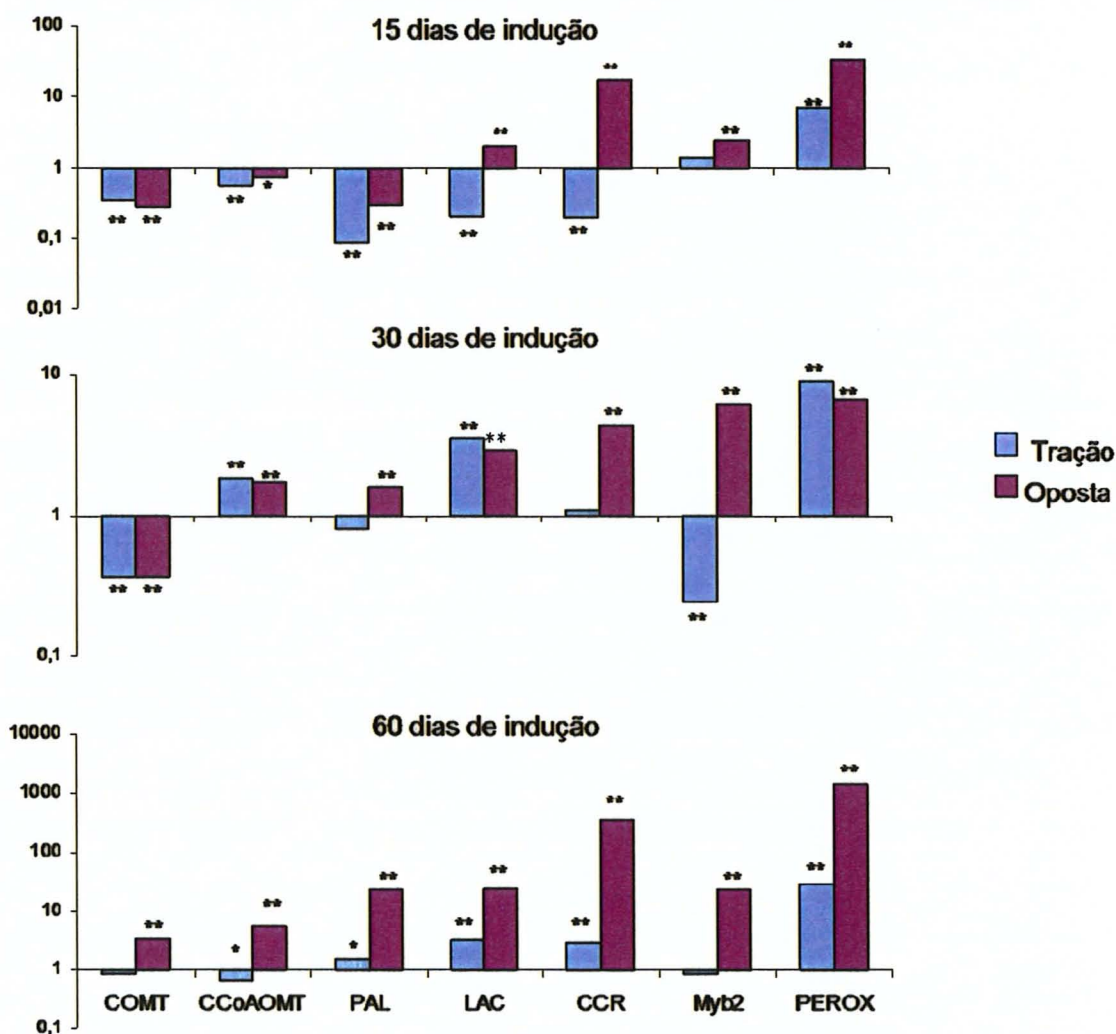


Figura 33 – Quantificação relativa dos níveis de expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina na madeira de tração e oposta por PCRsq. Valores expressos são relativos ao material controle. COMT, Cafeil O-metil transferase; CCoAOMT, Cafeil-CoA O-metiltransferase; PAL, Fenilalanina amônia liase LAC, CCR, Cinamil-CoA Redutase, Myb2, Fator de transcrição MYB2; PEROX, Peroxidase. Os asteriscos indicam expressão diferencial em relação à madeira normal. ANOVA com  $P \leq 0,05$  \*,  $P \leq 0,01$  \*\*



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da madeira de reação (tração e oposta) como modelo experimental para o estudo da formação da madeira mostrou-se bastante atraente, pois foi capaz de revelar a importância de genes envolvidos na biossíntese dos componentes da parede celular, e mais precisamente, na formação da camada G. Além disso, esse modelo experimental nos revela a plasticidade de toda a maquinaria de biossíntese da parede celular para acomodar uma situação anormal (inclinação das árvores) através da regulação do fluxo de carbono entre o metabolismo de celulose e lignina.

No presente trabalho, identificaram-se proteínas diferencialmente expressas durante a formação da madeira de reação (tração e oposta) em *Eucalyptus grandis*. Além disso, a quantificação dos transcritos de genes específicos através de PCRsq serviu para complementar esse estudo. Essas proteínas e genes estão relacionados à biossíntese de lignina, celulose e hemicelulose e, principalmente à deposição de uma camada extra na parede celular secundária rica em celulose (camada G). Além dos resultados de modificação da parede celular, a abordagem proteômica foi mais abrangente ressaltando vias metabólicas de reciclagem de nitrogênio, isoflavonóides e de produção de energia como a fermentação alcoólica atuando na região cambial dos materiais utilizados.

A deposição dessa camada rica em celulose é consequência de uma complexa alteração no fluxo do carbono para a formação dos vários componentes da parede celular. Essa alteração ocorre ao longo do processo de indução da madeira de tração fazendo com que as mudanças iniciais sejam essenciais para a construção de uma parede celular final (com camada G depositada) rígida que resista ao estado de tração das células sem que ocorra qualquer dano. Nesse sentido, a variação da expressão de proteínas e transcritos ao longo do período de indução foi verificada.

A quantificação da expressão de diversos genes através da análise proteômica e por PCRsq apresentaram semelhanças no sentido de que os resultados apresentados por ambas as técnicas seguiram a mesma tendência, ou seja, quando para um gene a proteína correspondente foi presente em altos níveis na análise proteômica, a quantificação dos transcritos do mesmo gene através do PCRsq mostrou-se elevada também. Isso sugere uma preferência pela regulação transcricional e/ou pós-

transcricional dos genes envolvidos na biossíntese dos componentes da parede celular. Além disso, a presença de diversas proteínas em múltiplos *spots* é um grande indicativo da presença de isoformas e da ocorrência de modificações pós-traducionais.

Observou-se que já nas etapas iniciais ocorrem mudanças na expressão de genes e proteínas responsáveis pelo fluxo do carbono para a celulose na madeira de tração como é o caso da SUSY, frutoquinase, CesAs e KOR. A biossíntese de celulose foi representada pela expressão surpreendente de uma celulose sintase (CesA1), conhecidamente envolvida na síntese de celulose para a parede celular secundária, sugerindo-se ser essencial no processo de deposição da camada G na parede celular secundária. Além disso, foram identificadas diversas proteínas relacionadas ao citoesqueleto mostrando a importância delas no remodelamento da parede celular. A elevada expressão dessas proteínas foi relacionada à deposição de microfibrilas de celulose na parede celular.

Na madeira oposta, a síntese de lignina destacou-se, visto que também proteínas em múltiplos *spots* foram identificadas representando o ciclo de metilações (SAMS, adenosilhomocisteinase), e proteínas chave na determinação do teor de lignina como COMT e CCoAOMT. Um fator de transcrição, associado à ativação dos genes de lignificação apresentou alta expressão indicando a intensa atividade do metabolismo de lignina.

Genes codificadores da pectinesterase e poligalacturonase foram altamente expressos na madeira de tração indicando a intensa alta taxa de crescimento dessa madeira. Além disso, arabinogalactanas e xiloglicanas endo-transglicosilases também foram avaliadas através de PCRsq e mostraram grande importância no estabelecimento da camada G.

Os resultados obtidos sugerem que aos 30 dias de indução, as diferenças químicas e anatômicas entre os dois tipos de madeira, tração e oposta, começam a ser mais evidentes, pois é nesse período que os genes escolhidos tornam-se inversamente expressos nos dois tipos de madeira, sendo que a madeira normal comporta-se como uma intermediária entre essas. Aos 60 dias, as diferenças são ainda maiores, sendo até mesmo possível visualizar a camada G na madeira de tração. A dinâmica das alterações ao longo do tempo da expressão de genes importantes para o metabolismo



de carboidratos e de lignina sugere uma mudança gradual nas características da madeira, mais especificamente na parede celular, que influenciam na constituição de uma parede celular secundária final caracterizada pela presença da camada G na madeira de tração.

Para a comprovação e complementação dos resultados obtidos até o momento, o próximo objetivo deste trabalho será a análise química, análise do comprimento de fibras e a análise do ângulo de deposição das microfibrilas de celulose nos materiais coletados. Dessa forma, será possível estabelecer associações entre a expressão gênica/proteínas, formação da parede celular, anatomia e composição química da madeira.

A análise conjunta de todos esses dados nos fornece um ponto de partida para a seleção de genes candidatos para a modificação dos componentes da parede celular. No entanto, este trabalho não deixa de ser apenas uma análise global de expressão e qualquer conclusão específica sobre a expressão de algum gene deve ser analisado com mais profundidade. Assim, esse trabalho serve de estímulo para novas análises funcionais de genes envolvidos no processo da formação da madeira.



## REFERÊNCIAS

- AKMA, P.; FUNADA, R.; OTHANI, J.; ABE, H.; FUKUZAWA, K. Orientation of microfibrils and microtubules in developing tension-wood fibers of Japanese ash (*Fraxinus mandshurica* var. *japonica*). **Planta**, Berlin, v. 196, p. 577- 585, 1995.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- ANDERSSON-GUNNERAS, S. **Wood formation and transcript analysis with focus on tension wood and ethylene biology**. 2005. 46p. (Doctoral Thesis). Faculty of Forest Science Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences. Umeå, 2005.
- ANDERSSON-GUNNERAS, S.; HELLGREN, S.; BIORKLUND, S.; REGAN, S.; MORITZ, T.; SUNDBERG, B. Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. **The Plant Journal**, Oxford, v.34, 339–349, 2003.
- ANDERSSON-GUNNERAS, S.; MELLEROWICZ, E. J.; LOVE, J.; SEGERMAN, B.; OHMIYA, Y.; COUTINHO, P. M; NILSSON, P.; HENRISSAT, B.; MORITZ, T.; SUNDBERG, B. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 144-165, 2006.
- ANDREWS, T. J.; LORIMER, G. H.; STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**, New York, v. 10, p. 131-218, 1987.
- ANTOSIEWICZ, D. M.; PURUGGANAN, M. M.; POLISENSKY, D. H.; BRAAM, J. Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, p. 1319-1328, 1997.
- ARIOLI, T.; PENG, L.; BETZNER, A. S.; BUM, J.; WITTKE, W.; HERTH, W.; CAMILLERI, C.; HÖFTE, H.; PLAZINSKI, J.; BIRCH, R.; CORK, A.; GLOVER, J.; REDMOND, J.; WILLIAMSON, R. E. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 279, n. 5351, p. 717-720, 1998.

BABA, K.; ASADA, T.; HAYASHI, T. Relation between developmental changes on anatomical structure and on protein pattern in differentiating xylem of tension wood. **Journal of Wood Science**, Kyoto, v. 46, n.1, p.1-7, 2000.

BAIROCH, A.; APWEILER, R.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; FERRO, B. B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L-S L. The universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. D193-D197, Jan., 2005.

BARNETT, J. R. Reactivation of the cambium in *Aesculus hippocastanum* L.: a transmission electron microscope study. **Annals of Botany**, Oxford, v. 7, p. 169-177, 1992.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; CONIL-PETIT, M.; BOERJAN, W. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 38, p. 305-350, 2003.

BAUMANN, M. J.; EKLÖF, J. M.; MICHEL, G.; KALLAS, A. M.; TEERI, T. T.; CZJZEK, M.; BRUMER, H. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v.19, p. 947-1963, June, 2007.

BHANDARI, S.; FUJINO, T.; THAMMANAGOWDA, S.; ZHANG, D.; XU, F.; JOSHI, C. P. Xylem-specific and tension stress-responsive coexpression of KORRIGAN endoglucanase and three secondary wall-associated cellulose synthase genes in aspen trees. **Journal Planta**, Berlin, v. 224, n. 4, p. 828-837, Sept., 2006

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 519-546, June, 2003.

BORNAL, J. C.; BEDON, F.; CARON, S.; MANSFIELD, S. D.; LEVASSEUR, C.; COOKE, J.; BLAIS, S.; TREMBLAY, L.; MORENCY, M-J.; PAVY, N.; GRIMA-PETTENATI, J.; SÉGUIN, A.; MACKAY, J. Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 14, p. 3925-3939, Sept., 2008.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, n.12, p. 576-81, Dec., 2003.

BOURQUIN, V.; NISHIKUBO, N.; ABE, H.; BRUMER, H.; DENMAN, S.; EKLUND, M.; CHRISTIERNIN, M.; TEERI, T.T.; SUNDBERG, B.; MELLEROWICZ, E.J. Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. **The Plant Cell**, v. 14, n. 12, p. 3073-3088, Dec., 2002.

BOWLING, A. J.; KEVIN, C. Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. **American Journal of Botany**, New York, v. 95, p. 655-663, 2008.

BRADFORD, M .M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Burnt Mill, v. 72, n. 7, p. 248-254, May, 1976.

BYLESJÖ M.; NILSSON R.; SRIVASTAVA V.; GRÖNLUND A.; JOHANSSON A. I; JANSSON S.; KARLSSON J.; MORITZ T.; WINGSLE G.; TRYGG J. Integrated analysis of transcript, protein and metabolite data to study lignin biosynthesis in hybrid aspen. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 8, n. 1, p. 199-210, 2008.

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

CANTÓN, F. R.; SUÁREZ, M. F.; CÁNOVAS, F. M. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 83, n. 2, p. 265-278, Feb., 2005.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants – consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v.3, n. 1, p.1-30, Jan., 1993.

CARVALHO, M.C.C.G. **Caracterização de perfis transcricionais de folhas e da região cambial de *Eucalyptus grandis* usando o SAGE**. 2006. 153p. Tese Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CARVALHO, M .C .C. G.; CALDAS, D. G; CARNEIRO, R. T.; MOON, D. H.; SALVATIERRA, G. R.; FRANCESCHINI, L. M.; DE ANDRADE, A.; CELEDON, P. A.; ODA, S.; LABATE, C. A. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, n. 6, p.905-919, June, 2008.

CATESSON, A. M.; ROLAND J. C. Sequential-changes associated with cell-wall formation and fusion in the vascular cambium. **Iawa Bulletin**, Leiden, v. 2, n. 4, p. 151-162, 1981.

CATESSON, A. M. Cambial cytology and biochemistry. In: IQBAL, M. **The vascular cambium**. Taunton: Research Studies Press, 1990. p. 63-112.

CELEDON, P. A. F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K. G. X.; CARVALHO, M. C. C. G.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; CARNEIRO, R. T.; FRANCASCHINI, L. M.; ODA, S.; LABATE, C. A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 13, p. 2258-2274, May, 2007.

CHAFFEY, N. BARLOW, P; BARNETT, J. Cortical microtubules rearrange during differentiation of vascular cambial derivatives, microfilaments do not. **Trees – Structure and Functions**, Berlin, v.11, n. 6, p. 333-341, June, 1997.

CHAFFEY, N. J. Microfibril orientation in wood cells: new angles on an old topic. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 360-362, 2000.

\_\_\_\_\_. Putting plant anatomy in its place. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 439-440, 2001.

CHEN, C. Y.; MEYERMANS, H., BURGGRAEVE, B.; DE RYCKE, R. M.; DE VLEESSCHAUWER, K.; STEENACKERS, M.; VAN MONTAGU, M. C.; ENGLER, G. J.; BOERIAN, W. A. (2000) Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 3, p. 853-867, July, 2000.

COLEMAN, H. D.; CANAM, T.; KANG, K. Y; ELLIS, D. D.; MANSFIELD, S. D. Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in hybrid poplar affects carbon allocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4257-4268, Oct., 2007.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, New York, v. 6, n.11, p. 850-861, Nov., 2005.

COSTA, P.; PIONNEAU, C.; BAUW, G., DUBOS, C.; BAHRMAN, N.; KREMER, A.; FRIGERIO, J-M.; PLOMION, C. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. In : Dunn M.J. **From Genome to Proteome**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p518-528

CRONSHAW J.; MOREY, P. R. induction of tension wood by 2,3,5 – triiodobenzoic Acid., P.R. **Nature**, New York, v. 205, n. 4973, p. 816, 1965.

\_\_\_\_\_. Effect of plant growth substances on development of tension wood in horizontally inclined stems of *Acer Rubrum* seedlings. **Protoplasma**, Leipzig, v. 65, n. 4, p. 379, 1968.

DAI, J.; CHEN, T. T.; CHONG, C. K.; XUE, Y. B. X.; LIU, S. Q.; WANG, T. Proteomic identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. **Molecular Cell Proteomics**, Washington, v. 6, p. 207-230, Nov., 2007.

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D. H. Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). **Planta**, Berlin, v. 134, n. 1, p. 39-44, Jan., 1977.

DÉJARDIN, A; LEPLÉ, J.C.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; COSTA, G.; PILATE, G. Expressed sequence tags from poplar wood tissues—a comparative analysis from multiple libraries. **Plant Biology**, Palo Alto, v. 6, n. 1, p. 55-64, Jan-Fev., 2004.

DELGADO, I. J.; WANG, Z.; DE ROCHER, A.; KEEGSTRA, K.; RAIKTHEL, N. V. Cloning and characterization of AtRGP1. A reversibly autoglycosylated Arabidopsis protein implicated in cell wall biosynthesis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, p. 1339-1350, 1998.

DEL CAMPILLO, E. Multiple Endo-1,4-beta-D-glucanase (cellulase) genes in *Arabidopsis*. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 46, p. 39, 1999.

DELMER, D. P.; HAIGLER, C.H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for C in plants. **Metabolic Engineering**, New York, v. 4, n. 1, p. 22-28, Jan., 2002.

DELMER, D. P.; STONE, B. A. Biosynthesis of cell walls. In: PREISS, J. (Ed.) **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. London: Hardcover, 1988, v. 14, p. 373-420.

DELMER, D. P. CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 245-276, June, 1999.

DENHARD, B.; FEUCHT, W. Formation of Reaction Wood of *Prunus-Avvium*. **Holzforschung**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 169, 1971.

DHUGGA, K. S.; BARREIRO, R.; WHITTEN, B.; STECCA, K.; HAZEBROEK, J.; RANDHAWA, G.S.; DOLAN, M.; KINNEY, A.J.; TOMES, D.; NICHOLS, S.; ANDERSON, P. Guar Seed  $\beta$ -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. **Science**, Washington, v. 303, n. 5656, p. 363-366, Jan., 2004

DOMINGO, C.; ROBERTS, K.; STACEY, N. J.; CONNERTON I., RUÍZ-TERAN, F.; McCANN, M.C. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. **The Plant Journal**, London, v. 13, n. 1, p. 17-28, Jan., 1998.

DONALDSON, L. A. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. **IAWA Bulletin**, Leiden, v. 13, n. 4, p. 381-387, 1992.

\_\_\_\_\_. Some ultrastructural aspects of lignin formation. **Abstracts of papers of the American Chemical Society**, Washington, v.219, p. U277-U277, Mar., 2000.

DONALDSON, L.A.; HAGUE, J.; SNELL, R. Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. **Holzforschung**, Berlin, v. 55, pp. 379–385, 2001.

DU, S.; YAMAMOTO, F. An overview of the biology of reaction wood formation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 49, n. 2, p. 131-143, Feb 2007.

DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALES-MORO, M-B.; ESTAVILLO, J-M., SANGWAN, R., GALLAIS, A., HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, Lancaster, v. 41, n. 6-7, p. 565-576, June, 2003.

ECKARDT, N. A. Auxin and the power of the proteasome in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2161-2163, Oct., 2001.

EMERY, J. F.; FLOYD, S. K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N. P.; IZHAKI, A.; BAUM, S. M.; BOWMAN, J. L. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, New York, v. 13, p. 1768-1774, 2003.

ERIKSSON, M. E.; ISRAELSSON, M.; OLSSON, O.; MORITZ, T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 784-788, 2000.



ESPER, J.; NIEDERER R.; BEBI, P.; FRANK, D. C. Climate signal age effects – evidence from young and old trees in the *Swiss Engadin*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3783-3789, 2008.

FARKAS, V., SULOVA, Z., STRATILOVA, E., HANNA, R.; MACLACHLAN, G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v. 298, p. 365–370, 1992.

FAUROBERT, M.; PELPOIR, E.; CHAÏB, J. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. **Plant Proteomics: Methods and Protocols**, Totowa, v. 355, p. 9-14, 2006.

FERL, R. J. 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 120, n. 2, p. 173-178, Feb., 2004.

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

FRY, S. C.; SMITH, R.C.; RENWICK, K. F; MARTIN, D.J; HODGE, S.K; MATTHEWS, K.J.. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-Loosening enzyme-activity from plants. **The Biochemical Journal**, London, v. 282, p. 821-828, Part 3, Mar., 1992.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 40, p. 617-647, 2000.

FUKAO, T.; KENNEDY, R. A.; YAMASUE, Y.; RUMPHO, M. E. Genetic and biochemical analysis of anaerobically induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1421-1429, 2003.

FUKUDA, M.; ISLAM, N., W. SH.; YAMAGISHIY, A.; TAKAOKA, M.; HIRANO, H. Assessing matrix assisted laser desorption/ ionization-time of flight-mass spectrometry as a means of rapid embryo protein identification in rice. **Electrophoresis**, New York, v. 24, p. 1319-1329, 2003.

FUNADA, R. Control of wood structure. In: NICK, P. **Plant microtubules: potential for biotechnology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2000, p. 51-81.

GEISLER-LEE, J.; GEISLER, M.; COUTINHO, P. M.; SEGERMAN, B.; NISHIKUBO, N.; TAKAHASHI, J.; ASPEBORG, H.; DJERBI, S.; MASTER, E.; ANDERSSON-GUNNERÁS, S.; SUNDBERG, B.; KARPINSKI, S.; TEERI, T. T.; KLECZKOWSKI, L. A.; HENRISSAT, B.; MELLEROWICZ, E. J. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analysis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, p. 946-962, Dec., 2006.

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

GODOVAC-ZIMMERMAN, J.; KLEINER, O.; BROWN L. R. DRUKIER, A.K. Perspectives in spicing up proteomics with splicing. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 3, p. 699-709, Feb., 2005.

GOICOECHEA, M.; LACOMBE, E.; LEGAY, S.; MIHALJEVIC, S.; RECH, P. ; JAUNEAU, A.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; VERHAEGEN, D. CHAUBET-GIGOT, N.; GRIMA-PETTENATI, J. *Eg MYB2*, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. **Plant Journal**, Oxford, v. 43, n.4, p. 553-567, July, 2005.

GOU, J-Y.; WANG, L.J.; CHEN, S-P.; HU, W-L.; CHEN, Y. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis. **Cell Research**, Beijing, v. 17, n. 5, p. 422-434, Mar., 2007.

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

GRAY, W. M.; ESTELLE, M. Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin-response. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 25, p. 133-138, 2000.

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

HARTMANN, F. **Statische Wuchsgesetz bei Nadel – und Laubbäumen**. Vienna: Springer-Verlag, 1942, 111 pp.

HELLGREN, J. M.; OLOFSSON, K.; SUNDBERG, B. Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, n. 1, p. 212-220, Feb., 2004.

HENKES, S.; SONNEWALD, U.; BADUR, R., FLACHMANN, R.; STITT, M. Small Decrease of plastid transketolase activity in antisense Tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 535-551, Mar., 2001.

HERTZBERG, M.; ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; ANDERSSON, A.; ERLANDSSON, R.; BLOMQVIST, K.; BHALERAO, R.; UHLÉN, M.; TEERI, T. T.; LUNDEBERG, J.; SUNDBERG, B.; NILSSON, P.; SANDBERG, G. A transcriptional roadmap to wood formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14732-14737, 2001.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Berlin: Springer Verlag, 1997. 353p. (Springer Series in Wood Science).

HONG-LI, J. D.; DE-QIANG, Z.; XIN-QIANG, WANG, M-J.; ZHANG, L. ; KE-MING, C.; MENG-ZHU, L. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 881-895, Dec., 2005.

HOWLES, P. A.; BIRCH, R. J.; COLLINGS, D. A.; GEBBIE L.K.; HURLEY U.A., HOCART C.H.; ARIOLI T.; WILLIAMSON R.E. A mutation in an Arabidopsis ribose 5-phosphate isomerase reduces cellulose synthesis and is rescued by exogenous uridine. **The Plant Journal**, London, v. 48, n. 4, p. 606-618, Nov., 2006.

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

HYODO, H.; YAMAKAWA, S.; TAKEDA, Y; TSUDUKI, M.; YOKOTA, A.; NISHITANI, K.; KONCHI, T. Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, XTH9, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 52, n. 2, p. 473-482, May., 2003.

JOHANSSON, H.; STERKY, F.; AMINI, B.; LUNDEBERG, J.; KLECZKOWSKI, L.A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1576, n.1, p. 53-58, June, 2002.

JOHNSON, L. K.; JONES, J. B.; BACIC, A.; SCHULTZ, C. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A Multigene family of putative cell adhesion molecules. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p.1911-1925, Aug., 2003.

JONES, A. M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, p. 94-97, 2001.

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

JORGE, I.; NAVARRO, R. M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C.; JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 222-234, 2005.

JOSELEAU, J-P.; IMAI, T.; KURODA, K. RUEL, K. Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoids*. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 2, p. 338-345, June, 2004.

JOSHI, C .P.; BHANDARI, S.; RANJAN, P.; KALLURI, U. C.; LIANG, X.; FUJINO, T.;SAMUGA, A. Genomics of cellulose biosynthesis in poplars. **The New Phytologist**, London, v.164, n. 1, p. 53-61, 2004.

JOSHI, C. P.; MANSFIELD, S. D. The cellulose paradox – Simple molecule, complex biosynthesis. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 10, p. 220-226, 2007.

JOUREZ, B. Le bois de tension: 1. Definition et distribution dans l'arbre. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Paris, v. 1, n. 2. p. 100-112, 1997.

JOUREZ, B.; RIBOUX, A.; LECLERCQ, A. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'ghoy'). **Iawa**, Leiden, v. 22, p. 133-157, 2001.

JUAN, D.; HONG-LI, X.; DE-QIANG, Z.; MIN-JIE, W.; YING-ZHANG, L.; KE-MING, C.; MENG-ZHU, L. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n.3, p. 881-895, Feb., 2006.

JUAREZ, M. T.; KUI, J. S.; THOMAS, J.; HELLER, G. A.; TIMMERMANS, M. C. P. MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. **Nature**, London, v. 428, p. 84-88, 2004.

KAKU, T.; SERADA, S.; BABA, K.; TANAKA, F.; HAYASHI, T. Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. **Journal of Wood Science**, Kyoto, v. 55, n. 4, p. 250-257, Aug., 2009.

KALLURI, U. C.; HURST, B. G.; LANKFORD, P. K.; RANJAN, P.; PELLETIER, A. D. Shotgun proteome profile of *Populus* developing xylem. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 21, p. 4871-4880, 2009.

KAO, Y. Y.; HARDING, S. A.; TSAI, C. J. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, n.2, p. 796-807, Oct., 2002.

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

KIMMEREE, T. W.; STRINGER, M. A. Alcohol dehydrogenase and ethanol in the stems of trees: evidence for anaerobic metabolism in the vascular cambium. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 87, n. 3, p. 693-697, July, 1988.

KLECZKOWSKI, L. A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1507-1515, 1994.

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

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

KWADE, Z.; SWIATEK, A.; AZMI, A.; GOOSSENS, A.; INZÉ, D.; VAN ONCKELEN, H.; ROEF, L. Identification of four adenosine kinase Isoforms in tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 17512-17519, Apr., 2005.

KWON, M.; BEDGAR, D. L.; PIASTUCH, W.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Induced compression wood formation in Douglas fir (*Pseudotsugamenziesii*) in microgravity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 847-857, 2001.

LACOMBE, E.; VAN DOORSSELAERE, J.; BOERJAN, W.; BOUDET, A. M.; GRIMAPETTENATI, J. Characterization of Ciselements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. **The Plant Journal**, London, v. 23, p. 663-676, 2000.

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

LAFARGUETTE, F.; LEPLÉ, J-C.; DÉJARDIN, A.; LAURANS, F.; COSTA, G.; LESAGE-DESCAUSES, M-C. PILATE, G. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. **New Phytologist**, London, v. 164, p. 107-121, Sept., 2004.

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

LEROUXEL, O. CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 9, p. 621-630, 2006.

LEV-YADUN, S.; SEDEROFF, R.; Pines as model gymnosperms to study evolution, wood formation and perennial growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, London, v. 19, p. 290-350, 2000.

LI, L. G.; LU, S. F.; CHIANG, V. A genomic and molecular view of wood formation. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, n. 3, p. 215-233, May, 2006.

LU, S.; ZHOU, Y.; LI, L.; CHIANG, V. L. Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in *Populus*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 7, p. 905-914, 2006.

LU, S. ; LI, L. ; YI, X.; JOSHI, C. P.; CHIANG, V.L. Differential expression of three eucalyptus secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59 n. 3, p. 681-695, 2008.

MARGA, F.; GRANDBOIS, M.; COSGROVE, D. J.; BASKIN, T. I. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. **The Plant Journal**, Oxford, v. 43, p. 181-190, 2005.

MASCOT. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>> Acesso em: 24 fev de 2008.

MATSUI, A.; YOKOYAMA, R.; SEKI, M.; ITO, T.; SHINOZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; KOMEDA, Y.; NISHITANI, K. *AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements. **The Plant Journal**, London, v. 42, p. 525-534, 2005.

MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **BioEssays**, Cambridge, v. 25, p. 930-939, 2003.

MAURIAT, M.; MORITZ, T. Analyses of GA20ox- and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. **Plant Journal**, Oxford, v. 58, p. 989-1003, 2009.

McCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Designing the deconstruction of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 314-320, 2008.

McCANN, M.C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C.W. **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. London: Academic Press, 1992. pp 109-129.

McCARTHY, R. L.; ZHONG, R. Q.; YE, Z.H. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. **Plants and Cell Physiology**, Rockville, v. 50, p. 1950-1964, 2009.

McQUEEN-MASON, S. J.; COSGROVE, D. J. Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress-relaxation, and binding. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, n. 1, p. 87-100, 1995.

MEGRAW, R. A. **Wood quality factors in loblolly pine**. Atlanta:TAPPI Press, 1985. 89 p.

MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p.293-300, June, 2008.

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

MENG, M.; GEISLER, M.; JOHANSSON, H.; HARNOLT, J.; SCHELLER, H. V.; MELLEROWICZ, J. E.; KLECZKOWSKI, L. A. UDP-glucose pyrophosphorylase is not rate-limiting, but is essential in *Arabidopsis*. **Plants and Cell Physiology Advanced**, New York, v. 50, n. 5, p. 998-1011, 2009.

MEYERMANS H, C.C.; BURGGRAEVE, B. DE RYCKE, R. M.; DE VLEESSCHAUWER, I. K.; STEENACKERS M. V.; VAN MONTAGU M. C.; ENGLER, G. J.; BOERJAN, W.A. Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 3, p. 853-867, 2000.

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

MINHAS, D.; GROVER, A. Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. **Plant Science**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 41-51. 1999.

MITSUDA, N.; IWASE, A.; YAMAMOTO, H.; YOSHIDA, M. SEKI, K. SHINOZAKI, K.; OHME-TAKAGI, M. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 70-280, 2007.

MOFFAT, B. A.; STEVENS, Y. Y.; ALLEN, M. S.; SNIDER, J. D.; PEREIRA, L. A.; TODOROVA, M. I.; SUMMERS, P. S.; WERETILNYK, E. A.; MARTIN-McCAFFREY, L.; WAGNER, C. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 812-821, 2002.

MOLHOJ, M.; PAGANT, S.; HÖFTE, H. Towards understanding the role of membrane-bound endo-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 43, p. 1399-1406, 2002.



MORRIS, C.R.; SCOTT, J.T.; CHANG, H.M.; SEDEROFF, R.R.; O'MALLEY, D.; KADLA, J.F. Metabolic profiling: a new tool in the study of wood formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1427-1434, 2003.

MOYLE, R.; SCHRADER, J.; STENBERG, A.; OLSSON, O.; SAXENA, S.; SANDBERG, G.; BHALERAO, R. P. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid Aspen. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 675-685, 2002.

NECESANY, V. Effect of indoleacetic acid on the formation of reaction wood. **Phyton**, Buenos Aires, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1958.

NELSON, N. D.; HILLIS, W. E. Ethylene and tension wood formation in *Eucalyptus gomphocephala*. **Wood Science Technology**, New York, v. 12, 309-315, 1978.

NILSSON, J.; KARLBERG, A.; ANTTI, H.; LOPEZ-VERNAZZA, M. ; MELLEROWICZ, E.; PERROT-RECHENMANN, C.; SANDBERG, G.; RISHIKESH, P. B. Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 843-855, 2008.

NISHIKUBO, N.; ENDO, S.; TAKAHASHI, J.; BANASIAK, A.; AWANO, T.; ANDERSON, A.; STALBRAND, H.; FUNADA, R.; PIENS, K.; BRUMER, H.; TEERI, T.T.; HAYASHI, T.; SUNDBERG, B.; MELLEROWICZ, E.J. Novel Functions of XETs in poplar wood development. In: Iufro-tree Biotechnology Meeting. Açores. **Anais..Açores: IUFRO**, 2007. Disponível em: <<http://www.itqb.unl.pt/iufro2007/>>. Acesso em: 30 jun. 2008.

NORBERG, P. H.; MEIER, H. Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibers of aspen (*Populus tremula* L.). **Holzforschung**, Berlin, v. 20, n. 6, p. 174-178, 1966.

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

ODA, Y.; MIMURA, T.; HASEZAWA, S. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. **Plant Physiology**, Lancaster, n. 137, p. 1027-1036, 2005.

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

OHMIYA, Y.; NAKAI, T.; PARK, Y. W.; AOYAMA, T.; OKA, A.; SAKAI, F.; HAYASHI, T. The role of PopCel1 and PopCel2 in poplar leaf growth and cellulose biosynthesis. **Plant Journal**, Oxford, v.33, n. 6, p.1087-1097, Mar., 2003

OHMIYA, Y.; SAMEJIMA, M.; SHIROISHI, M.; AMANO, Y.; KANDA, T., SAKAI, F.; HAYASHI, T. Evidence that endo-1,4--glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. **The Plant Journal**, London, v. 24, n. 2, p. 147-158, Oct., 2000.

ONAKA, F. Über die rotholzanordnung bei nadelbäumen. **Journal of Physical Society of Japan**, Tokyo, v. 17, p. 680-693, 1935.

PAIVA, J. A. P.; GARCÉS, M.; ALVES, A.; GARNIER-GERÉ, P.; RODRIGUES, J. C. ; LALANNE, C.; PORCON, S.; LE PROVOST, G.; PEREZ, D. S.; BRACH, J.; FRIGERIO, J.M.; CLAVERO, S.; BARRÉ, A.; FEVEREIRO, P.; PLOMION, C. Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood-forming tissue. **New Phytologist**, London, v. 178, n. 2, p. 283-301, Feb., 2008.

PAREDEZ, A.R., SOMERVILLE, C.R.; EHRHARDT, D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. **Science**, Washington, v. 312, 1491–1495, 2006.

PARK, M-A.; SEO, J.H.; PARK, J-S. Proteomic Identification of toxic volatile organic compoundresponsive proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 1603-1614, 2009.

PATZLAFF, A.; McINNIS, S.; COURTENAY, A.; SURMAN, C.; NEWMAN, L. J.; SMITH, C.; BEVAN, M. W.; MANSFIELD, S.; WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R.; CAMPBELL, M. M. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. **The Plant Journal**, London, v. 36, p. 743-754, 2003.

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

PAUX, E.; CAROCHA, V.; MARQUES, C.; DE SOUSA, A. M.; BORRALHO, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. **New Phytologist**, London, v. 167, n. 1, p. 89-100, July, 2005.

PENG, L.; KAWAGOE, Y.; HOGAN, P.; DELMER, D. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. **Science**, Washington, v. 295, n. 5552, p. 147-150, 2002.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. Proteomics: from protein sequence to function. In: TWYMAN, R.M. **Principles of proteomics**. New York: Springer-Verlag e BIOS Scientific Publishers, 2001. v. 1, chap 1, p. 1-21.

PEREIRA, L. A. R.; SCHOOR, F.; DUPREE, P. G.; MOFFAT, B. A. Deficiency of adenosine kinase activity affects the degree of pectin methyl-esterification in cell walls of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 1401-1414, 2006.

PERKINS, D N; PAPPIN, D.J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identifications by searching sequence using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

PERRIN, R., WILKERSON, C. AND KEEGSTRA, K. Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic era. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 47, p. 115–130, 2001.

PESQUET, E.; RANOCHA, P.; LEGACY, S., DIGONNET, C.; BARBIER, O.; PICHON, M.; GOFFNER, D. Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 1821-1839, 2005.

PIENS, K.; HENRIKSSON, A. M.; GULLFOT, F. LOPEZ; M. FAURÉ, R.; IBATULLIN, F.M.; TEERI, T. T.; DRIGUEZ, H.; BRUMER, H. Glycosynthase activity of hybrid aspen xyloglucan endo-transglycosylase PttXET16-34 nucleophile mutants. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 5, p. 3971-3978, 2007.

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

PLOMION. C.; LEPROVOST. C.; STOKES. A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, n. 4, p. 15 13-1523, Dec., 2001.

- PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BALLIÈRES, H. Analysis of protein expression along the normal to tension wood gradient in *Eucalyptus gunnii*. **Holzforschung**, Berlin, v.57, n. 4, p. 353-358, June, 2003.
- PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BRACH, J.; COSTA, P.; BAILLÈRES, H. Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster Ait.*). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, p. 959-969, 2000.
- PLOMION, C., LALANNE, C.; CLAVEROL, S.; MEDDOUR, H; KOHLER, A.; BOGEAT-TRIBOULOT, M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 24, p. 6509–6527, Dec., 2006.
- PROVOST, G. L.; PAIVA, J.; BRACH, P. D.; PLOMION, C. Seasonal variation in transcript accumulation in wood forming tissues of maritime pine (*Pinus pinaster Ait.*) with emphasis on a cell wall glycine rich protein. **Planta**, Berlin, v. 21, p. 820-830, 2003.
- QIU D, W.; WASHUSEN, G. S.; MORAN G. F. R.; SOUTHERTON, S. G. **New Phytologist**, London, v. 179, n. 1, p. 94-103, 2008.
- RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J. H.; VAN DER PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Nov., 2003.
- RAMARKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPPEZ, R. H. L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosciences Letters**, London, v. 339, p. 62-66, 2003.
- RANIK, M.; MYBURG, A. A. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, n. 5, p. 545-556, May, 2006.
- RANOCHA, P.; CHABANNES, M.; CHAMAYOU, S.; DANOUN, S.; JANEAU, A.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiologist**, Lancaster, v.129, p. 145-155, 2002.
- REDGWELL, R. J.; FRY, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening (implications for fruit softening). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 103, n. 4, p. 1399-1406, Dec., 1993.

REITER, W. D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 536-542, 2002.

\_\_\_\_\_. Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. **Current opinion in plant biology**, London, v. 11, n. 3, p. 236-243, 2008.

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

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DE VIENNE, D; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize – quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 117, p. 1253-1263, Aug., 1998

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

ROBERTS, M. R. 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signaling. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, p. 218-223, 2003.

ROGERS, L.A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, London, v. 164, p.17–30, 2004.

SABLOWSKI, R. W.; MOYANO, E.; CULIANEZ-MACIA, F. A.; SCHUCH, W.; MARTIN, C.; BEVAN, M. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. **EMBO Journal**, Oxford, v. 13, p. 128-137, 1994.

SALADIE, M.; ROSE, J. K. C.; COSGROVE, D. J. CATALÁ, C. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, p. 282-295, July, 2006.

SAMBROOK, J. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. In: FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 12p.

SAMUELS, A. L.; KANEDA, M.; RENSING, M.; SOURCE, K. H. The cell biology of wood formation: from cambial divisions to mature secondary xylem. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, n. 4, p. 631-639, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's Guide**. 6.11 Edition, 1996. 76p.

SCHEIBLE, W. R.; PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 285-295, 2004.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin/Heidelberg, v. 220, n. 2, p. 183-197, 2004.

SCHEIBLE, W-R.; PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 285-295, June, 2004.

SCHRADER, J.; NILSSON, J.; MELLEROWICZ, E.; BERGLUND, A.; NILSSON, P.; HERTZBERG, M.; SANDBERG, G. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar Identifies potential regulators of cambial stem cell identity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 2278-2292, 2004.

SCOTT, D. R. M.; PRESTON, S. B. Development of compression wood in eastern white pine through the use of centrifugal force. **Forest Science**, Washington v. 1, p. 178-182, 1955.

SCURFIELD, G. Reaction wood: Its structure and function. **Science**, Washington, v. 179, p. 647-655, 1973.

SEIFERT, G. J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 3, p. 277-84, June, 2004.

SEITZ, B.; KLOS, C.; WURM, M.; TENHAKEN, R. Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 537-546, 2000.

SHANFA, L.; LAIGENG, L.; XIAOPING, Y.; CHANDRASHEKHAR, P. J.; CHIANG, V. L. Differential expression of three eucalyptus secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, n. 3, p.681-695, 2008.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 132, p. 613-620, 2002.

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

SHUNPIG, Y.; ZHANGCHENG, T.; WEIAI, S.; WEINING, S. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 235-244, Jan., 2005.

SIEDLECKA, A.; WIKLUND, S.; PÉRONNE, M-A; MICHELL, F.; LENIEWSKA, J.; SETHSON, U.; EDLUND, L. R.; SUNDBERG, B.; MELLEROWICZ, J. E. Pectin Methyl Esterase Inhibits Intrusive and Symplastic Cell Growth in Developing Wood Cells of *Populus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, p.554-565, 2008.

SINNOT, E. W. Reaction wood and the regulation of tree form. **American Journal of Botany**, New York, v. 30, p. 69 -78, 1952.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, New York, v. 22, p. 53-78, 2006.

SPOKEVICIUS, A. V.; SOUTHERTON, S. G.; COLLEEN; MACILLAN,C.P.; QIU, D.; GAN, S.; TIBBITS, J. F. G.; MORAN, G. F.; BOSSINGER, G. Beta-tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, p.1365-1313, 2007.

STENMARK, H.; OLKKONEN, V. M. The Rab GTPase family. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 5, p. 1-7, Apr., 2001.

STERJIADES, R.; DEAN, J. F. D, GAMBLE, G. et al. Extracellular laccases and peroxidases from scymore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. **Planta**, Berlin, v. 190, n. 1, p. 75-87, May, 1993.

STERKY, F.; REGAN, S.; KARLSSON, J.; HERTZBERG, M.; ROHDE, A.; OLMBERG, A.; AMINI, B.; BHALERAO, R.; LARSSON, M.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; SANDBERG, G.; OLSSON, O.; TEERI, T.T.; BOERJAN, W.; GUSTAFSSON, P.; UHLÉN, M.; SUNDBERG, B.; LUNDERBERG, J. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 1330-1335, 1998.

SUNDBERG, B.; UGGLA, C.; TUONIMEN, H. Cambial growth and auxin gradient. **Cell and Molecular Biology of Wood Formation**, Oxford, p. 169-188, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 364p.

TAKAI, Y.; SASAKI, S.; MATOZAKI, T. Small GTP-Binding Proteins. **Physiological Review**, London, v. 81, n. 1, p. 153-208, Jan., 2001.

TAMAGNONE, L.; MERIDA, A.; PARR, A.; MACKAY, S.; CULIANEZ-MACIA, F. A.; ROBERTS, K.; MARIN, C. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 135-154, Feb., 1998.

TENHAKEN, R.; THULKE, O. Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 1127-1134, 1996.

TIMELL, T. E. The chemical composition of tension wood. **Svensk Papperstidning**, Stockholm, v. 72, p. 173-181, 1969.

TIMELL, T.E. Studies on opposite wood in conifers Part I: Chemical composition. **Journal Wood Science and Technology**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 1-5, Mar., 1973.

TIMELL, T.E. The structure of compression wood. In: \_\_\_\_ **Compression wood in gymnosperms**. Berlin: Springer Verlag, 1986, v.1, 288p.

TOMOMI, K.; SATOSHI, S.; BABA, K.; TANKA, F.; TAKAHISA, H. Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. **Journal of Wood Science**, Kyoto, v. 55, n. 4, p. 250-257, Aug 2009.

THOMPSON, J.; FRY, S. C. Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 26, p. 23-34, 2001.

TSEKOS, I. The sites of cellulose synthesis in algae: Diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes. **Journal of Phychology**, London. v. 35 n. 4, p. 635-655, 1999.



TUOMINEN, H.; SITBON, F.; JACOBSSON, C.; SUNDBERG, B. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid haspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid biosynthetic genes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 1179-1189, 1995.

\_\_\_\_\_. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Lancaster, v.115, p. 577-585, 1997.

TUSKAN, A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S.; BOHLMANN, J.; GRIGORIEV, I.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; RALPH, S.; ROMBAUTS, S.; SALAMOV, A.; SCHEIN, J.; STERCK, L.; AERTS, A.; BHALERAU, R. R.; BHALERAU, R. P.; BLAUDEZ, D.; BOERJAN, W.; BRUN, A.; BRUNNER, A.; BUSOV, V.; CAMPBELL, M.; CARLSON, J.; CHALOT, M.; CHAPMAN, J.; CHEN, G. L.; COOPER, D.; COUTINHO, P. M.; COUTURIER, J.; COVERT, S.; CRONK, Q.; CUNNINGHAM, R.; DAVIS, J.; DEGROEVE, S.; DE'JARDIN, A.; DEPAMPHILIS, C.; DETTER, J.; DIRKS, B.; DUBCHAK, I.; DUPLESSIS, S.; EHLTING, J.; ELLIS, B.; GENDLER, K.; GOODSTEIN, D.; GRIBSKOV, M.; GRIMWOOD, J.; GROOVER, A.; GUNTER, L.; HAMBERGER, B.; HEINZE, B.; HELARIUTTA, Y.; HENRISSAT, B.; HOLLIGAN, D.; HOLT, R.; HUANG, W.; ISLAM-FARIDI, N.; JONES, S.; JONES-RHOADES, M.; JORGENSEN, R.; JOSHI, C.; KANGASJA, J.; KARLSSON, J.; KELLEHER, C.; KIRKPATRICK, R.; KIRST, M.; KOHLER, A.; KALLURI, U.; LARIMER, F.; LEEBENSMACK, J.; LEPLÉ, J. C.; LOCASCIO, P.; LOU, Y.; LUCAS, S.; MARTIN, F.; MONTANINI, B.; NAPOLI, C.; NELSON, D.R.; NELSON, C.; NIEMINEN, K.; NILSSON, O.; PEREDA, V.; PETER, G.; PHILIPPE, R.; PILATE, G.; POLIAKOV, A.; RAZUMOVSKAYA, J.; RICHARDSON, P.; RINALDI, C.; RITLAND, K.; ROUZE', P.; RYABOY, D.; SCHMUTZ, J.; SCHRADER, J.; SEGERMAN, B.; SHIN, H.; SIDDIQUI, A.; STERKY, F.; TERRY, A.; TSAI, C. J.; UBERBACHER, E.; UNNEBERG, P.; VAHALA, J.; WALL, K.; WESSLER, S.; YANG, G.; YIN, T.; DOUGLAS, C.; MARRA, M.; SANDBERG, G.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSA, D. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, Washington, v. 313, p. 1596-1604, 2006.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 193-197, 2003.

VÂLCU, C-M; SCHLINK, K. Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 1599-1605, 2006.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B., VAN ROY, N.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, Jun., 2002. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>> Acesso em: 24 nov de 2009.

VERHERTBRUGGEN, Y.; KNOX, J. P. Pectic polysaccharides and expanding cell walls. In: VERBELEN, J.-P.; VISSENBERG, K. **Plant cell monographs**. Berlin: Springer, 2007. v. 5, p. 139-158.

VINCENT, D.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; NEGRONI, C.; ZIW, M. M. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 137, p. 949-960, 2005.

XU, F.; SUN, R.-C.; LU, Q.; JONES, G. I. Comparative study of anatomy and lignin distribution in normal and tension wood of *Salix gordejecii*. **Journal Wood Science and Technology**, Berlin, v. 40, n. 5, June, 2006.

WARDROP, A.B.; DADSWELL, H. E. The nature of reaction wood I - The structure and properties of tension wood fibres. **Australian Journal of Scientific Research**, Melbourne, v. 1, p. 3-16, 1948.

WASHUEN, R.; R. E.; SOUTHERTON, S. A study of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus* branch wood microstructure. **Iawa Journal**, Leiden, v. 26, n. 2, p. 203-210, 2005.

WESTING, A. H. Compression wood in the regulation of branch angle in gymnosperms. **Torrey Botanic Society Club**, New York, v. 92, p. 62-66, 1965.

WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J.; SEDEROFF, R. R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 407-416, 1998.

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

WILSON, B. F.; ARCHER, R. R. Reaction wood: Induction and mechanical action. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p. 23-43, 1977.

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

YOKOYAMA, R.; ROSE, J. K. C.; NISHITANI, K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134:1088–1099, 2004.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, New Yorker, v. 20, p. 417a-417c, 2002.

ZHONG, R.; DEMURA, T.; YE, Z-H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3158–3170, 2006.

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

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



**ANEXOS**

**ANEXO A – Tampão de extração**

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

**ANEXO B – Tampão de solubilização**

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

**ANEXO C – Tampão de Desnaturação**

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
Glycerol	10%
SDS	10%
$\beta$ -mercaptoetanol	5%
Bromofenol blue	1%

**ANEXO D – Tampões Laemmli**

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

(Preparado em água Milli-Q)

**ANEXO E – Solução de equilíbrio**

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

**ANEXO F - Solução fixadora**

Etanol	40%
Ácido acético	10%
Em água Milli-Q	

**ANEXO G - Solução de coloração**a) Solução Estoque *Dye*

Comassie G250	0,1%
Ácido fosfórico	2%
Sulfato de Amônio	10%
Em água Milli-Q	

b) Solução *Dye* para coloração

Solução Estoque <i>Dye</i>	80%
Metanol	20%

**ANEXO H - Solução de descoloração**

ACN	50%
Bicarbonato de Amônio	25 Mm

**ANEXO I - Solução bloqueadora**

ACN	50%
Ácido Fórmico	5%
Água Milli-Q	45%

**ANEXO J - Solução de eluição I**

Metanol	60%
Ácido Fórmico	1%
Água Milli-Q	39%

**ANEXO L - Solução de eluição II**

ACN	50%
Ácido Fórmico	1%
Água Milli-Q	49%

**ANEXO M – Tampão de extração de RNA (com modificações)**

CTAB	2%
PVP-polivinilpirrolidona	2%
Tris-HCl, pH 8	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 mM
$\beta$ -mercaptoetanol	2%



## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
<b><u>Metabolismo e Energia</u></b>										
230	NADP-dependent malic enzyme	<i>Phaseolus vulgaris</i>	P12628	127	64932	6,8	6,4	KYGSIFRR KYGSIFRR RATGQEYANFLDEFTRAVKQ KIWLSDVKG RAIFASGSPFDPVEYIGKL		
249	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase	<i>Pyrus communis</i>	Q5CCU4	361	68773	5,3	5,2	0,3	RLASFYERA KTVISQALSKY KISGDVYIPRG REDDLNEIVQLVGKD KFEDPAEGEEALVAKF RTTLVANTSMPVAARE + Oxidation M KDALAEGDKITLETAKL FLAEMPADSGYPAYLAARL + Oxidation M RGVSVPALDKDILWEFQPKK RLTTFEEDSEKESEYGYVRK KLLREDYLAQNAFTPYDKF REVLQREDDLNEIVQLVGKD	
348	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	<i>Oryza sativa</i>	Q07087	25	52776	6,6	56000	6,5	0,4	KTTDILAVFKI
371	Putative xylose isomerase	<i>Oryza sativa</i>	Q8H3Q7	153	53495	5,4	51789	5,0	0,5	RFSVAFWHTFRG KLIEDGSLDELVRK KALEVTHYLGGENYVFWGGRE KKALEVTHYLGGENYVFWGGRE

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
329	Vacuolar ATPase subunit B	<i>M. crystallinum</i>	Q8GUB5	602	54127	60,86	4,8	0,4
								KINVECNHATLSGHSCHELETARI KYQEVNIRL KTLDQYYSRD KTPVSLDMLGRI KTPVSLDMLGRI + Oxidation M KFVAQGAYDTRT RTVSGVAGPLVILEKV KAVVQVFEGTSGIDNKY RQIYPPINVLPSLRL RIALTTAEYLAYECGKH KIPLFSAAGLPHNEIAAQICRQ
436	Alcohol dehydrogenase	<i>Oryza latifolia</i>	Q1HME3	42	27866	7,2	6,0	0,5
								KINPAAPLDKV KTHPMILLNERT Oxidation M KINPAAPL
455	Putative dehydroquininate synthase	<i>Oryza sativa</i>	Q651F0	42	47095	8,1	41,8	5,7
								KVADGLLRL RELASGIAEVVKY RYLVVTTNTTVPAPLYLEKV RSLIANLSAANCYKVV
470	adenosine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	124	37836	5,3	40047	5,0
								KLNNAILAEDKH RSLIANLSAANCYKVV
475	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Petroselinum crispum</i>	P26519	79	36372	7,6	40453	6,4
								0,6 RAASFNIISATGAAKA RVPTVDVSWKKTARL KAVGKVLPAL

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
477	Adenosine kinase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	180	37836	5,3 41173	4,8 0,5	KLNNAILAEDKH KKPENWALVEKA RSLIANLSAANCYKV
476	UDP-glucose 4-epimerase	<i>Solanum tuberosum</i>	Q6XZA0	78	40019	7,6 40555	6,4 1,8	KLFIEEICRD KFDVHIFAGLKA KDGTVGRDY
512	Probable fructokinase-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M1B9	202	35044	5,1 36391	4,9 0,2	REFMFYRN RFANACGAIITTKK KAPGGAPANVAISRLL
714	probable triosephosphate isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SKP6	90	33346	7,7 22841	5,5 0,5	KFFVGGNWKC KGGFTGEISVEQLKD KGPEFATIVNSVTSKK KLGDFEFGHMLAGILKQ
747	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rhoeas</i>	Q2P9V1	110	24417	5,9 21775	5,9 1,9	RFEDYKK RFFEDYKKN RAIGLMPMIDQGEKDDKI + 2 Oxidation M
	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rhoeas</i>	Q2P9V1	149	24417	5,9 21775		KVKYELDKK RVLYSSVWYPHNYGFIPRT KVKYELDKK RVLYSSVWYPHNYGFIPRT KIIAVCVDDPEFRH Nitrosyl C
985	adenosine kinase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	183	37836	5,3 41173	4,9 0,4	KLNNAILAEDKH KKPENWALVEKA RSLIANLSAANCYKV

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
1167	Fructokinase-like protein	<i>Cicer arietinum</i>	Q8LPE5	243	26109	5,0	36759	4,8	2,5	KVKKYPVPLPK KFANACGAITTKK RLPLWSPPEARL KVSDVELEFLTGSDKI KVFHYGSISLIVEPCRS
1280	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Oryza rufipogon</i>	Q1H960	74	42590	5,7	47655	5,7	0,2	KSIVASGLARR KTAAYGHFGRD KTIFHLNPSGRF
	S-adenosylmethionine synthetase 3	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	315	39513	6,2	47655	5,7	0,2	FSGAYIVRQ KGNIDYEKI KIPDKEILKI KTAAYGHFGRD KTIFHLNPSGRF KEHVIRPVIPEKY RFVIGGPHGDAGLTGRK RKDGTCPWLPRPDGKT
	S adenosylmethionine synthase	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	282	39513	6,6	47655	5,7	0,2	KSKMMVMFGEITTKG KVLVKEQQSPDIAQQVHGHLTKR KTIFHLNPSGRF RFVIGGPHGDAGLTGRK KSIVASGLKVR
	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Oryza rufipogon</i>	Q1H960	74	42590	5,7	47655	5,7	0,2	KSIVASGLARR KTAAYGHFGRD KTIFHLNPSGRF

## ANEXO N

Tabela 6 -- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
1355	Enolase	<i>Ricinus communis</i>	P42896	283	47912	5,7	5,1	0,5	RAAVPSGASTGIYEALKKRD KLAMRTFMILPVGASSFKE KLAMQEFFILPVGASSFKE KEGLELLKSAIAKA KVVIGFDVAASEFYVSDKT KSYDLNFKE KYNQLKRI RIEELGAEAVYAGGKFRF KLVDLALASGKI KAVGPVDDAVVTFNFRA KGTVHLIGLLSD	
1452	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LF55	83	60700	5,5	68175	5,0	0,5	
1536	Alcohol dehydrogenase	<i>Malus domestica</i>	P48977	78	41409	5,8	50246	6,1	0,6	KSRFSIKGKPI KAGDHVLPVFT KFITHKVPFS
1580	S-adenosylmethionine synthetase 2	<i>Suaeda salsa</i>	Q9FPL6	351	43009	5,8	34342	5,0	2,9	KTIFHLNPSGRF KEHVIKVIPEKY RFVIGGPHGDAGLTGRK RFVIGGPHGDAGLTGRK KTNMVMVFEITTKA + Oxidation M KENDFRPPGMISINLDLKR KENDFRPPGMISINLDLKR + Oxidation M KVLVNIQQSPDIAQGVHGHILTKR
1664	2'-hydroxyisoflavone reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P52577	92	33737	5,7	34429	5,6	0,4	KFLVEASAKA KILVIGGTGYIGKF KTHLPEEQ
1691	Phosphoglycerate kinase	<i>Arabidopsis</i>	Q8LFV7	152	42148	5,5	42224	5,8	0,3	KFAAGTEAVAKQ

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
		<i>thaliana</i>						KTFSEALDTTKT KELDYLVGAVANPKK KGVSLLLPTDVIADKF KGVTTIIGGGDSVAAVEKV
1718	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Zea mays</i>	P09315	81	42867	7,6	47919 6,7 2,3	RAAALNIVVVSTGAAKA KAVSLVLPKLLG RVVDLADI
1758	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M9P3	376	51874	5,9	56997 5,5 2,1	-ATATTLSPADAACL KYANSNIDIHTFNQIQHPRL KLDALLSKGKE KGGTLISYYSKV RLVEAKALKM KFEIIPNPKK KVLKETAAGAAIKF KVLQLKTAAGAAIKF KSIPSIILDSLVK KLEIPDRAVIATKD
1779	probable UDPglucose 6-dehydrogenase	<i>Glycine max</i>	Q96558	275	52942	5,7	56567 6,1 0,4	KHVFEADIVFVSVNTPTKT KAADLTWESAARM RILTTNLWSAELSKL KLAANAFLAQRI KIAILGFAFKK
1908	Sacarose synthase	<i>Alnus glutinosa</i>	P49034	124	91631	6,7	97058 6,3 2,1	KLLDGAFGEVLKS RIGNVHALQYVLRK KNITGLVEWYGKN RYIEMFYALKY

(continuação)

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
1944	11S storage protein precursor	<i>Coffea arabica</i>	Q9ZNY2	120	55119 8,1	10412 4,6	2,4 2,4	KAGNQGFEYVAFKT KIPILSSLQLSAERG RNIFSGFDDQLLADAFNVDLKI
1975	RuBisCO large subunit	<i>Hypocoum imberbe</i>	O47277	188	50381 6,1	80121 4,5	0,3 0,3	RAYVECLRG KDTDILAAFRV REITSGFVDLLRD RFLFCAEAIYKA REITIGFVDLLRD KIGLFGGAGVGKT KWVDLLAPYQRG RVLNTGSPITVPVGRA KTVLIMELINNVAKA KTVLIMELINNVAKA + Oxidation M RFTQANSEVSALLGRI
2175	Putative ATP synthase beta subunit	<i>Oryza sativa</i>	Q5N7P8	75	45236 5,3	59344 4,9	0,5 0,5	
2280	Adenosylhomocysteinase	<i>Phalaenopsis sp</i>	P50249	41	53141 5,8	12222 5,3	2,4 2,4	REYKY KNGKI RRMKE RKMKN RASGY
2291	Putative chloroplast cysteine synthase	<i>Nicotiana Tabelaacum</i>	Q3LAG6	94	38895 4,8	33912 5,4	0,5 0,5	KAFGAELVLTDPKAG KLILTMPASMSLERR + 2 Oxidation M KIDILVAGIGT
2310	S-adenosylmethionine synthetase 3	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	365	39513 6,2	47535 5,5	0,3 0,3	KGNIIDYEKI KSIVASGLARR KSIVASGLARR

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	T15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
2325	Adenosylhomocysteinase	<i>Medicago sativa</i>	P50246	80	53151	5,9	57866	5,6	0,5	KTAAYGHFGRD
										KDGTCPWLRPDGKT
										RFV/IGGPHGDAGLTGRK
										RFV/IGGPHGDAGLTGRK
										KTNMVMVFGIEITTKG
										KTNMVMVFGIEITTKG + 2 Oxidation M
										RDDADFTWEVYKPLKW
										KIIDIYGGWGAHGGGAFSGKD
										RCIVQVSYAIGVPEPLSVFVDTYGTGKI
										PRCIVQVSYAIGVPEPLSVFVDTYGTGKI
2489	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Musa acuminata</i>	Q9SDX3	128	51362	5,6	57285	6,3	0,4	RDSAAVFAWKG
										RITIKPQTDWR
										KSGIIVLAEGRL
										KAGFINLVSRV
										KTGFINLVSRV
										RYLSGEAQHITWSKI
										KGGTLISVYSKV
										KIFNTNVKWNLLKA
										KLVEAKALKM
										KFEIIPNPKV
2494	ATP synthase subunit alpha	<i>Oenothera biennis</i>	P05492	135	55597	6,5	58012	6,2	0,2	RAAELTTLLESRI
										RAVTLTTLLESRI
										RVISVGGGIVKV
										RVVDALGVPIIDGRG
										KTAIDITLIKIKQ
										KLELARYKE



## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
2502	Glutamate dehydrogenase	<i>Solanum lycopersicum</i>	P93541	301	44813	7,1	45084	6,4	0,5	RLGLTSKL KGAHANIPYGGAKG KTAVANIIFGGAKG RGLVFATEALLNEYGKS KVVAVSDITGAIKN RMGAFTYGVKRV
2503	alcohol dehydrogenase	<i>Solanum tuberosum</i>	P14673	40	41094	5,9	47058	6,5	2,4	KINPLAPLDKV RIIGVDRNPAPF
	Alcohol dehydrogenase A	<i>Washingtonia robusta</i>	P93624	53	33107	5,5				RSDIPSWVEKY KINPLAPLDKV
	alcohol dehydrogenase		Q42764	49	19886	5,7				RSDLPSVVEKY RIIGVDLNPFRF
2521	Phosphoglycerate kinase	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q42962	280	42364	5,9	43411	5,7	0,6	KHILKPLVPRL RSELLGVIVKI KLASLADLYVNDKGTARRA KFLKVAVAGFLMQKE KIGVIESLLEKY KGVTTIIGGGDSVAAVIKY
2529	Cytosolic phosphoglycerate kinase 1	<i>Populus nigra</i>	O82159	521	42669	5,7	36945	6,4	4,9	KLAELSGKIG KYSCLKPLVPRL KKPFAAIVGGSKV RSELLGVEVKI RSELLGVEVKI KIGVIESLLEKY

## ANEXO N

Tabela 6 -- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
<u>Processos Celulares</u>								
351	Cell division protein FisZ	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SU03	104	50207	4,9 56425	6,4 1,9	R AVFVDLEPTVIDEVR T R QLFHPEQLISGK E K EINDLCLDR I K FDLMYAK R KTFSEALDITTKT KELDYLVGAVANPKK KGVTTIIGGDSVAAVEKV KKLASLAEVYVNDAFGTAHRA
570	14-3-3 protein	<i>Manihot esculenta</i>	Q1AP39	167	29832	4,8 33.32	4,3 2,0	R YLAEFK T R IISSIEQK E R KVLSVAYK N K VFYLK(M) K SIAESTLLAYK S
584	Putative F-box/Keich-repeat	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LY6	98	50359	9,5 32491	4,4 1,8	R SLIASPELEATR S K ELWGFVE W R VVFDSSR S
825	Heat shock 70 kDa protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q08276	97	73077	6,7 16893	5,2 1,9	(K)AVITVPAYFKDQGR(Q) (K)YQEIIVSIIFGK(S) (R)SL KDVDEV(D)
964	High molecular weight heat shock protein	<i>Malus domestica</i>	Q9M6R1	107	71216	5,2 78322	5,1 2,5	R VEIANDQQNR T R TTPSYVAFTDTER L R IINEPTAAAIYGLDK K K ATAGDTHLGGEDFDNR M

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
	Heat shock 70 kDa	<i>Solanum tuberosum</i>	Q08276	51	73077	6,4	78322	5,1	2,5	(R)NSADTTIYSIEK(S) (K)ETAAYLGGK(S) (K)VQEVSEIFGK(S) (K)ALIDIR(N) (K)AVITVPAYFDNAQR(E)
1186	14-3-3-like protein	<i>Lilium longiflorum</i>	Q9SP07	288	29253	4,8	31524	4,2	0,3	(R)KVLVAVYK(N) (K)VFK(M) (K)SIAESTLLAYK(S) (K)SAQDIALAELAVVHPIR(L)
1368	Stromal 70 kDa heat shock	<i>Pisum sativum</i>	Q02028	81	75515	5,3	76371	4,7	0,6	(R)TPVSSLR(D) (K)TIDEVILVGGSTR(I) (R)IPAVAKLVK(K)
1558	Salt tolerance protein 5-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q38HV0	49	34215	5,4	42012	5,3	1,9	K LSDLDPETR S
	Putative salt tolerance protein 5	<i>Oryza sativa</i>	Q67X37	42	34269	5,6				R FVVCDIK K
1599	Temperature-induced lipocalin	<i>Solanum tuberosum</i>	Q38JC7	82	21455	5,5	14568	5,4	1,9	R YLWILSR R R WYEIASFSPSR F R YLWILS R
1877	Cell division control protein 48 homolog E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LZF6	324	89958	5,1	90665	5,0	0,2	K LQLFR G R KGDFLVLR G R ELVELPLR H K DFSTAILER K K LAEDVDLER I

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
1889	Heat shock protein Hsp70	<i>Medicago truncatula</i>	A2Q406	64	71402	5,3	77145	5,2	2,9	K GILLYGPPGSGK T
										R IVSLLTLMGDK S
										R LDQLYIPLPDEDSR L
										K NAPSIIIDEISIAPK R
	Heat shock protein Hsp70	<i>Medicago truncatula</i>	A2Q406	93	71402	5,3	77145	5,2	2,9	R TTPSYVAFDTER L
										R IINEPTAAAIYGLDKK A
										R TTPSYVAFDTER L
										R TTPSYVAFDTER L
	chaK-type molecular chaperone HSP71.2	<i>Pisum sativum</i>	Q40980	471	71167	5,2	77145	5,2	2,9	K ITITNDK G
										R NTTIPTKK E
										R TKDNLLGK F
										R FEELNMDLFR K + Oxidation (M)
2284	GTP-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SN35	236	23870	5,2	21612	5,3	2,0	R AITSAYYR G
										R NEFSLESK S
										K VVLIGDSGVGK S
										K STIGVEFATR S
										R ADDDYDLFK V
										K NSLENYAYNMR N + Oxidation (M)
										K VQQLLQDFNGK E
										R TTPSYVAFDTER L
										R ARFEELNMDLFR K + Oxidation (M)
										R IINEPTAAAIYGLDK K
K ATAGDTHLGGEDFNMR M										
R IINEPTAAAIYGLDKK A										

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
<b><u>Transporte</u></b>										
562	Alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Vitis vinifera</i>	P93798	101	32486	4,9	33404	4,8	0,3	KAKELEEDDLT - KVAQFAAQLEQYQK A
	NSF attachment protein	<i>Elaeis guineensis</i>	B3TM20	57	32555	5,0				KAKELEEDDLT - RYEELDPTFSGTR E
<b><u>Estrutura e Organização da Estrutura</u></b>										
382	Actin	<i>Isatis indigoitica</i>	Q5FZP3	327	41819	5,3	47176	4,9	0,4	KVVAPPER K KAGFAGDDAPR A KEITALAPSSMK I + Oxidation (M) KEITALAPSSMK I + Oxidation (M) R GYMFTTTAER E K GEYDESGPSIVHR K KNYELPDGGQVITIGAER F R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A K DLYGNIVLGGSTMFPGIADR M + Oxidation (M) R TTGIVLDSGGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILR L
381	Actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q7XZJ7	216	41734	5,4	46351	5,0	0,3	R DLTDALMK I + Oxidation (M) KAGFAGDDAPR A KEITALAPSSMK I R GYMFTTTAER E K YPIEHGIVSNWDDMEK I K DLYGNIVLGGSTMFPGIADR M

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi		T15/ C15		Peptídeos	
					teórico	exp	5,1	0,5		
383	Actin	<i>Isatis tinctoria</i>	Q5FZP3	527	41819	5,3	46002	5,1	0,5	KAGFAGDDAPRA KEITALAPSSMK I KEITALAPSSMK I + Oxidation (M) R GYMFTTAER E + Oxidation (M) R AVFPSIVGRPR H K GEYDESGPSIVHR K K NYELPDGQVITIGAER F K YPIEHGIVSNWDDMEK I R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M R KDLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M
460	Caffeic acid O-methyltransferase COMT2	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWC1	408	34019	5,9	40657	5,2	0,3	K GDAIFMK W R LYGLAPVCK F R LYGLAPVCK F K NCYDALPNNK V K HVGGDMFVSVPK G K ILMESWYLYK D + Oxidation (M) K AYGMTAFEYHGTDP R F + Oxidation (M) K NVIHIDCIMLAHNPGGK E K VIVAEVLPVYPTSLATK N K GINFDLPHVIEDAPPLPGVK H K GFEGLETVDVGGGTGAVLSMIVAK Y
661	Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase CCoAOMT-2	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWB8	128	27764	5,3	26,9	4,7	0,6	R LIDLVK V K ILAMDINR E K ILAMDINR E + Oxidation (M) R DFVLELNK A R ENFEIGLPIEK A R EGPALPLLDQLVQDEK N

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
663	Caffeic acid 3 O methyltransferase COMT	<i>Eucalyptus gunii</i>	P46484	77	39914 5,7	26.63 4,9	0,2 0,2	K TAVLEGGIPFNK A K GINVYLPHVIEDAPPPLPGVK H K FLVK N
674	caffeoyl-CoA O-methyltransferase CCoAOMT	<i>Eucalyptus gunii</i>	O04854	238	27914 5,0	25323 4,5	0,6 0,6	R LIELVK V K ILAMDINR E K ILAMDINR E + Oxidation (M) R DFVLELNK A R ENYELGLPVIQK A R EGPALPILDQLIEDGK Q R IEICMLPVGDGITLCR R + Oxidation (M) K HPWNIMTTSADEGQFLNMLLK L + 2 Oxidation (M) R VLYSSVVYYPHNYGFIPR T
689	Tubulin alpha chain	<i>Glycine max</i>	Q2TFP2	77	49692 5,0	24818 4,8	0,4 0,4	R AVFVDLEPTVIDEVR C R LISQIISLTTSLR F K AYHEQL S
719	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	<i>Eucalyptus gunii</i>	O04854	235	27914 5,0	22899 4,7	0,6 0,6	R IINEPTAAAAYGLDKK A K SLLQSDALYQYILETSVYPR E K ILAMDINR E R ENYELGLPVIQK A R EGPALPILDQLIEDGK Q R LIELVK V R DFVLELNK A
1306	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus gunii</i>	P31655	312	38792 5,9	48381 5,8	0,4 0,4	(R)NTGPMILYIK(V) (R)GGILGLGGVGPMPVK(I) (K)SITGSFIGURAAFK(E)

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
1519	Alpha-tubulin	<i>Nicotiana Tabalaacum</i>	Q8VXC9	435	4,9	54605	4,7 0,2	R GHYTI GKE R LSV DYGK K K FDL MYAK R R EDL AALEK D R LSV DYGK S K EDA ANNFAR G R QLFHPEQLISGKE R LISQVISSLTASLRF R TIQFVDWCPTGFKG R SLDIERPTYTNLNR L R AVFV DLEPTVIDEVR T K CGINYPPTVPPGGDLAK V R AFVHWYVGEEMEEGFSEAR E (R)FVV D VWGSKLT(-)
1524	Alpha-tubulin	<i>Betula verrucosa</i>	Q9M3T2	605	4,9	54057	4,8 0,2	R GHYTI GKE R LSV DYGK K R EDL AALEK D K FDL MYAK R + Oxidation (M) R LSV DYGK S K DVNAAVATIK T K EIV D LCLDR I R QLFHPEQLISGKE R LISQVISSLTASLRF R SLDIERPTYTNLNR L R AVCMISNSTSVAEVFSR I



## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
1527	Alpha-tubulin	<i>Nicotiana Tabalaacum</i>	Q8VXC9	440	49753	4,9	54331	4,8	0,4	K TVGGGDDAFNTFFSETGAGK H
										R AFVHWYVVGEGMEEGEFSEAR E + Oxidation (M)
										R GHYTIGK E
										R LSVDYGK K
										R EDLAALEK D
										R EDLAALEK D
										K FDLMYAK R + Oxidation (M)
										R LSVDYGK S
										K DYNAAVATIK T
										K EDAANFAR G
K EIVDLCDDR I										
R QLFHPEQLISGKE										
R LISQVISSLTASLR F										
R TIQFVDWCPTGFK C										
R SLDIERPTYTNLNR L										
R SLDIERPTYTNLNR L										
R AVFVDLEPTVIDEVR T										
R AVCMISNSTSVAEVFSR I										
K TVGGGDDAFNTFFSETGAGK H										
R QLFHPEQLISGKEDAANFAR G										
Tubulin alpha-3 chain	<i>Hordeum vulgare</i>	Q9ZRR5	158	49729	4,9	54331	4,8	0,4	(K)TVGGGDDAFNTFFSETGAGK(H)	
									(R)AVFVDLEPTVIDEVR(T)	
									(K)EIVDLCDDR(I)	
									(R)LVSVISSLTASLR(F)	
									(R)IHFMSSYAPVISAEK(A)	
(K)DVNAAVGTIK(T)										

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi		T15/ C15	Peptídeos		
					teórico	exp				
1587	Alpha-tubulin	<i>Nicotiana Tabelaacum</i>	Q8VXC9	359	49753	4,9	10464	4,7	1,4	R GHYTGIGKE R EDLAALEK D R EDLAALEK D K EDAANNFAR G K EIVDLC LDR I R LISQVISSLTASLR F R TIQFVDWCPTGFK C R SLDIERPTYTNLNR L R IHFMLSSYAPVISA EK A + Oxidation (M)
1820	Alpha tubulin	<i>Physcomitrella patens</i>	Q8H933	259	49514	5,0	65027	6,6	0,3	R EDLAALEK D R EDLAALEK D K DVNAAVATIK T K EDAANNFAR G K EIVDLC LDR V R LISQVISSLTSLR F R SLDIERPTYTNLNR L R AVFVDLEPTVIDEVR T R IHFMLSSYAPVISA EK A + Oxidation (M)
2421	phenylcoumaran benzylic ether reductase-like protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	A3F7Q4	62	33797	5,8	93689	6,3	0,6	K FIVEASAK E K VLIIGGTGYLGK F
2486	Alpha-tubulin	<i>Nicotiana Tabelaacum</i>	Q8VXC9	186	49753	4,9	58012	6,0	0,5	K EIVDLC LDR I R LISQVISSLTASLR F R SLDIERPTYTNLNR L R AVCMISNSTSVAE VFSR I K TVGGGDDAFNTFFSETGAGK H
2507	Cinnamyl alcohol dehydrogenase CAD 2	<i>Eucalyptus gunii</i>	P31655	133	38792	5,7	43411	5,7	0,6	R FVVDVVGSK L K GLTSQIEVIK M

(continuação)

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos
2555	beta tubulin (TUB8)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q3HRX8	236	50248	4,8	56	4,7
								0,2
								R YLTASAMFFR G
								R YLTASAMFFR G + Oxidation (M)
								K LAVNLIPFPR L
								R FPGQLNSDLR K
								R VSEQFTAMFR R
								K STVCDIIPPTGLK M
								R MMLTFSVFPSPK V + 2 Oxidation (M)
								R AVLMDLEPGTMDSVR S + 2 Oxidation (M)
								K NSSYFVVEWIPNNVK S
								R ALTVPELTQQMWDAK N + Oxidation (M)
2560	tubulin beta-1 chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P12411	323	50217	4,7	58748	4,5
								0,1
								R YLTASAMFFR G
								R FPGQLNSDLR K
								R VSEQFTAMFR R
								R INVYYNEASGGR Y
								R MMLTFSVFPSPK V + 2 Oxidation (M)
								R LHFFMVGFAPLTSR G
								R LHFFMVGFAPLTSR G + Oxidation (M)
								K GHYTEGAELIDAVLDVVR K
<b><u>Vias de Informação</u></b>								
239	Aspartyl-tRNA synthetase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S114	230	61035	6,0	73164	6,3
								0,5
								K LGQLVLEK Y
								R TPANQGIPI I
								R GEEIISGAQR I
								R VFEIGPVFRA
								K AIQAGEQLVR V
								K AIPTLPINIEDAAR S

## ANEXO N

Tabela 6 -- Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	(continuação)			
								Peptídeos	Peptídeos		
241	Pentatricopeptide repeat-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O22714	59	55905	8,9	64471	6,7	1,8	K INPLAPLDK V R IIGVDRNPAR F R IWRSL R	R HLCFEFTGLDVEIEMIKK H + Oxidation (M)
363	Putative DNA-binding protein GBP16	<i>Oryza sativa</i>	Q5W6H1	75	43170	6,6	66477	5,4	0,3	K AADVLAANAATAAEVALR L K AWLALGTK T	
400	translation elongation factor EF-Tu.B	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Q43364	126	52688	5,7	46586	5,3	0,2	K EHILLAK Q  K FEALVYVLK K K FEALVYVLK K R NTTVTGVEIMFQK I K QVGPNMVVFNLK Q R HYAHVDCPGHADYVK N R GITINTATVEYETENR H	
696	Proteasome	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23708	186	25701	5,5	24632	5,6	1,8	(K)LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK(A) (R)LYKEPIPVTLVLR(E) (K)EPIPVTLVLR(E) (R)VLTPAEIDDDYLAEVE(-)	
1380	Dihydropyrimidinase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q56YS5	104	26992	6,6	66645	5,9	3,3	K ALGLDDFR R R IFNIYPR K	
	Putative dihydroxy-acid dehydratase	<i>Oryza sativa</i>	Q6YZH8	102	63650	7,1				K MDLKPDKIITEK S + Oxidation (M) R FNTVGVSDAISMGTR G + Oxidation (M)	
1503	DEAD box RNA helicase	<i>Pisum</i>	Q8H1A5	217	46881	5,4	50883	5,1	0,4	R ALGDYLGVK V	

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos		
1581	Hypersensitive-induced reaction protein	<i>Capsicum annuum</i>	Q5G104	328	31349	6,0	27586	5,1	1,8	R VLITTDLLAR G K GLDV/IQAQSGTGK T R ILSSGVHVVVGTGR V K DQIYDIFQLLPSK I R GIYAYGFEKPSAIQQR G
1590	Glycine-rich RNA-binding protein	<i>Populus euphratica</i>	P84560	40	1202	6,0	10257	5,3	0,5	- GFGVTFGNEK - R VQQLDVR C R QAIVDGLR D K YLSGLGIAR Q R AMNEINAAAAR L + Oxidation (M) K LNLDVFEQK N K GGIQAYVFDVIR A
1885	78 kDa glucose-regulated	<i>Lycopersicon esculentum</i>	P49118	199	73235	5,1	80933	4,8	0,5	K DAGVIAGLNVAR I K FDLTGIPPAPR G K NQIDEIVLVGGSTR I K VFSPEEISAMILTK M + Oxidation (M) R IINEPTAAAIYGLDKK G R VEIESLFDGDTDFSEPLTR A
2384	chaperonin 60	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S29316	356	61434	6,3	65313	5,0	0,5	K FGVEAR G K VLELALK R R EIGELIAK A R AIFTEGCK S K VLELALK R Q

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
<b><u>Função não definida</u></b>										
921	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q5Q0A6	53	23344	8,7	11713	6,5	1,8	R YEKF D K DLPVSVGR F R IGETWAIFKGR Y K TTGK K
1593	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i>	Q10FP8	52	10526	5,8	11423	5,6	2,1	R GDGRRPR R R SCSSASAEPPQAPVEEPHGTR R
1604	Protein At1g78870	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q2V4C1	53	17192	7,8	10308	6,6	5,6	K LELFPEEYPMAPK V K DKWSPALQIR T
1617	Hypothetical protein At5g62590	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GUL2	42	106917	5,6	19054	5,7	2,2	R IRDNIIPR G
1748	Hypothetical protein	<i>Rubus idaeus</i>	Q9SM53	45	36618	5,4	35899	4,8	1,8	K AIELDPSLFKA K AIELDPSLFKA K SFVESNGTVLSTNWKE
1905	Hypothetical protein	<i>Medicago</i>	Q1FXA1	44	7304	9,7	10345	6,9	1,8	R MPLGTKLTQTDSDAIFEMIFK Q

## ANEXO N

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T15/ C15	Peptídeos	(conclusão)
2295	Hypothetical protein A15g62590	<i>truncatula</i>	Q8GUL2	38	106917 5,6	106920 5,3	3,9	R QTQGLKVVPLQEMTK I	
		<i>Arabidopsis thaliana</i>						R IRDNIIIIPR G	

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pi teórico, peso molecular e ponto isoeletrico teóricos; PM/pi exp, peso molecular e ponto isoeletrico experimentais; T15/C15, razão entre o volume do spot no tratamento T15 e o volume do spot correspondente no material controle C15

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos
247	V-type proton ATPase	<i>Gossypium hirsutum</i>	P31405	527	68522 5,4	72430 5,1	2,1	R LASFYER A K TVISOALS K Y K LAADTPLL T G Q R V K DTVLELEF Q G V K K K I T Y I A P P G Q Y S L K D R E D D L N E I V Q L V G K D K F E D P A E G E E A L V A K F R T T L V A N T S N M P V A A R E + O x i d a t i o n ( M ) R L A E M P A D S G Y P A Y L A A R L + O x i d a t i o n ( M ) R L T T F E D S E K E S E Y G Y V R K
280	Branched-chain-amino-acid aminotransferase-like protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8W0Z7	151	62212 6,4	67320 6,4	1,5	K H F I L I R N R A T V M E L V V K E + O x i d a t i o n ( M ) K L L A W V G D E I L P R E R S L S T S L M Y S F A Q R L + O x i d a t i o n ( M ) K I H H N L L N N I L A K I
322	Allergenic isoflavone reductase-like	<i>Betula verrucosa</i>	Q9FUW6	152	34190 6,7	61322 6,0	1,5	R V H A V E P A K T K F I V E A S A K S R F F P S E F G N D V D R V
405	viciilin precursor Storage protein	<i>Theobroma cacao</i>	Q43358	598	66256 6,3	49867 6,4	10,8	K E L S F G V P S K L R F A E N S P P L K G R N N P Y Y F P K R K L E E I L E E Q R G K L E E I L E E Q R G K G T T F V T H E N K E

Metabolismo e Energia



## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos
477	Adenosine kinase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	123	37836	5,3 41173	4,8 1,4	R EKLEEEIEEQR G K LTIIVLALPVNSPGK Y K LNQGAIFVPHYNSK A R EQEEEESEETFGFEQQVK A K APLSPGDV FVAPAGHAVTFFASK D
490	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	<i>Brassica napus</i>	Q84JA9	147	36246	6,1 39446	5,8 2,3	K TDGLFLK C R SLNLTLR K K TRYDDVNLITIR E M ATLFPGDGIGPEIAESVK K R ENTEGEYSGLEHQVVR G K ELNLYANVRPCYSPLPGYK T
532	Enolase	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	71	47719	5,3 34953	4,4 2,9	K VNIQISVTSIEAVR M R AAVPSGASTGIYEALRLR D R IEEELGAEAVYAGANFR T
541	malate dehydrogenase		P17783	191	36201	8,9 35130	5,7 4,9	K LFGVTTLDVVR A R DDLFNINAGIVK S K VAVLGAAGGIGQPLALLMK L + Oxidation (M)
544	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	<i>Populus trichocarpa</i>	O65881	92	34007	5,7 35130	6,1 2,7	K FIVEASAK A K EDDIGTYTIK A K ILIIGGTGYIGK F
547	NmrA-like- (Barrel medic).	<i>Medicago</i>	Q1S083	88	36664	5,8 34690	5,3 2,0	K AGHPTFALVR E

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
		<i>truncatula</i>						R FFPSEFGNDVDR S		
717	triose-phosphate isomerase	<i>Coptis japonica</i>	P21820	162	27090	5,5	23072	6,1	2,4	K FFFVGGNWK C K TAYALSQGLK V K VIACVGETLEQR E
1309	Argininosuccinate synthase	<i>Oryza sativa</i>	Q2QVC1	165	52193	6,6	50883	5,4	1,4	R WFDPLR Q R EWDITGR E K YAELVYAGR W R ELESLLDR E K VVLAYSGGGLDTSVIVPWLR E
1334	Phosphoglucomutase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RZG1	150	63423	5,5	71342	5,5	1,3	R YLFEDGSR L K FFEVPTGWKF R SMPTSAALDWWAK H R SMPTSAALDWWAK H + Oxidation (M) R YDYENVDAGAAK E R SMPTSAALDWWAKHLNLK F + Oxidation (M)
1337	phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZAA5	48	64559	6,5	64985	5,5	2,0	K TLAVMGFGK V + Oxidation (M)
	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LT69	46	62122	8,4				K ISLCDALIVR S R GGVIDEEALLR A
1357	glutamate-ammonia ligase		P12424	37	38893	5,5	41906	5,0	5,0	K IIAEYIWIGSGMDLR S + Oxidation (M) R GNNILVMCDAYTPAGEIPTNK R + Oxidation (M)
1671	NADP dependent sorbitol 6-phosphate dehydrogenase	<i>Vauquelinia californica</i>	Q8S4S2	112	29733	8,7	32491	6,1	2,5	R EELFITTK I R SIGLSNYDLFLTR D

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos		
1673	Isotriavone reductase-like protein	<i>Vitis vinifera</i>	Q3KN68	92	33886	5,8	33236	5,5	2,4	K SGHPTFALVRE K EDDIGTYTIK A K AVFNKEDDIGTYTIK A
1731	67KD PROTEIN	<i>Theobroma cacao</i>	Q43358	269	66256	6,3	54375	6,6	2,7	K ELSFGVPSK L R FAENSPPLK G R NNPYYFPK R K LEEILEEQR G K GTITFVTHENK E R EKLEEEILEEQR G K LTIAVLALPVNSPGK Y K LNQGAIFPHYNSK A K DQPLNAVAFGLNAGNQR I R GTVSVYPAGSTVYVVSQDNQEK L K APLSPGDVFPVAPAGHAVTFFASK D
1736	ATPase beta subunit	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Q9ZR78	88	59512	6,1	31286	5,7	3,2	K AHGGFSVFAGVGER T R EAPSFVEQATEQQILVTGIK V K NLQDIIALGMDELSEDDKLTVAR A + Oxidation (M) K GSITSVQAIYVPADDLTDPAPATTFHAHLDAITVLSR Q
1770	H+-transporting two-sector ATPase	<i>Oenothera villosa</i>	Q7M2G6	569	53323	6,5	58306	6,1	5,5	K KGSITSVQAIYVPADDLTDPAPATTFHAHLDAITVLSR Q K APGIER K R VGSAACLK A R ELIGDR Q R QMSLLLR R + Oxidation (M)

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
1853	V-type proton ATPase	<i>Gossypium hirsutum</i>	P31405	276	68522	5,4	71884	5,3	1,8	R VISVGDGIAR V
										K AVDSLVIPIGR G
										R TGSIVDVPAGK S
										R KIELDAFLK E
										R AAELTTLLESR I
										R VVDALGVPIIDGR G
										K QPYAPLPIEK Q
										R EAFPGDVFYLHSR L
										R ITNFYTNFQVDEIGR V
										R EVAAFQAQFGSDLDAAATQALLNR G
										K FCFPFYK S
										R LGDLFYR L
										K TVISQALS K Y
K LAADTPLL TGQR V										
K DTVLELEFGQVK K										
K ITYIAPPGQYSLK D										
R EDDLNEIVQLVKG D										
K FEDPAEGEEALVAK F										
R TTLVANTSNMPVAAR E + Oxidation (M)										
R EASIYTGITIAEYFR D										
R LAEMPADSGYPAYLAAR L + Oxidation (M)										
R LTTFEDSEKESEYGYVR K										
1880	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LT69	125	62122	8,4	64821	5,4	3,9	K YVGVSLVKG T
										K ISLCDALIVR S
										R GGVIDEEALLR A
2171	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	<i>Triticum aestivum</i>	Q41534	563	59249	5,6	57866	5,0	3,4	K IGLFGGAGVGK T

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos			
2293	Pyridoxal-5-phosphate-dependent enzyme	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SVD9	361	34346	5,7	32165	5,4	2,5	K DVTLEIGK T	
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
											K LIITMPASMSLER R + 2 Oxidation (M)
											K LIITMPASMSLER R + 2 Oxidation (M)
											K IDAFVSGIGTGGTITGAGK Y
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
											R IGYSMIADAEK G + Oxidation (M)
2310	S-adenosylmethionine synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LUT2	92	42796	5,5	47535	5,5	0,5	K SIVASGLAR R	
											K TIFHLNPSGR F
											R FVIGGPHGDAGLTGR K
											K TNMVMVFEITTK A + 2 Oxidation (M)
											R DDADFTWEVKPLK S
											K VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK K
											R VHTVLISTQHDVETVTNDEIAADLK E
											R DDADFTWEVKPLK S
											R DDADFTWEVKPLK S
											R DDADFTWEVKPLK S
2363	phosphoglycerate mutase	<i>Zea mays</i>	P30792	136	60620	5,3	66175	5,0	1,6	R DALLSGKFDQVR V	
											R GWDQAQVLGEAPYK F

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos	(continuação)	
<b>Processos Celulares</b>										
319	Metacaspase 1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Q8H272	72	44864	4,8	61788	4,7	2,3	KSLPLSTLIEILK Q
	Cell division protein FisZ	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RY62	56	50522	4,8				K LAYNLIPFPR L K LAYNLIPFPR L R VSEQFTVMFK R + Oxidation (M) R MMLTFSVFPSPK V + 2 Oxidation (M)
571	14-3-3 protein	<i>P. alba x P. tremula</i>	Q9LKK9	213	29596	4,8	32655	4,3	2,4	R YLAEFK S R NLLSVGYK N K LDVELTVEER N K DSTLIMQLLR D + Oxidation (M) K QAFDEAISELDTLSEESYK D
795	GTP-binding protein	<i>Musa balbiana</i>	Q1EP24	70	8471	5,3	19059	5,0	2,9	K LVLIGDSGVGK S K STIGVEFATR S
964	Heat shock protein hsp70		Q40980	383	71167	5,2	78322	5,1	2,8	K ELEGVCNPIAK M K VQQLQDFFNGK E  R TTPSYVAFTDTER L R IINEPTAAAIYGLDK K K ATAGDTHLGGEDFNR M R IINEPTAAAIYGLDKK A K SINPDEAVAYGAAVQAAILTGEDEK V
977	Putative glyoxalase	<i>Oryza sativa</i>	Q75GB0	48	29568	5,0	33998	4,7	4,0	M LHVYR V R EPGPLPGINTK I

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos		
1646	Glutathione S-transferase 4	<i>Brassica juncea</i>	Q7XZT1	69	24253	6,8	20142	6,5	4,3	K VLDVYEAR L K VPAFEDGDLK L
1965	70 kDa heat shock	<i>Vigna radiata</i>	Q5QHT3	326	71229	5,1	76371	4,9	2,2	R LSKEEIEK M K DAGVIAGLNVMR I + Oxidation (M) R EIAEAYLGTTVK N R MVNHFVQEFK R + Oxidation (M) K VQQLLDFFNGK E K MREIAEAYLGTTVK N + Oxidation (M) K ATAGDTHLGGEDFDNR M K NQVAMNPINTVDAK R + Oxidation (M) K GEGPAIGIDLGTTSYSCVGVWQHDR V
1967	Putative hsp70	<i>Oryza sativa</i>	Q6L509	408	70835	5,1	77340	5,0	7,2	K ELEGICNP IIAK M K NALENYAYNMR N + Oxidation (M) K VQQLLDFFNGK E R TTPSYVAFTDTER L K ATAGDTHLGGEDFDNR M R IINEPTAAAIAYGLDKK A
<b>Transporte</b>										
562	Alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Vitis vinifera</i>	P93798	98	32486	4,9	33404	4,8	2,0	K TTTLLR V K GHLLNAGICQLCK G K VAQFAAQLEQYQK A
1622	Rab-type small GTP-binding protein	<i>Cicer arietinum</i>	Q9SXT5	72	22487	5,5	18539	5,5	8,4	K SCLLLR F K LLLIGDSGVGK S

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos
<b><u>Estrutura e Organização da Estrutura</u></b>								
382	Actin	<i>Ricinus communis</i>	Q5VKJ6	326	41668	5,3 47176	4,9 1,3	K VVAPPER K R DLTDALMK I + Oxidation (M) R AVFPSIVGRPR H K IWHHTFYNELR V K NYELPDGGQVITIGAER F R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A K DLYGNIVLGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M) R KDLYGNIVLGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M)
383	actin	<i>Pisum sativum</i>	P94096	559	41669	5,3 46002	5,1 0,8	R GILTLK Y R AVFPSIVGRPR H K AEYDESGPSIVHR K K TYELPDGGQVITIGAER F K LAYIALDYEQELETAK T R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A R KDLYGNIVLGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M) R TTGIVLDSGGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILR L
482	Caffeic acid O-methyltransferase	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWC1	446	34019	5,9 40351	5,4 0,7	R LYGLAPVCK F K DAVLEGGIPFNK A K HVGGMFVSVPK G + Oxidation (M) K ILMESWYLYK D + Oxidation (M) K AAIELDLLEIMAK A + Oxidation (M) R LLASYSVLTCTLR N K AYGMTAFEYHGTDPR F + Oxidation (M)



## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos
1524	Alpha-tubulin	<i>Betula verrucosa</i>	Q9M3T2	381	4,9	54057	4,8 0,4	K NEDGYSIAALNLMNQDK I + Oxidation (M) K NVIHIDICIMLAHNPGGKE + Oxidation (M) K VIVAECVLPVYPTDSLTK N K GINFDLPHVIEDAPPLPGVK H K GFEGLETVDVGGGTGAVLSMIVAK Y + Oxidation (M) K FDLMYAK R + Oxidation (M) K EIVDLCCLR I R QLFHPEQLISGKE R LYSQVSSLTASLR F R TIQFVDWCPTGFK C R SLDIERPTYTNLNR L R AVFVDLEPTVIDEVR T R IHFMLSSYAPVISAEK A + Oxidation (M) R FDGALNVDVTEFGTNLVPYPR I
2341	Stress-induced protein sti1-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L724	137	6,1	74845	5,7 2,4	K LGALPEGLK D R VMKALGVLLNVK F + Oxidation (M) K DFEPAIETFQK A
<b>Vias de Informação</b>								
216	Initiation factor 3d	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C5Y8	58	47625	5,2 76757	5,3 1,5	K IGFVSR V K LFFDKR D R GAVLATELK N K SIVDLCMK L + Oxidation (M) R SVYSWDIVIQR V
376	AAA ATPase, central region; 26S proteasome subunit P45	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S6T1	339	46580	5,4 52711	5,2 2,4	R YVILPK D R VVGSEFVQKY R LVFGVCTAK M R GVLLYGPPTGKT

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos	(continuação)
563	20S proteasome	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Q8H1Y2	211	29877	5,1 32409	4,8 1,4		KAVANHHTAAAFIR V R ADTLDPALLRPGR L R EAVELPLTHHELYK Q K ISAAEISAICQEAGMHAVR K K ENAPAIIFIDEVDAIATAR F K MNLSDEVLDLEDYVSRPDK I + Oxidation (M)  R LVVQLADK A R LFCQVEYAMEAVK Q K VDDHIGVAIAGLTADGR V R NQYDIDVTTWSPAGR L
706	20S proteasome subunit C8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23715	150	27377	5,9 23541	6,3 5,5		R YFGAAIGK G R DGPQLYMIEPGSGISYR Y + Oxidation (M)
711	proteasome endopeptidase	<i>Glycine max</i>	O48551	161	27392	5,8 23600	6,0 2,5		K AAGITSIGVR G K AAGITSIGVR G R LFCQVEYAFK A R HITFSPGGR L R VLTIDEIDEHLTAISERD -
726	Proteasome subunit alpha	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L4A7	143	25733	5,5 22841	5,3 2,3		K EPIPVTQLVR E R VLTPAEIDDYLAEEV - K LVQIEHALTAVGGQTSGLGIK A
728	Proteasome alpha subunit	<i>Solanum tuberosum</i>	Q3HVM0	119	28065	5,4 22727	5,5 1,7		K DGVVLVGEK K R TTIFSPGGR L K AAAIGANNQAAGSILK Q

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O15/ C15	Peptídeos
731	serine carboxypeptidase	<i>Oryza sativa</i>	Q7G6W4	48	43697	5,0 22612	4,9 2,2	RIASVAETGPLK F
781	proteasome endopeptidase	<i>Nicotiana Tabalaacum</i>	P93395	119	25183	5,2 19251	5,2 2,2	R SGSAADSQIVSDYVR Y R YFLHQHTIQLGQPATVK V
1632	DEAD box RNA helicase	<i>Pisum sativum</i>	Q8H1A4	132	46551	5,4 20707	6,0 3,2	R DELTLEGIK Q R VLIITDILLAR G K RDELTLEGIK Q R ILSSGVHVWVGTPGR V K IQGVFSATMPPEALEITR K + Oxidation (M)
1758	Cytosol aminopeptidase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RWG8	210	59856	7,6 56997	5,5 3,5	K TGPGCSIELMK F + Oxidation (M) K GLTFDSGGYNIK T K FDMGSSAAVLGAAK A + Oxidation (M)
1835	probable chaperonin	<i>Pisum sativum</i>	P08927	395	62984	5,9 67490	4,9 2,0	R ALSYPLK L R EEVGLTLDK A K LADLVGVTLGPK G K VVAAGANPVLITR G R GYISPYFVTDSEK M K EVELEDPVENIGAK L K YEDLMAAGIIDPTK V + Oxidation (M) K AAVEEGIVVGGGCTLLR L K SQYLLDIALLTGGTVIR E K SAENSLYVVEGMQFDR G + Oxidation (M) K LSGGVAVIQVGAQTETELKEK K K TNDLAGDGTTSVLAAGLIAEGVK V
2047	endopeptidase Clp	<i>Solanum</i>	P31542	262	102241	5,9 93453	5,3 3,3	K SLVTEELK Q

## ANEXO O

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	O15/ C15	Peptídeos	(conclusão)
		<i>Lycopersicon</i>						K EIADIMLKE + Oxidation (M) K AQITALIDK N R VLELSLEEAR Q K AIDLIDEAGSR V K VIMLAQEEAR R + Oxidation (M) R VLENLGADPSNIR T R GSGFVAVEIPFTPR A K MPTLEEYGTNLTK L + Oxidation (M) K ALAAAYFGSEEMIR L + Oxidation (M) K LIGSPPGYGYTEGGQLTEAVR R	

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pl teórico, peso molecular e ponto isoeletrico teóricos; PM/pl exp, peso molecular e ponto isoeletrico experimentais; O15/C15, razão entre o volume do spot no tratamento O15 e o volume do spot correspondente no material controle C15

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
303	Phosphoglucose isomerase	<i>Dioscorea tokoro</i>	Q23904	87	62748 6,3	64170 6,4	1,6	R AILPYSQALEK F R FLANVDPIDVAR S K TTTTAETMLNAR T + Oxidation (M) R EWISAALGPAAVSK H
329	Vacuolar ATPase subunit B	<i>M. crystallinum</i>	Q8GUB5	602	54127 5,0	60860 4,8	0,8	K YQEIVNIR L K TLDQYYSR D K TPVSLDMLGR I + Oxidation (M) K FVAQAGAYDTR T R TVSGVAGPLVILEK V K AVVQVFEGTSGIDNK Y R QIYPPINVLPSLSR L R IALTTAEYLAYECGK H K IPLFSAAGLPHNEIAAQICR Q
334	Putative enolase	<i>Oriza sativa</i>	Q5VNT9	37	47938 5,4	58159 5,1	2,2	K LGANAILAVSLAVCK A K VNQIGSVTESIEAVR M K KIPLYQHIANLAGN K K IPLFSAAGLPHNEIAAQICR Q
405	67KD PROTEIN vicilin precursor	<i>Theobroma cacao</i>	Q43358	598	66256 6,3	49867 6,4	1,6	K ELSFGVPSK L R FAENSPPLK G R NNYYFPK R K LEEILEEQR G K GTTFVTHENK E K GTTFVTHENK E R EKLEEEILEEQR G K LTIAYLALPVNSPGK Y

### Metabolismo e Energia

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
445	Cytosolic phosphoglycerate kinase 1	<i>Populus nigra</i>	O82159	331	42669 5,7	43740 5,9	7,4	K LNQGAI FVPHYNSK A R EQEEEEEEETFGFEQQVK A K APLSPGDV FVAPAGHAVTFFASK D
470	Adenosine 5-phosphotransferase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	124	37836 5,3	40047 5,0	1,2	K LNNAILAEDK H R SLIANLSAANCYK V R SLIANLSAANCYK V
475	Glyceraldehyde-3-phosphatase		P26519	79	36372 7,5	40453 6,4	1,5	R AASFNIISATGAAK A R VPTVDVSVVKKKTAR L K AVGKVLPA L
490	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	<i>Brassica napus</i>	Q84JA9	147	36246 6,1	39446 5,8	1,3	K TDGLFLK C R SLNLTLR K K TRYDDVNLITIR E M ATLPFGDGIGPEIAESVK K R ENTEGEYSGLEHQVVR G

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/C30	Peptídeos
512	Probable fructokinase-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M1B9	202	35044	5,1 36391	4,9 1,6	R EFMFYR N R FANACGAIITTK K K APGGAPANVAISR L
532	olase	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	71	47719	5,3 34953	4,4 1,6	K VNIQISVTESIEAVR M R AAVPSGASTGIYEALRL D R IEELGAEAVYAGANFR T
541	malate dehydrogenase	<i>Citruillus lanatus</i>	P17783	191	36201	8,9 35130	5,7 2,1	K LFGVTTLDVVR A R DDLFNINAGIVK S K VAVLGAAGGIGQPLALLMK L + Oxidation (M)
544	Phenylcoumaran benzylic ether reductase	<i>Populus trichocarpa</i>	O65881	92	34007	5,7 35130	6,1 2,1	K FIVEASAK A K EDDIGTYTIK A K ILIIGGTGYIGK F
651	Rubisco large chain	<i>Skimmia anquetilla</i>	O98559	69	49721	6,1 27378	6,2 1,4	K DDENVNSQPFM R K EIKFGF Q K DDENVNSQPFMR
715	Triosephosphate isomerase	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Q38BU3	63	26.72	5,1 21830	5,5 1,1	K LGDDEFHMLAGILK Q K VATPEQAQEVHDAVR K K NCGDLATQPDID
747	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rhoeas</i>	Q2P9V1	149	24417	5,9 21775	5,9 1,5	K VKYELDK K R VLYSSVYVPHNYGFIPR T K VKYELDK K

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos		
1280	S-adenosylmethionine synthetase 3	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	315	39513	6,2	47655	5,7	0,7	R VLYSSVVVYPHNYGFIPR T K IIAVCVDDPEFR H Nitrosyl (C) R SGAYIVR Q
1309	Argininosuccinate synthase	<i>Oryza sativa</i>	Q2QVC1	165	52193	6,6	50883	5,4	2,1	R WFDPLR Q R EWDITGR E K YAEVYAGR W R ELESITLDR E K VVLAYSGGLDTSVIVPWLR E
1337	Putative phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZAA5	48	64559	6,5	64985	5,5	1,5	K TLAVMGFGK V + Oxidation (M)
1357	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LT69	46	62122	8,4				K ISLCDALIVR S R GGVIDEALLR A
	glutamam-ammونيا ligase	<i>Nicotiana glauca</i>	P12424	37	38893	5,5	41906	5,0	1,1	K IIAEYIWIGGGMDLR S + Oxidation (M) R GNNILVMCDAYTPAGEPIPTNK R + Oxidation (M)



## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos		
								T30	C30	
1357	glutamate-ammonia ligase	<i>Lupinus angustifolius</i>	P14636	96	34441	5,8			R YILER I R DIVDSHYK A M SLLSDLINLNSDSTTEK I	
1853	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>Gossypium hirsutum</i>	P31405	276	68522	5,4	71884	5,3	0,6	K FCFPYK S R LGDLFYR L K TVISQALSK Y K LAADTPLL TQQR V K DTVLELEFGGVK K K IYIAPPGQYSLK D R EDDLNEIVQLVKG D K FEDPAEGEEALVAK F R TTLVANTSNMPVAAR E + Oxidation (M) R EASIYTGITIAEYFR D
1880	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LT69	125	62122	8,4	64821	5,4	1,8	R LAEMPADSGYPAYLAAR L + Oxidation (M) R LTTFEDSEKESEYGYVR K K YVGVSLVKG T K ISLCDALIVR S K ISLCDALIVR S K ISLCDALIVR S K ISLCDALIVR S K ISLCDALIVR S R GGVIDEALLR A
1944	11S storage protein precursor	<i>Coffea arabica</i>	Q9ZNY2	120	55119	8,1	10412	4,6	1,5	K AGNQGFYVAFK T K IPIILSSQLLSAER G

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos	(continuação)
1975	RuBisCO large subunit	<i>Hypocoum imberbe</i>	O47277	188	50381 6,1	80121 4,5	3,6	R AVYECLR G K DTDILAAFR V R EITSGFVDLLR D R FLFCAEAIYKA R EITIGFVDLLR D	R NIFSGFDDQLLADAFNVDLK I
2166	Putative phosphoglycerate mutase	<i>Oriza sativa</i>	Q5QMK7	144	60.79 5,4	66142 5,0	2,2	K LVDLALASGK I R TFACSETVK F R DAILSGKFDQVR V R GWDAQVLGEAPYK F	
2171	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	<i>Triticum aestivum</i>	Q41534	563	59249 5,6	57866 5,0	2,6	K IGLFGGAGVGK T K THDFLPIHR E K VVDLLAPYQR G R TIAMDGTEGLVR G + Oxidation (M) R VGLTGLTVAEHFR D K TVLIMELINNVAK A + Oxidation (M) R FTQANSEVSALLGR I R LVLEVAQHLGENWVR T R DAEGQDVLFFIDNIIFR F R FDEGLPPILTALEVLDNSIR L	
2270	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rheas</i>	Q2P9V1	89	24417 5,9	23959 5,0	1,8	R FFEDYKK N K IIAVCADDPEYR H R VLYSSVVYPHNYGFIPR T	

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
2291	Putative chloroplast cysteine synthase 1	<i>Nicotiana Tabelaaacum</i>	Q3LAG6	94	38895 4,8	33912 5,4	1,9	K AFGAELVLTDPAK G K LILTMPASMSLER R + 2 Oxidation (M) K IDILVAGIG T
2298	Ribulose biphosphate carboxylase /oxygenase activase	<i>Nicotiana Tabelaaacum</i>	Q40460	107	48754 8,4	26765 5,6	2,4	K LVVHITK N K FYWAPTR E R IGVCTGIFR T K VPLILGIWGGK G R TDNVPAEDVVK I R VPIIVTGNDFSTLYAPLIR D
570	14-3-3 protein	<i>Manihot esculenta</i>	Q1AP39	167	29832 4,8	33320 4,3	2,9	R YLAEFK T R IISSIEQK E R KVLSVAYK N  K VFYLK(M) K SIAESTLLAYK S
795	GTP-binding protein, putative	<i>Musa balbiana</i>	Q1EP24	70	8471 5,3	19059 5,0	1,2	K LVLIGDSGVGK S K STIGVEFATR S
825	Heat shock 70 kDa protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q08276	97	73077 6,6	16893 5,2	1,8	K AVITVPAYFKDQQR Q K VQEIVSIIFGK S R SL KDVDEV D
874	Small heat-shock protein	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Q8L5D5	144	18171 5,5	12691 5,5	4,4	K ADLPLGLK K R ILQISGER S K AAMENGVLTVPK E + Oxidation (M)

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
951	High molecular weight heat shock	<i>Malus sylvestris</i>	Q9M6R1	354	71216	5,2 10596	5,4 1,4	K DAGVIAGLNVLR I R FEELNMDLFR K + Oxidation (M) K NALENYAYNMR N + Oxidation (M) K VQQLLDQDFNKG E
962	Heat shock protein 70	<i>Cucumis sativus</i>	Q9M4E6	220	70828	5,3 75604	4,9 1,2	K DAGVIAGLNVMR I + Oxidation (M) K VQQLLDQDFNKG E R TTPSYVAFTDTER L R IINEPTAAAIYGLDK K K ATAGDTHLGGEDFDNR L K NAVVTVPAYFNDSQR Q R IINEPTAAAIYGLDKK A K SINPDEAVAYGAAVQAAILSSEGNEK V
1965	70 kDa heat shock	<i>Vigna radiata</i>	Q5QHT3	326	71229	5,1 76371	4,9 1,4	R LSKEEIEK M K DAGVIAGLNVMR I + Oxidation (M) R EIAEAYLGTTVK N R MVNHFVQEFK R + Oxidation (M) K VQQLLDQDFNKG E K MREIAEAYLGTTVK N + Oxidation (M) K ATAGDTHLGGEDFDNR M K NQVAMNPINTYFDAK R + Oxidation (M) K GEGPAIGIDLGTTYSCVGVWQHDR V
<b>Processos Celulares</b>								
562	Alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Vitis vinifera</i>	P93798	101	32486	4,9 33404	4,8 4,1	K AKELEEDDLT - K VAQFAAQLEQYQKA
	alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Elaeis</i>	B3TM20	57	32555	5,0		K AKELEEDDLT -

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
2284	GTP-binding protein	<i>guineensis</i>	Q9SN35	236	23870	5,2 21612	5,3 1,6	R YQELDPTFSGTR E R AITSAYYR G R NEFSLESK S K VVLIGDSGVGK S K STIGVEFATR S R ADDDYDYLFK V K AQIWDTAGQERY R GAVGALLVYDVTR H
		<i>Arabidopsis thaliana</i>						
381	Actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q7XZJ0	649	41675	5,3 46351	5,0 1,3	R LDLAGR D K VVAPPER K R DLTDALMK I  R DLTDALMK I + Oxidation (M) K AGFAGDDAPR A K EITALAPSSMK I K EITALAPSSMK I + Oxidation (M) R GYMFTTTAER E R GYMFTTTAER E + Oxidation (M) R AVFPSIVGRPR H K GEYDESGPSIVHR K K IWHHTFYNELR V R LDLAGRDLTDALMK I R GYMFTTTAEREIVR D + Oxidation (M) K NYELPDGQVITIGAER F K LAYVALDYEQELETAK S K YPIEHGIVSNWDDMEK I R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A

### Estrutura e Organização da Estrutura

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos	(continuação)	
382	Actin	<i>Isatis tinctoria</i>	Q5FZP3	327	41819	5,3	47176	4,9	1,4	K KDLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M) R TTGIVLDSGDGVSHTYPIYEGYALPHAILR L K VVAPPER K K AGFAGDDAPR A K EITALAPSSMK I R GYMFTTTAER E K GEYDESGPSIVHR K K NYELPDGGQVITIGAER F R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M) R TTGIVLDSGDGVSHTYPIYEGYALPHAILR L
383	Actin	<i>Isatis tinctoria</i>	Q5FZP3	527	41819	5,3	46002	5,1	1,5	K AGFAGDDAPR A K EITALAPSSMK I K EITALAPSSMK I + Oxidation (M) R GYMFTTTAER E + Oxidation (M) R AVFPSIVGRPR H K GEYDESGPSIVHR K K NYELPDGGQVITIGAER F K YPIEHGIVSNWDDMEK I R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M
490	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus globulus</i>	O64969	423	38806	5,7	39446	5,8	1,3	R FVVDVVGSK L R FVVDVVGSK L K GLTSQIEVIK M K SITGSFIGURASMK E

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos		
674	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	<i>Eucalyptus gunnii</i>	O04854	238	27914	5,0	25323	4,5	1,5	K SITGSFIGURASMK E + Oxidation (M)
										R NTGPEDLYIK V
										R FVVDVVGSKLD -
										K MDYVNTALER L
										K MDYVNTALER L + Oxidation (M)
										K ETEEMLEFCK E + Oxidation (M)
										R GGILGLGGVGHMGVK I + Oxidation (M)
										K NDLGMSHYPMVPGHEVGEVLEVGSEVTK Y + 2 Oxidation (M)
										R LIELVK V
										K ILAMDINR E
K ILAMDINR E + Oxidation (M)										
R DFVLELNK A										
R ENYELGLPVIQK A										
R EGPALPILDQLIEDGK Q										
R IEICMLPVGDGITLCR R + Oxidation (M)										
K HPWNIMTTSADEGQFLNMLLK L + 2 Oxidation (M)										
689	Tubulin alpha chain	<i>Glycine max</i>	Q2TFP2	77	49692	5,0	24818	4,8	0,6	R AVFVDLEPTVIDEVR C
										R LISQISSLTTSR F
1744	Alpha-tubulin	<i>Ceratopteris richardii</i>	Q5G276	59	35576	5,6	39646	4,9		R LISQVISSLTASLR F
										K LADNCTGLQGLFVHFHAVGGGTGGLASLILLER L
2486	Alpha-tubulin	<i>Nicotiana glauca</i>	Q8VXC9	186	49753	4,9	58012	6,0	0,6	K EIVDCLDR I
										R LISQVISSLTASLR F
										R SLDIERPTYTNLNR L
										R AVCMISNSTSVAEVFSR I

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	T30/ C30	Peptídeos
2507	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 2	<i>Eucalyptus gunnii</i>	P31655	133	38792	5,7 43411	5,7 1,3	K TVGGDDDAFNFFSETGAGK H R FVVDVWGSK L K GLTSQIEVIK M R FVVDVWGSKLD - R DSPGVLSPTYSLR N
<b><u>Vias de Informação</u></b>								
216	Initiation factor 3d	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C5Y8	58	47625	5,2 76757	5,3 1,6	K IGFVSR V K LFFDKR D R GAVLATELK N K SIVDLCMK L + Oxidation (M) R SVYSWDIVIQR V
239	Aspartyl-tRNA synthetase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S114	230	61035	6,0 73164	6,3 0,7	K LGQLVLEK Y R TPANQGIFR I R GEEIISGAQR I R VFEIGPVFR A K AIQAGEQLVR V K AIPTLPINIEDAAR S R HLCEFTGLDVEIMEIKK H + Oxidation (M)
363	DNA-binding protein GBP16	<i>Oryza sativa</i>	Q5W6H1	75	43170	6,6 53785	6,1 0,5	K AADVLAANAATAAEVALR L K AWLALGTK T K RAPRLGLECMNH E
400	translation elongation factor EF-Tu.B	<i>Nicotiana</i>	Q43364	126	52688	5,7 46586	5,3 0,6	K EHILLAK Q



## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	Peptídeos
		<i>sylvestris</i>						K EHILLAK Q K FEALVYVLK K R NTTVTGVEMFQK I K QVGVPNMVFLNK Q R HYAHVDCPGHADYVK N R GITINTATVEYETENR H
547	NmrA-like	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S083	88	36664	5,8 34690	5,3 1,2	K AGHPTFALVR E R FFPSEFGNDVDR S
563	20S proteasome alpha 6 subunit	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Q8H1Y2	211	29877	5,1 32409	4,8 0,7	R LVVQLADK A R LFGVEYAMEAVK Q R LFGVEYAMEAVK Q + Oxidation (M)
726	Proteasome	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L4A7	143	25733	5,5 22841	5,3 1,1	K VDDHIGVAIAGLTADGR V R NQYDTDVTTWSPAGR L K EPIPVTLQVR E R VLTPAEIDDYLAEEV - K LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK A
728	Proteasome alpha subunit	<i>Solanum tuberosum</i>	Q3HVM0	119	28065	5,4 22727	5,5 1,2	K DGVVLVGEK K R TTIFSPEGR L K AAAAIGANNQAAQSILK Q
781	proteasome endopeptidase complex	<i>Nicotiana Tabatacaum</i>	P93395	119	25183	5,2 19251	5,2 1,9	R SGSAAADSQIVSDYVR Y R YFLHQHTIQLGQPATVKV
1164	Elongation factor-like protein	<i>Solanum</i>	Q3HVL1	55	24608	4,6 27795	4,3 1,4	K LVPVGYGIK K

## ANEXO P

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal aos 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T30/ C30	(conclusão)		
								Peptídeos		
		<i>tuberosum</i>							K LASSFPG K	
1843	Hypothetical protein	<i>Rubus idaeus</i>	Q9SM53	41	36618	5,4	52844	4,5	0,6	K FFQDIYK D

Função não definida

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pi teórico, peso molecular e ponto isoeletrico teóricos; PM/pi exp, peso molecular e ponto isoeletrico experimentais; T30/C30, razão entre o volume do spot no tratamento T30 e o volume do spot correspondente no material controle C30

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução (continua)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O30/ C30	Peptídeos
<b><i>Metabolismo e Energia</i></b>								
301	Glutamine synthetase	<i>Hevea brasiliensis</i>	O22331	198	39504 5,8	41245 5,8	2,0	KGYFEDRR KGYFEDRR RHETADINTFLWGVANRG RGNNILVMCDAYTPAGEPIPTNKRH KIFSHPDVVAEEPWYGIEQEYTLQRD
	Glutamine synthetase	<i>Camellia sinensis</i>	Q4W8M5	100	39250 5,8			KGYFEDRR KGYFEDRR KVIAYIWIGGSGMDLRS RHETADINTFLWGVANRG RGNNILVMCDTYTPGGPEIPTNKR (M) + Oxidation
	Glutamine synthetase	<i>Saccharum officinarum</i>	Q5MD09	88	40153 5,3			KGYFEDRR KGYFEDRR RTLGGPVDDPSKL RTLGGPVDDPSKLPKW RTLGGPVDDPSKLPKW RTLGGPVDDPSKLPKW RHETADINTFWGVANRG
	Cytosolic glutamine synthetase	<i>P. alba x P. tremula</i>	Q94L36	54	39332 5,5			KGYFEDRR KGYFEDRR RITEQAGVLSFDPKPIKGDWNGAGAHTNYSTKS
339	Endolase	<i>Oryza sativa</i>	Q5VNT9	124	47938 5,4	61106 5,7	2,5	KLGANAILAVSLAVCKA KVNQIGSVTESIEAVRM KVNQIGSVTESIEAVRM

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi		PM/pi exp	O30/ C30	Peptídeos
					teórico	exp			
	Enolase	<i>Gossypium barbadense</i>	Q6WB92	202	47731	6,2			KVNQIGSVTESIEAVRM KYYQDATNVGDEGGFAPNIQENKE KHIANLAGNSKL KLGANAILAVSLAVCKA RAAVPSGASTGIYEALRLD
552	nadh dependent thioredoxin reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q99243	178	35314	5,8	39209	6,3 1,7	KVSGLFFAIGHEPATKF RGISACAVCDGAAPIFRN RNKPLAVIGGGDSAMEEANFLTKY + Oxidation (M)
	Putative NADPH-thioredoxin reductase	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZFU6	173	34676	6,2			KGVFAAGDVQDKK RGISACAVCDGAAPIFRN RNKPIAVIGGGDSAMEESNFLT KY
651	NADH2 dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O22769	72	28389	8,1	26334	6,5 3,3	KVIEVAPIRV KPPHGTQN KPDLPWEFSEANGSK
654	Ripening-associated protein	<i>Musa acuminata</i>	O22323	46	19701	7,9	25035	6,7 2,4	KSYPTVSEYQKA
	Ascorbate peroxidase	<i>Brassica oleracea</i>	Q8W3J5	41	27560	5,5			KYADDEEAFFADYAEHLKL
	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	<i>Oryza sativa</i>	Q10N21	40	27156	5,4			KTGGPFGTMKT + Oxidation (M) KSCAPLMLRL + Oxidation (M)

(continuação)

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposita em relação à madeira normal após 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O30/C30	Peptídeos
662	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Lycopersicon Lycopersicon esculentum</i>	Q315C4	98	27408	27031	6,4 1,8	KYAADEDAFFADYAEHLKL KMGSLSDQDIVALSGAHT KAELAHGAN
675	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Fragaria ananassa</i>	Q9S7F5	98	27297	26855	5,7 4,8	KNCAPLMLRL + Oxidation (M) RLAWHSAGTYDVKT
	Haem peroxidase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1T679	60	31885	6,3		RNCAPLMLRL + Oxidation (M) RLAWHDAGTYDAKT
788	Putative adenosylhomocysteinase	<i>Trifolium pratense</i>	Q2PEU5	189	53374	19282	6,3 1,9	RLYGVSEETTGVKR KGETLQEYWWCTERA RALDWGPGGGPDLIVDDGGDATLLIHEGVKA
	Aldehyde dehydrogenase	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	Q1AFF3	105	57.09	8,1		RYYAGWADKI KSNLKPVTLELGGKS
	Adenosylhomocysteinase	<i>Medicago truncatula</i>	Q84RD8	96	53197	5,7		KSGIIVLAEGRL KVAVVCGYGDVGGK RIVGVSEETTGVKR
1354	Putative enolase	<i>Oryza sativa</i>	Q5VNT9	109	47938	61306	5,6 4,5	KLGANAILAVSLAVCKA KVNQIGSVTESIEAVRM RVAKAISEKT
	Putative enolase	<i>Oryza sativa</i>	Q5VNT9	80	47938	5,4		KLGANAILAVSLAVCKA KVNQIGSVTESIEAVRM
1387	UGPase PC	<i>Pyrus</i>	Q8S9B8	249	50751	60311	6,2 1,8	KMEIIPNPKE + Oxidation (M)

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposita em relação à madeira normal após 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O30/ C30	Peptídeos		
		<i>pyrifolia</i>						KGGLTISYEGKV		
								KVLQLETAAGAAIKF		
								KVLQLETAAGAAIKFFDNGAIGNVPRA		
	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>P. tremula</i> x <i>P. Tremulooides</i>	Q2V506	186	51593	5,7		KMEIIPNPKE + Oxidation (M) KGGLTISYEGKV		
								KVLQLETAAGAAIKF		
								KSIPSIELDSLKV		
	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Cucumis</i> <i>melo</i>	Q19TV8	161	52062	6,7		KVGNFLSRF		
								KMEIIPNPKE + Oxidation (M) KGGLTISYEGKV		
								KSIPSIELDSLKV		
1582	Ascorbate peroxidase	<i>Cicer</i> <i>arietinum</i>	Q3SXT2	185	19266	4,6	24872	5,6	3,7	KGSDHLRD REDKPEPPEGRL KYAADEDAFFADYAEHLKL
	Ascorbate peroxidase	<i>Phaseolus</i> <i>limensis</i> ).	Q4ZJ68	62	13508	4,8				KALLTDPVFRPLVEKY KGSDHLRD
<b><u>Processos Celulares</u></b>										
224	Stress-induced protein sti1-like protein	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	Q8L724	71	60446	6,1	78613	6,0	2,7	RIVGVSEETTGTGKR RGDLTPEELKE KDFEPAIETFQKA KDFEPAIETFQKA KLGALPEGLKDAEKC
799	lactoylgutathione lyase, putative / glyoxalase I	<i>Arabidopsis</i>	Q2V4P7	99	26472	6,4	17657	5,7	4,0	RVLGMSLLKR

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O30/ C30	Peptídeos		
		<i>thaliana</i>						KDPDGYWIEIFDLKT		
	Lactoylglutathione lyase	<i>Cicer arietinum</i>	O49818	74	21088	5,3		RVLGMSLLKR KVSLEDFYSRV RFGFHIGITVDDTYKA		
874	heat shock protein	<i>Papaver somniferum</i>	Q40978	99	23818	6,4	13451	5,8	27,2	KETPEAHVFRA RVLQISGERR RVLQISGERR RIDWKETPEAHVFRA
	Class I heat shock protein	<i>Kandelia candel</i>	Q7XY72	77	15259	5,6				KADLPGLKK KADLPGLKK RILQISGERR
895	heat shock protein, 17.7K -	<i>common sunflower</i>	Q39930	98	17673	6,2	13429	5,5	3,4	KADLPGLKK RVLQISGERS KEEVKVEVEEGRV KAAMENGLTVPKA + Oxidation (M)
524	Putative Tic22	<i>Oryza sativa</i>	Q69YD5	64	32164	9,2	39.04	6,0	2,3	KQIMVGSLEDVLLK + Oxidation (M) RALTGTPVFTV RGSALSQIMVGS
975	Hypothetical protein	<i>Brassica campestris</i>	Q2V602	104	25401	4,9	34991	4,9	2,1	RFASIENCKA
	Ran GTPase binding									RDFADGELKDELFCIRF KFNEVAESEVEKEE

### Estrutura e Organização da Estrutura

## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O30/ C30	Peptídeos	(continuação)	
445	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus botryoides</i>	P50746	38679	5,7	44786	6,3	1,6	RVGTGIWGCCRS RVGTGIWGCCRS KLILTVINAPLQFISPMVMLGRK + 2 Oxidation (M) KEATDSLDIYIFDTIPVVHPLEPYLALLKL	
<b><u>Vias de Informação</u></b>										
711	20S proteasome alpha subunit	<i>Zea mays</i>	Q9FER4	122	27403	6,1	23414	6,3	4,2	RNEAAEFRF KEQEAINFLEKK KLLDQTSVTHLFPITKY KVPDKLLDQTSVTHLFPITKY
767	Chloroplast chaperonin 21	<i>Vitis</i>	Q6B4V4	97	26396	9,0	22551	5,7	1,8	KYTSLKPLGDRV KTAGGLLLEASKE KGSDGSDY
771	Putative proteasome 20S	<i>Brassica napus</i>	Q6R1M8	69	18626	7,7	20989	5,4	2,3	KAVSLAIARD RYFLHQHTIQLGQPATVKV RSGSAADSQVVVSDY
	proteasome endopeptidase	<i>Nicotiana Tabelaacum</i>	P93395	47	25183	5,2				RSGSAADSQIVSDYVRY RYFLHQHTIQLGQPATVKV RYFLHQHTIQLGQPATVKV
724	Proteasome subunit beta type-7-B	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q7DLS1	84	29617	6,7				KKTEVLLTKI RWTALTLLKK RWTALTLLKK KTEVLLTKITPLER

**Função não definida**



## ANEXO Q

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas da madeira oposta em relação à madeira normal após 30 dias de indução (conclusão)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	O30/ C30	Peptídeos
726	Hypothetical protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q38M52	112	25665	24349	5,7	3,2
								KEGFEGQISGKN KEGFEGQISGKN
								KLVQIEHALTAVGSGQTSLGIKA KLVQIEHALTAVGSGQTSLGIKA RVLTPAEIDY KESIPVTQLVRET

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pl teórico, peso molecular e ponto isoelétrico teóricos; PM/pl exp, peso molecular e ponto isoelétrico experimentais; O30/C30, razão entre o volume do spot no tratamento O30 e o volume do spot correspondente no material controle C30

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos		
<b><u>Metabolismo e Energia</u></b>										
303	Phosphoglucose isomerase	<i>Dioscorea tokoro</i>	O23904	87	62748	6,3	6,4	1,9	R AILPYSQALEK F R FLANVDPIDVAR S K TFTAETMLNAR T + Oxidation (M) R EWISAALGPAAVSK H	
395	Cytosolic phosphoglycerate kinase	<i>Populus nigra</i>	O82159	212	42669	5,7	45426	6,2	1,9	K YSLKPLVPR L R LSELLGVEVK I K IGVIESLLEK V K TFSEALDTTK T K ELDYLVGAVANPK K K GVTTIIGGGDSVAAVEK V K LASLAEVVYNDAFGTAHR A
445	phosphoglycerate kinase	<i>Populus nigra</i>	O82159	331	42669	5,7	43740	5,9	0,5	K YSLKPLVPR L K KPFAAIVGGSK V R LSELLGVEVK I K IGVIESLLEK V K TFSEALDTTK T K ELDYLVGAVANPK K K GVTTIIGGGDSVAAVEK V K LASLAEVVYNDAFGTAHR A
512	Fructokinase-like protein	<i>Cicer arietinum</i>	Q8LPE5	124	26109	5,0	36391	4,9	0,3	K FANACGAIITTK K R LPLWFSPEEAR N K FANACGAIITTKK G K VSDVELEFLTGSDK I K VFHYGSIISLIVEPCR S

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos
568	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Pisum sativum</i>	P34922	441	36609	6,6 33488	6,4 7,9	R SSIFDAK A K LTGMSFR V K VIISAPSK D K LTGMSFR V + Oxidation (M) K AATYDEIK A K KVIISAPSK D K YDSVHGQWK N K AGIALNDKFKV L R VPTVDVSWVDLTVR L R FGIVEGLMTTVHSITATQK T R FGIVEGLMTTVHSITATQK T + Oxidation (M)
717	triose-phosphate isomerase	<i>Coptis japonica</i>	P21820	153	27090	5,5 23072	6,1 1,4	K FFVGGNWK C K TAYALSQGLK V K VIACVGETLEQR E
908	ferredoxin-NADP reductase	<i>Solanum habrochaites</i>	Q4KQR7	97	35179	7,7 11.48	4,8 12,3	K TVSLCVK R R LDFAVSR E R LVYTNDKGEVK G R LYSIASSALGDFGDSK T
1280	S-adenosyl-L-methionine synthetase	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	Q56TU4	191	48386	6,1 47655	5,7 0,2	R SGAYIVR Q K SIVASGLAR R K TAAYGHFGR D K TIFHLNPSGR F R FVIGGPHGDAGLTGR K K TNMVMVFEITTK A R DDPDFTWEVWKPLK W R RCIVQVSYAIGVPEPLSVFVDSYGTGK I

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos
1357	glutamate-ammonia ligase	<i>Lupinus angustifolius</i>	P14636	96	34441 5,8	41906 5,0	1,4	R YILER I R DIVDSHYK A M SLLSDLINLNSDTTEK I
1534	Enolase	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	159	47719 5,3			K IPLYK H K IPLYK H K YNQLLR I K VNQIGSVTESIEAVR M R AAVPSGASTGIYEALRLR D R IEEELGAEAYAGANFR T K LVLVPAFNVINGGSHAGNK L R SGETEDTFIADLSVGLATGQIK T
1582	Ascorbate peroxidase	<i>Hordeum vulgare</i>	Q945R5	89	27639 5,1	23305 5,1	2,1	K TGGPFGTMK C + Oxidation (M) K NCAPLMLR L + Oxidation (M) K YAADEDAFFADYAEHLK L
1643	triose-phosphate isomerase	<i>Coptis japonica</i>	P21820	151	27090 5,5	24141 6,6	1,6	K FFVGGNWK C K TAYALSQGLK V K VIACVGETLEQR E
1646	triose-phosphate isomerase	<i>Coptis japonica</i>	P21820	162	27090 5,5	24141 6,6	1,6	K FFVGGNWK C K TAYALSQGLK V K VIACVGETLEQR E
1646	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SUJ4	50	42931 6,3	20142 6,5	1,8	K EAAWGLAR Y R TWSIPNGPSALAVK E K MVDVLEQNIVPGIK V + Oxidation (M)
1673	Isoflavone reductase-like protein	<i>Vitis</i>	Q3KN68	104	33886 5,8	33236 5,5	1,6	K EDDIGTYTIK A

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	T60/ C60	Peptídeos
		<i>vinifera</i>						K YTTVDEYLNQFV - K AVFNKEDDYGTYTIK A
1736	mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase	<i>Solanum tuberosum</i>	Q8L5C8	124	36167	8,5 31286	5,7 4,9	K SLCTAIK Y R LFGVTTLDVVR A K EGLEALKPELK S R DDLFNINAGIVK S
1737	Cytosolic cysteine synthase.	<i>Solanum tuberosum</i>	Q9FS27	104	34309	5,9 30051	5,7 1,8	R AFGAELVLTDPK G K LIVVIFPSFGER Y K LIITPSSMSLER R + Oxidation (M)
1758	leucyl aminopeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P30184	308	54509	5,7 56997	5,5 2,1	K LALVKG G R LPGLGSK R K SGVADMVNTGGR A + Oxidation (M) K TPGGCSIELMK F K TPGGCSIELMK F + Oxidation (M) K GLTFDSGGYNIK T K FDMGGSAAVLGAAK A + Oxidation (M) K TIEVNTDAEGR L
1770	UGPase PC	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Q8S9B8	92	50751	5,9 58306	6,1 1,5	K GGTLISYEGK V K VLQLETAAGAAIK F K FFDNAIGINVPR A
1775	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	<i>Oenothera villaricae</i>	Q7M2G6	534	53323	6,5 59045	6,1 0,5	K APGIER K R ELIJGDR Q K IELDAFLK E R VISVGDGIAR V K AVDSLVIPIGR G

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos	(continuação)	
1850	Putative phosphoglycerate mutase	<i>Oryza sativa</i>	Q5QMK7	165	60.79	5.4	68003	5,2	1,7	R TGSIVDVPAGK S R KIELDAFLK E R AAELTTLLESR I R VVDALGVPIIDGR G K TAIADTILNQK Q R ITNFYTNFQVDEIGR V R ATSESETLYCVVVAIGQK R
2166	Putative phosphoglycerate mutase	<i>Oryza sativa</i>	Q5QMK7	144	60.790	5,4	51011	4,7	1,6	R VHILTDGR D K LVDLALASGK I R TFACSETVK F R GWDAGVLGEAPYK F
2171	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	<i>Zea mays</i>	P19023	765	59103	6,0	57866	5,0	1,5	K IGLFGGAGVGK T K IGLFGGAGVGK T R EMIESGVK L K VVDLLAPYQR G R TIAMDGTEGLVR G + Oxidation (M) R TIAMDGTEGLVR G + Oxidation (M) K ESVKSFQGVLDGK Y R VGLTGLTVAEHFR D R VLNTGSPITVPVGR A K TVLIMELINNAK A K TVLIMELINNAK A + Oxidation (M) R LVLEVAGHLGENMVR T

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos		
2252	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	Q6K5G8	56	36568	7,7	16683	4,8	2,4	R DAEGQDVLFFIDNIFR F R EGNLYREMIESGVIK L + Oxidation (M) R IPSAVGYQPTLATDLGGLQER I K NLQDIILGMDELSEDDKLTVAR A + Oxidation (M)
2255	Plastidic aidolase	<i>Nicotiana paniculata</i>	Q9SXX4	238	42574	6,9	11366	4,6	6,3	K YDTVHGQWK H K DAPMFVVGVNEK E K DAPMFVVGVNEK E + Oxidation (M) R VPTVDVSVVDLTVR L R FGIVEGLMTTVAITATQK T + Oxidation (M) R TFEVAQK V K EAAWGLAR Y R ALQNTCLK T R ANANSLAQLGK Y R SAAYYQQGAR F R ATPDQVADYTLK L R LASIGLENTANR Q R TVVSIPNGPSALAVK E R GILAMDESATCGK R + Oxidation (M) K IVDVLHEQNIIVPGIK V
2270	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rhoeas</i>	Q2P9V1	89	24417	5,9	23959	5,0	3,0	R FFEDYKKN K IIAVCADDPEYR H R VLYSSVVVPHNYGFIPR T
2298	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1	<i>Nicotiana Tabalaacum</i>	Q40460	107	48754	8,4	26765	5,6	1,7	K LVVHITK N K FYWAPTR E R IGVCTGIFR T K VPLILGIWGGK G

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/C60	Peptídeos
2310	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Oryza rufipogon</i>	Q1H960	39	42590	5,7 47535	5,5 0,2	R TDNVPAEDWK I R VPIIVTGNDFSTLYAPLIR D K SIVASGLAR R R IPDKEILK I R FVIGGPHGDAGLTGR K
2503	ADH3 Alcohol dehydrogenase	<i>Brassica napus</i>	Q9XHT2	53	11319	5,9 47058	6,5 1,9	- IIGVDLNPNR F K FGVTEFVNPK X
<b><u>Processos Celulares</u></b>								
740	Glutathione S-transferase 4	<i>Brassica juncea</i>	Q7XZT1	127	24253	6,8 25495	6,6 2,2	K VLDVYEAR L K VPAFEDGDLK L K VPAFEDGDLKLFESR A R VNEWVAEITK R
874	Small heat-shock protein	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Q8L5D5	144	18171	5,5 12691	5,5 10,6	K ADLPGLK K R ILQISGER S K AAMENGVLTVTVPK E + Oxidation (M)
962	Heat shock protein 70	<i>Cucumis sativus</i>	Q9M4E6	220	70828	5,3 75604	4,9 0,4	K DAGVIAGLNVNMR I + Oxidation (M) K VQQLLODFFNGK E R TTPSYVAFTDTER L R IINEPTAAAIAYGLDK K K ATAGDTHLGGEDFDNR L K NAVTVPAYFNDSQR Q R IINEPTAAAIAYGLDKK A K SINDPEAVAYGAAVQAAILSGEGNEK V



## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	T60/ C60	Peptídeos	
1524	Cell division protein FisZ	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SU03	488	50207	54057	4,8	0,3	R LSVDYGK K K DVNAAVATIK T K EIVDLCLDR I R LVSQVISSLTASLR F R TIQFVWCPTGFK C R SLDIERPTYTNLNR L R IHFMLSSYAPVISA EK A R AVCMISNSTSVAEVFSR I R AVCMISNSTSVAEVFSR I + Oxidation (M) R QLFHPEQLISGKEDAANNFAR G R FDGALNVDVTEFQTNLVYPR I K AYHEQLSVAEITNSAFEPSSMMAK C + 2 Oxidation (M)
1527	Cell division protein FisZ	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SU03	155	50207	54331	4,8	0,3	K DVNAAVATIK T K EIVDLCLDR I R LVSQVISSLTASLR F R SLDIERPTYTNLNR L R AVFVDLEPTVIDEVR T
1627	carboxymethylenebutenolidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LDC7	89	25893	24818	5,4	1,7	R ASVNWLK S K ALIPDLYR G K VGLDTAEQAHL M
2341	Heat shock protein:STI	<i>Glycine max</i>	Q43468	124	63585	74845	5,7	1,7	K ALELDEDEDISYLTNR A KEKEAGNAAY KEYDKALETYREGL
381	Actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q7XZJ0	649	41675	46351	5,0	0,4	R LDLAGR D K VVAPPER K

### Estrutura e Organização da Estrutura

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos	(continuação)	
383 acin	<i>Pisum sativum</i>		P94096	362	41669	5,3	46002	5,1	0,6	R DLTDALMK I
										R DLTDALMK I + Oxidation (M)
										K AGFAGDDAPR A
										K EITALAPSSMK I
										K EITALAPSSMK I + Oxidation (M)
										R GYMFTTTAER E
										R GYMFTTTAER E + Oxidation (M)
										R AVFPSIVGRPR H
										K GEYDESGPSIVHR K
										K IWHHTFYNELR V
										R LDLAGRDLTDALMK I
										R GYMFTTTAEREIVR D + Oxidation (M)
										K NYELPDGGQVITIGAER F
										K LAYVALDYEQELETAK S
										K YPIEHGIVSNWDDMEK I
										R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A
										K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M
										K KDLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M)
										R TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHALR L
										K AGFAGDDAPR A
R GYTFTTSAER E										
K EITALAPSSMK S										
K EITALAPSSMK S + Oxidation (M)										
K EITALAPSSMK S + Oxidation (M)										
K AEYDESGPSIVHR K										
K IWHHTFYNELR V										
K TYELPDGGQVITIGAER F										
K LAYVALDYEQELETAK T										
R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A										

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/C60	Peptídeos		
460	Caffeic acid O-methyltransferase	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWC1	345	34019	5,9	40657	5,2	0,4	K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M K DLYGNIVLSGGSTMFFGIADR M + Oxidation (M) R TTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILR L  K ILETYK G K ILETYK G R LYGLAPVCK F K DAVLEGGIPFNK A K HVGGDMFVSPK G + Oxidation (M) K ILMESWYYLK D K ILMESWYYLK D + Oxidation (M) K AAIELDLLEIMAK A K AAIELDLLEIMAK A + Oxidation (M) R LLASYSVLTCTLR N K WICHDWSDDHCAK F K NEDGVSIAALNLMNQDK I + Oxidation (M) K VIVAECVLPVYPTSLATK N K GINFDLPHVIEDAPPLPGVK H
490	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus globulus</i>	O64969	423	38806	5,7	39446	5,8	2,2	R FVDVVGSK L K GLTSQIEVIK M K SITGSFIGURASMK E K SITGSFIGURASMK E + Oxidation (M) R NTGPEDLYIK V R VGTGIWVGCCR S R FVDVVGSKLD - K MDYVNTALER L K MDYVNTALER L + Oxidation (M) K ETEEMLEFCK E + Oxidation (M) R GGILGLGGVGHMGVK I

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos		
1519	Tubulin A	<i>Glycine max</i>	Q2TFP2	295	49692	5,0	54605	4,7	0,5	R LSVDYGK K R EDLAALEK D K DVNAAVATIK T K EIVDLCLDR V R LISQISSLTSLR F R SLDIERPTYTNLNR L
1548	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus globulus</i>	O64969	178	38806	5,7	37508	5,7	1,7	R FVDVVVGSK L K GLTSQIEVIK M K SITGSFIGURASMKE R NTGPEDLYIK V R VGTGIVVGCCR S R FVDVVVGSKLD - K MDYVNTALER L K MDYVNTALER L + Oxidation (M) R DPSGVLSPYTYSLR N K VLSCGICHSDIHQIK N
1600	Actin-depolymerizing factor	<i>Petunia hybrida</i>	Q541R6	67	16041	5,8	11451	5,5	0,7	R FLELK A R FIYK I
1693	membrane protein cp-wap13	<i>Vigna unguiculata</i>	O24548	139	39422	6,2	45084	6,2	1,9	K ASCISFK D R GYPFSLR E K ASNPFVNLK K K DINALEQHIK N K YYTIDDDCFVAK D

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	T60/ C60	Peptídeos
2176	Peroxidase	<i>Linum usitatissimum</i>	Q43782	90	38196	8,1 47775	4,8 1,5	K DIGQAAGLLR L K YQVALGRRD G K NLNPTDAVA L
<b><u>Vias de Informação</u></b>								
363	DNA-binding protein GBP16	<i>Oryza sativa</i>	Q5W6H1	43	43198	6,6 53785	6,1 0,4	K AWLALGTK T K IVEGLSHQLK Q K AADVLAANAATAAEVALR L
512	Fructokinase-like protein	<i>Cicer arietinum</i>	Q8LPE5	124	26109	5,0 36391	4,9 0,3	K FANACGAIITTK K R LPLWPSPEEAR N K VSDVELEFLTGSDK I K VFHYGSISLIVEPCR S
656	20S proteasome subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23715	113	27377	5,9 12691	5,5 3,2	R YFGAAIGK G R YFGAAIGK G K EGVIEVAK I R VFQIEYAAK A R DGPQLYMIIEPSGISYR Y + Oxidation (M)
702	Proteasome alpha subunit-like	<i>Solanum tuberosum</i>	Q3HVM0	141	28065	5,4 24385	5,6 2,8	K DGWLVGEK K R TTIFSEGR L K DGWLVGEKK V K AAAIGANNQAQSILK Q K IDDHVACAVAGIMSDANILINTAR V + Oxidation (M)
711	proteasome endopeptidase	<i>Glycine max</i>	O48551	254	27392	5,8 23600	6,0 1,5	R NEAAEFR F K AAGITSIGVR G R LFQVEYAFK A

## ANEXO R

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira de tração em relação à madeira normal após 60 dias de indução (conclusão)

Spot	Proteína	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	T60/C60	Peptídeos
<b><i>Fucão não definida</i></b>								
1832	AT5g20890/F22D1_60	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q940P8	92	57286	5,6	62257	0,7
								KVLVDISKV KSHAIKAFSR A R VDEITCAPR R K LIEEIMIGEDK L + Oxidation (M) R VLLGGGWPEMVMMAK E + 2 Oxidation (M) R LGLVTGGEIASTFDNPESVK L K VQDDEVGDDGTTSVVVLAGELLR E
2108	AP004053 NID	<i>Oryza sativa</i>	Q6K9N6	48	45091	6,0	51011	4,7
								1,4
								K MLGQILVTK Q K MLGQILVTK Q + Oxidation (M) K AILNIFGGIMK C + Oxidation (M) K GGTSIEDLAEKYPDMIK V + Oxidation (M)

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pl teórico, peso molecular e ponto isoeletrico teóricos; PM/pl exp, peso molecular e ponto isoeletrico experimentais; T60/C60, razão entre o volume do spot no tratamento T60 e o volume do spot correspondente no material controle C60

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/C60	Peptídeos
<b><u>Metabolismo e Energia</u></b>								
339	Enolase-like	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2VCI5	63	48032	7,5 57720	5,3 2,2	K LGANAILAVSLAVCK A R AAVPSGASTGIYEALRLR D
	Putative enolase	<i>Oryza sativa</i>	Q5VNT9	51	48136	5,4		K VNCIGSVTESIEAVR M K LGANAILAVSLAVCK A
567	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Solanum tuberosum</i>	P19595	122	51874	5,7 33657	5,1 2,6	K GGTLSYEGK V K VLQLETAAGAAIK F K YANSNIDIHTFNGSQYPR L
	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Hordeum vulgare</i>	Q43772	80	51644	5,2		K ATSDLLLVSQSDLYTLVDGYVIR N
	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>P. tremula x P. tremuloides.</i>	Q2V506	62	51593	5,7		K SIPSIELDSLK V K GGTLSYEGK V K VLQLETAAGAAIK F
	UGPase PC	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Q8S9B8	57	50751	5,9		K VLQLETAAGAAIKFFDINAIGNVPR A K GGTLSYEGK V K VLQLETAAGAAIK F
	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZGL5	55	51612	5,5		R TNPSNPSIELGPEFKK V K SIPSIVELDTLK V
654	Ascorbate peroxidase	<i>Vitis pseudobreticulata.</i>	Q1AFF4	152	27615	5,6 27172	6,4 3,1	K SYPTVSEEEK K R IAWHSAGTFDVK T K YAADEDAFFEDYKEAHLK L
753	Enolase	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	140	47719	5,3 21288	5,0 2,0	K VNCIGSVTESIEAVR M R AAVPSGASTGIYEALRLR D R IEEELGAEAVYAGANFR T R SGETEDTFIADLSVGLATGQIK T

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/ C60	Peptídeos	(continuação)	
	phosphopyruvate hydratase	<i>Ricinus communis</i>	P42896	118	47912	5,6		K V N Q I G S V T E S I E A V R M R A A V P S G A S T G I Y E A L E L R D R S G E T E D T F I A D L S V G L A T G Q I K T K S F A S E Y P I V S I E D P F D Q D D W E H Y S K L		
	enolase	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q9LEI9	85	47914	5,9		K L G A N A I L A V S L A Y C K A R I E E E L G A E A V Y A G A N F R T R S G E T E D T F I A D L S V G L A T G Q I K T		
1163	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Papaver rhoeas</i> .	Q2P9V1	204	24417	5,9	27795	5,0	2,2	R F F E D Y K K N R R F F E D Y K K R A I G L M P M I D Q G E K D D K I + 2 Oxidation (M) R V L Y S S W V Y P H N Y G F I P R T R T L C E D N D P L D V L L M Q E P V L P G C F L R I + Oxidation (M)
1582	Ascorbate peroxidase	<i>Hordeum vulgare</i>	Q945R5	170	27639	5,1	23305	5,1	2,4	K T G G P F G T M K C + Oxidation (M) K N C A P L M L R L + Oxidation (M) K Y A A D E D A F F A D Y A E A H L K L
	Ascorbate peroxidase	<i>Cicer arifinum</i>	Q9SXT2	170	19266	4,6				R E D K P E P P P E G R L R E D K P E P P E G R L K Y A A D E D A F F A D Y A E A H L K L
	ascorbate peroxidase	<i>Fragaria ananassa</i>	Q9S7F5	110	27297	5,7				K T G G P F G T M K Q + Oxidation (M) K N C A P L M L R L + Oxidation (M) R E D K P E P P P E G R L R E D K P E P P P E G R L R L A W H S A G T Y D V K T
	Ascorbate peroxidase	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q8GZP1	36	27429	5,8				R E D K P E P P P E G R L R E D K P E P P P E G R L R H A A E Q A H A A N N G L D I A V R L



## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/C60	Peptídeos		
	Haem peroxidase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1T679	38	31885	6,3		R NCAPLMLR L + Oxidation (M) R LAWHDAGTYDAK T		
	Ascorbate peroxidase	<i>Phaseolus lunatus</i>	Q4ZJ68	35	13508	4,8		K ALLTDPVFRPLVEKY		
1643	Triosephosphate isomerase	<i>Oryza sativa</i>	P48494	176	27063	5,4	24141	6,6	5,6	K VIACVGETLEQR E K GGAFTEVSAEMLVNLSPWVILGHSE R K KGGAFTEVSAEMLVNLSPWVILGHSE R + Oxidation (M)
	Triosephosphate isomerase	<i>Oenothera hybrida</i>	P48495	152	27132	5,5				K VIACVGETLEER E K GGAFTEVSAEMLVNLSPWVILGHSE R K KGGAFTEVSAEMLVNLSPWVILGHSE R + Oxidation (M)
	Putative triose-phosphate isomerase	<i>Gossypium barbadense</i>	Q7X9R3	86	11332	6,9				K VATPAQAQAEVHCELRLK W
2199	pyruvate dehydrogenase	<i>Pisum sativum</i>	P52904	150	38793	5,9	35307	5,1	5,4	R EGKDVTTTAFSK M R EGKDVTTTAFSK M K SNYMSAGQISVPIVFR G K VFLMGEEVGEYQGAYK V
	Pyruvate dehydrogenase	<i>Zea mays</i>	Q9ZQY2	140	40028	5,6				K VLTPYSSSEDAR G R EGKDVTTTAFSK M R EGKDVTTTAFSK M K SNYMSAGQISVPIVFR G K SNYMSAGQISVPIVFR G + Oxidation (M)
	Putative pyruvate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	Q6Z1G7	72	39945	5,7				R MAVPQVEDIVR A R MAVPQVEDIVR A + Oxidation (M)

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/ C60	Peptídeos			
2270	Ascorbate peroxidase	<i>Hordeum vulgare</i>	Q945R5	95	27639	5,1	23959	5,0	2,3	K TGGPFGTMK C + Oxidation (M)	
										K YAADEDAFFADYAEHLK L	
										K CPAELAHGANAGLDIAV R	
	Putative enolase	<i>Oryza sativa</i>	Q5VNT9	57	47938	5,4		K LGANAILAVSLAVCK A	K VNIQIGSVTESIEAVR M		
										K LGANAILAVSLAVCK A	R AAVPSGASTGIYEALRLR D
	Enolase-like	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2VCI5	57	48032	7,5					
	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Fragaria ananassa</i>	Q9S7F5	54	27297	5,7		K TGGPFGTMK Q + Oxidation (M)	R LAWHSAGTYDVK T	R LAWHSAGTYDVK T	
2361	Ascorbate peroxidase	<i>Phaseolus lunatus</i>	Q4ZJ68	45	13508	4,8		K ALLTDPVFRPLVEK Y			
	phosphopyruvate hydratase	<i>Ricinus communis</i>	P42896	360	47912	5,6	57866	5,4	3,5	K YNQLLR I	
										K VNIQIGSVTESIEAVR M	
										R AAVPSGASTGIYEALRLR D	R SGETEDFIADLSVGLATGQIK T
	Enolase	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	249	47719	5,3		K IPLYK H	K YNQLLR I	K VNIQIGSVTESIEAVR M	
										R AAVPSGASTGIYEALRLR D	R SGETEDFIADLSVGLATGQIK T
	Enolase	<i>Gossypium barbadense</i>	Q6WB92	192	47731	6,2		K LPLYK H	K YNQLLR I	K HIANLAGNSK L	
										K LGANAILAVSLAVCK A	R AAVPSGASTGIYEALRLR D
											R SGETEDFIADLSVGLATGQIK T

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução (continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/C60	Peptídeos		
	phosphopyruvate hydratase	<i>Zea mays</i>	P26301	156	48064	5,2		K YNQLLR I K AINEKTCNALLK V K LGANAILAVSLAVCK A K VNIQIGSVTESIEAVR M		
	Enolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8RWM8	65	47777	5,5		K YNQLLR I K LGANAILAVSLAVCK A		
								K LGANAILAVSLAVCK A K IIVLPVPAFNVINDGSHAGNK L R SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK T		
2522	Ascorbate peroxidase	<i>Cicer arietinum</i>	Q9SXT2	112	19266	4,6	42437	5,6	2,5	R EDKPEPPPEGRLPDATK G K YAADEDAFFADYAEHLK L
	Ascorbate peroxidase	<i>Pinus pinaster</i>	Q6RY58	63	27267	5,4				R IAWHSAGTYDVK T R EDKPEPPPEGRLPDATK G
	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Dimocarpus longan.</i>	Q5IAC4	52	23095	4,7				R DVFGHMGSLDKDIVALSGGHTLGR C
<b><u>Processos celulares</u></b>										
916	Heat shock protein Hsp20	<i>Medicago truncatula</i>	Q2HTU2	77	18192	5,8		5,9	6,6	K ADLPGLK K  R VLQISGER N K EEVKKPDVKS I
962	HSP70	<i>Triticum aestivum</i>	Q9SAU8	354	71031	5,1		4,9	0,4	R VEIANDQQGNR T R MVNHFYQEFK R + Oxidation (M) K ELEGICNPIIAK M K NALENYAYNMNR N + Oxidation (M) R TTPSYVAFTDTER L K ATAGDTHLGGEDFNMR M R IINEPTAAAIAIYGLDKK A

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/ C60	Peptídeos
1840	SGT1	<i>Hordeum vulgare</i>	Q8W516	71	40997	4,9	4,5 2,1	K LGSYTEAVADANK A K SFVESNGTVLS T K QEKDEK L K GEGPAIGIDLGTYYSCVGVWQHDR V
<b><u>Estrutura e Organização da estrutura</u></b>								
445	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus saligna</i> .	Q9FUN8	698	38832	5,9	43740 5,9 0,8	R NTGPEPLYIK V R VGTGIWVGCCR S K ETEEMLEFCK E + Oxidation (M) K AMGHHTVVISSSDK K + Oxidation (M) R DSPGVLSPYTYSLR N K VLSGICHSDIHQIK N K LILTVINAPLQFISPMVLMGR K + 2 Oxidation (M) K IPDGLESEGAAPLMCAGVTVYSPLVR F K IWNVNDVYTDGKPTGGGFAGEIVVQGR F K EATDSLDFIDTIPVHPIEYLLALK L K NDLGMSHYPMVPGHEVVGEVLEVGSEVTK Y + 2 Oxidation (M)
	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus globulus</i>	O64969	618	38806	5,7		R FVVDVVGSK L R NTGPEPLYIK V R VGTGIWVGCCR S R FVVDVVGSKLD - K ETEEMLEFCK E + Oxidation (M) K AMGHHTVVISSSDK K K AMGHHTVVISSSDK K + Oxidation (M) R DSPGVLSPYTYSLR N K VLSGICHSDIHQIK N K LILTVINAPLQFISPMVLMGR K + 2 Oxidation (M) K IPDGLESEGAAPLMCAGVTVYSPLVR F K EATDSLDFIDTIPVHPIEYLLALK L K NDLGMSHYPMVPGHEVVGEVLEVGSEVTK Y + 2 Oxidation (M)

(continuação)

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Espécie</i>	<i>No Acesso</i>	<i>Score</i>	<i>PM/pi teórico</i>	<i>PM/pi exp</i>	<i>O60/ C60</i>	<i>Peptídeos</i>		
	Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Linum usitatissimum</i>	Q1HGA8	60	38900	5,4		K ETEEMLEFCK D + Oxidation (M) K AMGHHVTVISSDDK K K AMGHHVTVISSDDK K + Oxidation (M) K NHLGMSRYPMPVPGHEMVGVEVLEVGSEVTK F + Oxidation (M)		
501	Caffeic acid O-methyltransferase	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWC1	283	34019	5,9	39051	5,5	5,5	R LYGLAPVCK F K HVGGDMFVSVPK G + Oxidation (M) K AAIELDLLEIMAK A K AAIELDLLEIMAK A + Oxidation (M) K YGMTAFEYHGTDP R F + Oxidation (M) K VIVAECVLPVYDPTSLATK N K GINFDLPHVIEDAPPLPGVK H K GFEGLETVDVGGGTGAVLSMIVAK Y + Oxidation (M) K AGPGAFLSPGEVAAQLPTONPEAPVMLDR I + Oxidation (M)
	Caffeate O-methyltransferase	<i>Liquidambar styraciflua</i>	Q9SWR0	101	39.97	5,7				K EFEALAK G R LYGLAPVCK F K YGMTAFEYHGTDP R F + Oxidation (M)
651	Putative hydroxyproline-rich glycoprotein	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZA60	87	57841	8,3	27378	6,2	2,7	R IRASNGGPMPPAK A R AMCAR M R ASAAAMDSLRRR E
	Putative gamma-carbonic anhydrase	<i>Oryza sativa</i>	Q5N7E8	79	28469	6,4				R TLMNIFDK T + Oxidation (M) K AHAANAENAKPVEK
749	Putative proteasome	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZIB4	97	23817	5,8	21557	6,5	2,5	K GCVFYDAVGSYER T R FFPYYAFNVLGGLDSEK G
	Proteasome subunit beta type-1	<i>Petunia hybrida</i>	O82551	81	24618	6,3				K GCVFYDAVGSYER V R DIYTGDRLEIVILNASGIR R

### Vias de Informação

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/ C60	Peptídeos
767	Chloroplast chaperonin 21	<i>Vitis vinifera</i>	Q6B4V4	143	26396 9,0	20707 5,3	2,3	K YTSLKPLGDR V K TAGGLLLTEASK E K GSDGSDYIAL K R SFRSLVRAA T
895	Eukaryotic translation initiation factor 5A-4	<i>Solanum tuberosum</i>	P56336	139	17318 5,5	12192 5,2	2,6	K TYPOQAGTIR K R LPTDDSLLSQIK D K KLEDIVPSSHNCVPHVNR T
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	<i>Oryza sativa</i>	Q2QQ48	125	17557 5,6			K TYPOQAGTIR K R LPTDDNLLSQIK D K KLEDIVPSSHNCVPHVNR T
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-4	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Q5YJR7	99	17201 5,5			K TYPOQAGTIR K K KLEDIVPSSHNCVPHVTR T
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<i>Plantago major</i>	Q5ZF92	83	17325 5,3			K TFPQQAGTIR K K KLEDIVPSSHNCVPHVNR V
	Translation initiation factor 5A	<i>Thinopyrum intermedium</i>	Q308L6	58	17243 5,8			K TYPOQAGAIR K K KLEDIVPSSHNCVPHVTR L
	Eukaryotic translation initiation factor 5A3	<i>Triticum aestivum</i>	Q3S4H9	48	17382 5,8			K DDLKLPTDDVLLGQIK T K TYPOQAGAIR K
1391	Cytosol aminopeptidase	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RWG8	212	59856	57866 5,7	2,1	K TPGGCSIELMK F + Oxidation (M) K FDMGGSAAVLGAAK A + Oxidation (M) K TIEVNTDAEGR L R LTLADALVYACNQGVEK I
1542	translation elongation factor EF-Tu	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZT91	104	49.41 6,3	47535 6,2	1,7	K EHILLAR Q K FPGDDPIIR G R QVGVPSLVCFLNK V R HYAHVDCPGHADYYK N

## ANEXO S

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas na madeira oposta em relação à madeira normal após 60 dias de indução

Spot	Proteína	Espécie	No Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	O60/C60	Peptídeos	(conclusão)	
	Translational elongation factor Tu	<i>Oryza sativa</i>	Q851Y8	104	48424	6,0		KEHILLAR Q R QVGVPSLVCFLNK V R HYAHVDCPGHADYYK N R TKPHVNVGTIGHVDHGK T		
	Mitochondrial elongation factor Tu	<i>Catharanthus roseus</i>	Q9ZRU6	56	23788	5,4		K RFEAEIYVLT K D R HTAFFSNYRPOQFYMR T + Oxidation (M)		
1592	Translation protein SH3-like	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RWH9	121	1702	5,4	12070	5,6	1,9	K TYPQQAGTIR K K KLEDIVPSSHNCDDVPHVNR T K DDLKLP TDDSLLTQI K
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-4	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Q5YJR7	120	17201	5,5		K TYPQQAGTIR K K KLEDIVPSSHNCDDVPHVNR T		
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C505	75	17207	5,6		K LPTDEALLTQLK N K KLEDIVPSSHNCDDVPHVNR V		
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<i>Plantago major</i>	Q5ZF92	73	17325	5,3		K TFFPQQAGTIR K K KLEDIVPSSHNCDDVPHVNR V		

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pi teórico, peso molecular e ponto isoelétrico teóricos; PM/pi exp, peso molecular e ponto isoelétrico experimentais; T60/C60, razão entre o volume do spot no tratamento T60 e o volume do spot correspondente no material controle C60

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos	
340	dnaK-type molecular chaperone precursor	Processos Celulares	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Q01899	156	72537	6,0	80570	5,1 0,13	K HLNITLTR S K GELLVGTAPK R R SSGGLSEDEIEK M
	heat shock 70 KD protein		<i>Oryza sativa</i>	Q8GTB0	152	70447	5,5		R KALIDIR N K HLNITLTR S K GELLVGTAPK R K RTEGIDLSK D R TEGIDLSKDR L	
	dnaK-type molecular chaperone HSC70-10		<i>Spinacia oleracea</i>	O49045	110	72375	5,5		K GELLVGTAPK R R TTPSVVAFNPK G	
341	Heat shock 70 kDa protein	Processos Celulares	<i>Coxiella burnetii</i>	O87712	78,00	70755	5,2	79737	5,1 0,08	K QFAAEEISSHVLIK M K EIAEAHLGPTIK N K KGVVTPAYFNDSQR Q R FEELNMTLFR K
349	Heat shock protein hsp70	Processos Celulares	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9S9N1	280	70915	5,3	84205	5,5 0,07	K NQITITNDK G R TTPSVVAFDTER L K ATAGDTHLGGEDFNRL K VVSGPGEKPMIVSYK N R IINEPTAAAIAYGLDKK G
427	phosphoglycerate mutase	Metabolismo e energia	<i>Zea mays</i>	P30792	102	60620	5,3	75311	5,3 0,08	K GVDAQIASGGGR M R GWDAQVLGEAPYK F K ESFESGTLHLIGLLSDGGVHSR L
	phosphoglycerate mutase			P35493	76	60818	5,5		K LVDLALASGK I R GWDAQVLGEAPYK F	



## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
465	Importin alpha 1	Transporte	<i>Capsicum annuum</i>	Q84KB0	74	59320	5,2	69128	5,0	0,04	R SPPIDEVK A K EACWTISNIT A K ETGANGGIN
492	Dihidrolipoamide acetyltransferase	Metabolismo e energia		Q8RWN9	108	58468	7,6	66144	5,0	0,12	R VIDGAIGAEWLK A K ENSLKPEDYEGGTFVSNLGGPFGIK Q
	Enolase		<i>Gossypium barbadense</i>	Q6WB92	69	47731	6,2				K YNQLLR I K LGANAILAVSLAVCK A R AAVPSGASTGIYEALRLR D
	Putative ATP synthase beta subunit		<i>Oryza sativa</i>	Q5N7P8	43	45236	5,3				K VVDLLAPYQR G K TVLIMELINNVAK A + Oxidation (M) K NLQDIILGMDELSEDDKLTVAR A + Oxidation (M)
548	Hypothetical protein ADH3	Metabolismo e energia	<i>Brassica napus</i>	Q9XHT2	68	11426	5,9	58245	6,2	0,18	- IIGVDLNPFR F K FGVTEFVNPX X
	Alcohol dehydrogenase 3		<i>Vitis vinifera</i>	Q9FZ00	64	41241	6,8				K FGVTEFVNPX D
592	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q69YA2	82	49050	6,8	55876	6,5	0,08	R FAGQIR G R LLAGESGIGPIDR F K SMIGHCLGAAGGLEAIATYK A + Oxidation (M) R AGVLVGTGMGGLTVFSDGVQNLIEK G + Oxidation (M)

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
	Beta-ketoacyl-ACP synthetase 1-2		<i>Glycine max</i>	Q9M507	62	49763	7,6		R YCIVAGK K K SMIGHCLGAAGGLEAIATVK A + Oxidation (M)		
									R GAPIIAEYLGGAAYNCDAYHMTDPPR S + Oxidation (M) R RGEADLMIAGGTEAAIPIGIGLGGFVACR A + Oxidation (M)		
594	Alcohol dehydrogenase class III-like protein	Metabolismo e energia	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2XPW7	69	40716	6,3	52095	6,6	0,18	R IIGIDISK K R ECKFCKSG K K EHEQPIQQV I
599	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q69YA2	77	49.05	6,8	55299	6,3	0,05	R LLAGESGIGPIDR F K SMIGHCLGAAGGLEAIATVK A + Oxidation (M) R AGVLYGTGMGGTLVFSDBGVQNLIEK G + Oxidation (M)
	GDP-mannose 3',5'-epimerase		<i>Lycopersicon esculentum</i>	CAD7057	39	43088	6,1		R ITYFWIK E K VVGTQAPVELGSLR A R ISITGAGGFIASHIAR R		
617	Putative dehydrogenase, 3'-partial	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q6AT60	196	29957	9,2	50236	4,6	0,07	K ANVLEASMLWR K K ANVLEASMLWR K + Oxidation (M) R ELTGGYFGQPR G K HLKPETGLLQIR A
	Putative dehydrogenase, 3'-partial		<i>Oryza sativa</i>	Q6AT60	140	29957	9,2	50236	4,6	0,07	K.ANVLEASMLWR.K R ELTGGYFGQPR G K HLKPETGLLQIR A
652	Formate dehydrogenase	Metabolismo	<i>Quercus robur</i>	Q7XHJ0	138	40588	6,5	49204	6,6	0,17	K IVGVFYK A

(continuação)

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
		e energia							K GVLIVNNAR G R LKPFNCNLLYHDR L K HIPDLHLVLTTPFHPAYVTAER I		
	Formate dehydrogenase		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Q5NE18_	86	42093	6,9		K IVGVFYK A K GMFDKER I + Oxidation (M) K GVLIVNNAR G R LKPFNCNLLYHDR L R YMPNQAMTPHISGTTTIDAQLR Y + 2 Oxidation (M)		
680	IN2-2 protein	Metabolismo e energia	<i>Zea mays</i>	P49249	211	33829	8,9	44933	6,4	0,08	R VPIEVTIGELK K R ELGIGIVAYSPLGR G
	Aldo/keto reductase		<i>Oryza sativa</i>	Q7XTA2	180	37703	6,5		K VPIEVTIGELK K K IENFNQNVAAALSVK L K IENFNQNVAAALSVK L		
683	Pantothenate kinase-like	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q69T90	68	40485	4,8	46234	4,5	0,09	R LYDCVFK F K HPEVAQFLGGR L K HPEVA Q
689	Tubulin beta-1 chain beta tubulin-1	Estrutura e Organização	<i>Euclyptus grandis</i>	A7KQH1	443	50182	4,7	45284	4,9	0,06	K IREEYPDR M K LAVNLIPFPR L R FPGQLNSDLR K R VSEQFTAMIFR R R MMLTFSVFPSPK V + 2 Oxidation (M) K EVDEQMLNVQNK N + Oxidation (M) K MASTFIGURANSTSIQEMFR R + 2 Oxidation (M)

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos
694	Putative salt tolerance protein 5	Processos Celulares	<i>Oryza sativa</i>	Q67X37	84	34269 5,6	44239 5,3	0,10	R FVCDIK K K QNQMEWW K K PNAGNGLDLE
714	14-3-3 protein	Processos Celulares	<i>Manihot esculenta</i>	Q1AP39	101	29832 4,8	43556 4,5	0,07	K EAAESTLLAYK S K EAAESTLLAYK S K TVDVEELTVEER N K TVDVEELTVEER N R ACNLA K
735	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	Metabolismo e energia	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RXT4	202	32331 5,1	39570 5,1	0,22	R VGDLER T R LLHVYR V R QPGPIGLNTK V K TVLVDNEDFLK E
	Putative glyoxalase I		<i>Oryza sativa</i>	Q6ES23	51	32186 5,8			R LLHVYR V R EPGLPGINTK I
	Putative glyoxalase		<i>Oryza sativa</i>	Q75GB0	46	29568 5,0			M LHVYR V R EPGLPGINTK I
	lactoylglutathione lyase		<i>Citrus paradisi</i>	O04428	202	32643 5,5			K FYTECFGMK L + Oxidation (M) K FYTECFGMK L + Oxidation (M) K TVLVDNEDFLK E K DPDGYIFELIQR G
	Putative lactoylglutathione lyase		<i>Arabidopsis</i>	Q940A4	52	31958 5,1			K IVNQELGGK I

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos
736	DEAD box RNA helicase	Vias de Informação	<i>thailiana</i> <i>Pisum sativum</i>	Q8H1A5	610	46881	5,4 36608	5,1 0,04	R ALGDYLGVK V R ELAQQIEK V R DELTLEGIK Q R KGVAINFVTK D  R VLITDLLAR G K VHACVGGTSVRE K RDELTEGIIK Q K GLDVIQQAQSGTGK T R ILSSGVHVVGTPGR V R GFKDQIYDIFQLPSK I K IQVGVFSATMPPEALEITR K + Oxidation (M)
794	Malate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Eucalyptus gunnii</i>	P46487	188	36462	8,7 36894	5,8 0,08	K VVVLGAAGGIGQPLALLFK L R DVLFNINAGIVK S K YCPNTLINMISNVNSTVPIAAEVFK K K KLVGVTTLDVVR A K LFGVTTLTIVR A K YGRPLLGNFKPK L R GGLDFTKQETVNSQPFFR W R DDGLLLHIHR A K LEGEREVTLGFDLLR D
800	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	Metabolismo e energia	<i>Anemita mexicana</i>	Q31674	140	46526	6,6 35670	6,6 0,07	R ANTFVAQK K K LFGVTTLDVVR A R DDLFNINANIVK T K AGAGSATLSMAYAAAR F + Oxidation (M)
808	NAD-malate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Nicotiana glauca</i> <i>Tabelaacum</i>	Q9XQP4	207	43307	8,0 36230	5,0 0,03	

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos
853	14-3-3 protein	Processos Celulares	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q01525	114	29162	29443	4,4	0,09 R LLDTNLVPSAAASESK V K VFYLK M R YLAEFK V
879	Translation factor Elongation factor G, III and V	Vias de Informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S825	771	95051	31660	4,8	0,03 R FFAFGR V K FSVSPVVR V K FSVSPVVR V K SDPVVVSFR E K GVQYLNEIKD K DSVVAGFGWASK E R NMSVIAHVDPHGK S + Oxidation (M) R GFVQFCYEPK Q R LWGENFFDPATK K K EQMTPLSEFEDKL - + Oxidation (M) R NCDPEGPLMLYVSK M + Oxidation (M) K NATLTNEKEVDAPIR A K STLTDSLVAAGIQAQEVAGDVR M K GVQYLNEIKDSVVAGFGWASK E R YRVENLYEGPLDDQYATAIR N
887	Stress-induced protein sti1-like	Processos Celulares	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L724	84	60446	29215	6,8	0,09 K LGALPEGLK D R VMKALGVLLNVK F + Oxidation (M) K DFEPAIETFOK A
936	L-ascorbate peroxidase 1b	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q1PER6	134	28006	25798	6,2	0,21 K TGGPFGTIR H K HCAPIVLR L R LAWHSAGTFDVKTK T

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
998	Enoyl ACP reductase	Metabolismo e energia	<i>Olea europaea</i>	Q8GVC8	120	41881	25138	4,7	0,04	R VNTISAGPLR S R IIPGYGGMSSAK A + Oxidation (M) K AALESDDTQVLAFEAGR K K AALESDDTQVLAFEAGRK H	
	Putative enoyl-ACP reductase		<i>Oryza sativa</i>	Q6Z0I4	86	39131	8,8			K AALESDDTKVLAFEAGR K	
										R AFIAGVADDNGYGWAIK A	
	Cytosolic ascorbate peroxidase		<i>Capsicum annuum</i>	Q4ZJK2	123	27431	5,8			R SGFEGPWTNPLIFDINSYFKE	
1025	14-3-3 protein	Processos Celulares	<i>Manihot esculenta</i>	Q1AP39	346	29832	4,8	23561	6,3	0,11	R NLLSVAYK N K DSTLMQLLR D K EAAESTLLAYK S K DSTLMQLLR D + Oxidation (M) K TVDVEELTVEER N R NLLSVAYKKNVIGAR R R DNLTWTSIDITDEAGDEIKDASK R
	14-3-3 protein homolog SGF14A		<i>Glycine max</i>	Q96450	212	29049	4,7				R NLLSVAYK N K DSTLMQLLR D K EAAESTLLAYK S K DSTLMQLLR D + Oxidation (M) K TVEVEELTVEER N R NLLSVAYKKNVIGAR R
	14-3-3 protein homolog RC11		<i>Arabidopsis</i>	P42644	178	28606	4,8				R NLLSVAYK N

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
			<i>thaliana</i>						R GKIESELSK I K DSTLMQQLLR D K DSTLMQQLLR D + Oxidation (M) R NLLSVAYKKNVIGAR R		
	14-3-3 f-2 protein		<i>Nicotiana Tabalaacum</i>	Q75XU9	124	27436	4,8		R NLLSVAYK N K DSTLMQQLLR D K DSTLMQQLLR D + Oxidation (M)		
1021	Ras-like GTP-binding protein	Transporte	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q1PEX3	151	24337	5,3	23868	4,8	0,06	R YEEMVDFMEK V R NLLSVAYKKNVIGAR R R STIGVEFATR S K AQIWDTAGQER Y K AEDDYDYLFK V R GAVGALLVYDVTR H
1026	26S proteasome subunit RPN12	Vias de Informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q6XJF4	138	30702	4,8	23745	4,6	0,05	K EIPSLQINQTLRYAR E K HAVELEQSFMEGAYNR V + Oxidation (M) K HAVELEQSFMEGAYNR V + Oxidation (M)
26S	proteasome		<i>Oryza sativa</i>	Q8W423	74	30772	5,0		K TVRDELGCSEK G K HAVELEQSFMEGAYNR V + Oxidation (M)		
1066	ER lumen protein retaining receptor	Transporte	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SSF8	98	49203	9,4	50789	6,1	0,09	K SQELTAIFLAVR L K LFLAILSGIAA L K TLQTALTNE
1076	Chloroplast chaperonin 21	Vias	<i>Vitis vinifera</i>	Q6BAV4	135	26396	9,0	20915	5,4	0,08	K YTSLKPLGDR V



## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos	
		de Informação							K TAGGLLLTEASK E	
	Chloroplast chaperonin 21		<i>Vitis vinifera</i>	Q6B4V3	92	13143	20915	5,4	0,08	K TAGGLLLTEASK E
1062	proteasome endopeptidase	Vias de Informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23714	186	22541	21242	5,6	0,07	K LVAASGEPGDR V R VQFTEYVQK N
1103	Enolase	Metabolismo e energia	<i>Glycine max</i>	Q6RIB7	424	47719	19757	6,6	0,14	R GELATALR K R LVVAPPNFVIK I K IVDKDGAR D K VVQIGSVTSEIAVR M R AAVPSGASTGIYEALR D R IEEELGAEAVYAGANFR T K LVLVPVAFNVINGGSHAGNK L R SGETEDTFIADLSVGLATGQIK T
	Enolase		<i>Gossypium barbadense</i>	Q6WB92	304	47731	6,2			K EGLELLNTAIK A K LGANAILAVSLAVCK A R AAVPSGASTGIYEALR D K LVLVPVAFNVINGGSHAGNK L R SGETEDTFIADLSVGLATGQIK T
1172	Glutamine synthetase GS56	Metabolismo e energia	<i>Nicotiana attenuata</i>	Q5QJ64	121	39192	16569	4,8	0,09	R DIVDSHYK A R HETADINTFK W R HKEHIAAYGEGNER R

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp	Vol	Peptídeos
	Cytosolic glutamine synthetase		<i>Beta vulgaris</i>	Q9AXD1	41	39093	5,3		R RLTPISDPAK L R HKEHIAAYGEGNER R
1218	Putative glutathione peroxidase	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q6ESJ0	71	25993	9,4	14710	5,1 0,14 K GGLFGDNIK W K GGLFGDNIK W K AEYPIFDK V R FKAEYPIFDK V
1219	Glutathione peroxidase	Metabolismo e energia	<i>Medicago truncatula</i>	Q1RY58	55	19508	4,9	14863	4,7 0,10 K VLLIVNASR C K SSSGGFF G
1232	Putative beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	Metabolismo e energia	<i>Oryza sativa</i>	Q6I5L0	47	23341	9,0	14150	6,2 0,06 R FPFLLVDR V R ENFFFAGIDK V
1234	17.5 kDa class I HSP	Processos Celulares	<i>Arachis hypogaea</i>	Q2PXN2	98	16256	5,8	14187	5,3 0,08 K ASMENGLTTVTVPK A + Oxidation (M) K ADLPGLK K FMRRF R
1244	Oxygen-evolving enhancer protein	Metabolismo e energia	<i>Fritillaria agrestis</i>	O49079	77	34869	4,9	13648	4,7 0,15 K IILSVTK S R VPFLTIK Q R GGSTGYTNAVALPAGGR G
1332	Profilin-6	Estrutura e Organização	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q9LEI8	101	14007	5,0	10761	4,5 0,34 K FFIQGEFPAVIR G R LGTYLLDQG L R LGDYLVDDQ F R DFDEPGLTAPGLYLGGTK Y
1348	Heat shock protein Hsp20	Processos Celulares	<i>Medicago truncatula</i>	Q2HTU2	72	18180	5,8	10141	6,0 0,07 K ADLPGLKK E R VLQISGER N

(continuação)

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos
	class   small heat shock		<i>Nicotiana glauca</i> <i>Tabulaeaum</i>	Q53E33	55	15924	10141	6,0 0,07	R VLIQISGER S K ATMENGVLTVPK M + Oxidation (M)
1363	ATP synthase CF1 alpha subunit	Metabolismo e energia	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q49L13	174	55513	9985	6,4 0,08	R GEIYASESR L R HTLIYDDLK Q K ASSVAQWNTLQER G K IVNTGTVLQVGDGIAR I K TNKPQFQEIISSTK T
1433	Heat shock protein 70 precursor	Processos Celulares	<i>Citrus limonum</i>	O04056	96	75589	86196	4,7 0,08	R TTPSWAYTK I K ELGDKVPGPK E K NQADSWYQTEK Q K KQDITITGASTLPSDEYER M
1424	Gamma-aminobutyrate transaminase subunit isozyme3	Metabolismo e energia	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Q84P52	93	57239	94641	4,7 0,05	K AFFTNSGSEANDTQVK L
	Hsp90-2-like	Processos Celulares	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2XTE5	78	80417	5,1		R FESLTDK S K AVENSPFLEK L K ADLVNMLGTIAR S K HFSVEGQLEFK A
1512	Ser/Thr specific protein phosphatase	Vias de Informação	<i>Medicago varia</i>	Q9FVD7	121	65264	74533	4,7 0,06	R INIISK L K DRVPNIK F K NDDIQLR L
1523	kinase substrate-like protein	Processos	<i>Oryza sativa</i>	Q8W3G1	216	43037	66661	4,5 0,06	R VLDEMVK L + Oxidation (M)

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos		
		Cellulares							KAFSEIAAER V R YLPVYEETYS K LIDDPQTVVNNR N R FPGRDES LAPIFTPPR S		
	Cell division protein FisZ		<i>Medicago truncatula</i>	Q1RY62	81	50522	4,8		R FPGQLNSDLR K RVSEQFTVMFK R + Oxidation (M)		
1584	chaperonin 60	Vias de Informação	<i>Cucurbita maxima</i>	Q05046	185	61.13	6,3	5,1	0,09	K LSGGVAVLK I K APGFGENR K K EGVITISDGK T K IGGASEAEVGEK K	
1597	Glutamine synthetase N-1	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LV18	83	38595	6,0	62961	4,7	0,13	R SAIELSTSDYDKEK L R YILER I K GYFEDR R K VIAEYIWIGSGMDLR S
1602	tubulin beta-1 chain	Estrutura e Organização	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P12411	70	50217	4,7	62473	4,8	0,16	K LAVNLIPFPR L R FPGQLNSDLR K R SGPYGQIF R
	tubulin beta-1 chain		<i>Arabidopsis thaliana</i>	P04690	84	50217	4,7	62473	4,8	0,16	K LAVNLIPFPR L K NSSYFVEWIPNNVKS R KAFLH W
1610	Putative AdoMet synthase 2	Metabolismo e energia	<i>Hordeum vulgare</i>	Q4LB23	140	42828	5,6	46959	4,5	0,03	K TNMVMVFEITTK A K TNMVMVFEITTK A + 2 Oxidation (M) R DDADFTWEVWKPLK F

## ANEXO T

Tabela 12 – Proteínas exclusivas da madeira de tração em relação ao controle após 15 dias de indução

(conclusão)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos	
1844	T-complex protein 1 chaperonin	Vias de Informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q3ED60	184	5,4	70031	5,3	0,09	R GIHP I K LMVELSR S K LMVELSR S + Oxidation (M) R FQELTPEK L K HKVDIDTVEK F K YPGVEQYAIR A
1891	Putative T complex protein	Vias de Informação	<i>Oryza sativa</i>	Q5Z907	119	5,7	62156	5,1	0,08	K DVNLDLIK V R IAEGYELASR I K QQQILLATQVVK M
1979	Putative GDP dissociation inhibitor	Processos Celulares	<i>Oryza sativa</i>	Q688K0	90	4,4	69308	5,5	0,07	K LYAESLAR F K VPATDMEALK S + Oxidation (M) R DYNVDMVPK F + Oxidation (M)

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pi teórico, peso molecular e ponto isoelétrico teóricos; PM/pi exp, peso molecular e ponto isoelétrico experimentais; Vol, volume normalizado %

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continua)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp	Vol	Peptídeos
2	Putative heat shock protein	Processos celulares	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q2V4B7	58	87317	5,2 80960	5,3 0,1	K ILTEFFGK E K ILTEFFGK E R GCALQCAILSPTFK V
3	Heat shock protein 101	Processos Celulares	<i>Vitis vinifera</i>	Q3L1D0	280	101329	5,8 79147	6,3 0,2	K TAVVEGLAQR I R ALVVAQLSSR Y K NNPVLIGEPGVGK T R LIALDMGALVAGAK Y + Oxidation (M) K AIDLVEACANVR V R EELLFALQEAER R R VVGQDQAVSAVAEAVLR S
5	valosin-containing protein	Processos Celulares	<i>Glycine max</i>	P54774	567	89.77	5,2 77.44	5,4 0,5	R FGFSEFR F K SIGVKPPK G R KGDLFVLR G R ELVELPLR H K DFSTAILER K R ENIEKDIER E K GILLYGPPGSGK T R EIDIGVPDEVGR L R IVSLLTLMGDLK S R LGDWSVHQCPDVK Y K AIANECGANFISVK G R LDQLIYIPLPDEDSR H R ELQETVQYPVEHPEK F K NAPSIIFIDEIDSIAPK R R AHVIVIGATNRRPNSIDPALR R K DTHGYVGADLAALCTEALQCIR E

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	Nº Acesso	Score	PM/pi		Vol	Peptídeos		
						teórico	exp				
6	Putative aconitase	Metabolismo e energia	<i>Prunus avium</i>	Q6YNR9	189	98879	6,0	77440	6,2	0,4	K TVFIIGATNRPDIIDPALLRPGR L
											R FGFLK W
											K GPMLLGVK A + Oxidation (M)
											K ILLESAIR N
											K IIDWENTSPK Q
											K ACELGLEVKPWIK T
											R SNLVGMGIPLCFK T + Oxidation (M)
											K KACELGLEVKPWIK T
											K INPLVPVDLVIDHSYQVDVAR S
7	Aconitase	Metabolismo e energia	<i>Lycopersicon pennellii</i>	Q84TR4	126	98127	6,1	77346	6,3	0,2	R FAFLK W
											K GPMLLGVK A + Oxidation (M)
											R ILLESAIR N
											K YLLKSGLQK Y
											K FYSLPALNDPRI
8	Translation factor Elongation factor G, III and V	Vias de informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S825	232	95051	5,8	77062	6,5	0,6	R FFAFGR V
											K FSVSPVVR V
											R GFVQFCYEPIK Q
											R LWGENFFDPATK K
											K NATLTNEKEVDAHPIR A
											K STLTDSLVAAGIAQEVAGDVR M
14	dnaK-type molecular chaperone	Vias de informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9STW6	51	76508	5,1	71731	4,9	0,2	R IAGLEVLR I
											R IPAYQELVR K
											K DIDEVILVGGSTR I
											K QFAAEEISAQVLR K

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos
	Heat shock protein Hsp70	Processos Celulares	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SKX2	95	75756	5,2 71731	4,9	K DIDEVILVGGSTR I K AVVTVPAYFNDSSQR T R IINEPTAASLAYGFER K
17	BIP heat shock protein 70	Processos	<i>Glycine max</i>	Q587K1	230	73594	5,1 71083	5,2 0,2	R LSEQEEIER M  K DAGVIAGLNVAR I R FEELNNDLFR K K VFSPEEISAMILTK M + Oxidation (M) R IINEPTAAAIAYGLDK K
19	Transketolase-like protein	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LE99	89	79,925	5,9 70,068	6,6 0,3	K VTTTIGYGGSPNK A R VSIEAASTFGWE K K RKTPSILALSRQ K
20	(+)-pulegone reductase	Metabolismo e energia	<i>Mentha piperita</i>	Q6WAU0	94	37,915	6,3 69,699	5,0 0,6	R HHGTTGVYGDIDTR Q K EESDYDTALKRHFP E R VHGRIVAVCGMVSQ Y
24	Dehydrin.- Glycine max (Soybean)	Processos Celulares	<i>Glycine max</i>	Q70EL8	91	23794	5,9 68689	5,7 0,2	R HHGTTGVYGDIDTR Q K QTDEYGNPVAHASVTVVATR T
25	V-type proton ATPase catalytic subunit A	Metabolismo e energia	<i>Gossypium hirsutum</i>	P31405	102	68522	5,4 68414	5,9 0,3	R LGDLFYR L K DTVLELEFFQGVK K R EDDLNEIVQLVKG D K FEDPAEGEEALVAK F R LTTTFEDSEKESEYGYVR K
32	Proteasome subunit alpha type	Vias de Informação	<i>Solanum tuberosum</i>	Q38M52	94	25665	5,4 67774	6,4 0,2	K EGFEGQISGK N K LPSILVDETSVQK I K KLPSILVDETSVQK I

(continuação)



## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos
	ATP synthase subunit alpha	Metabolismo e energia		P05492	90	5597	6,2		R ELIIGDR Q K LELAQYR E R VISVGDGIAR V R AAELTTLESR I
33	DP000009 NID	unknown	<i>Oryza sativa</i>	Q10NA1	231	71634	5,3	67591 5,6 0,5	R FEELNMDLFR R + Oxidation (M) R NALENYAYNMR N + Oxidation (M) K VQQLLQDFFNGK E R TTPSYVAFTDTER L R IINEPTAAAIAYGLDK K K ATAGDTHLGGEDFDNR M K NAVITVPAYFNDSQR Q R IINEPTAAAIAYGLDKK A
35	Elongation factor 2	Vias de informação	<i>Oryza sativa</i>	Q6H4L2	84	94021	5,9	66498 5,4 0,3	R FFAFGR V R GFVQFCYEPIK Q R LWGENFFDPATK K K ILSEEFGWKDLAK K R LYMEARPLEEGLAEIIDDGR I + Oxidation (M) R DGNEYLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR
41	succinate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O82663	212	69656	5,9	65862 6,1 0,3	R AFGGQSLDFGK G K AVIELENYGLPFSR T R LPGISETAAIFAGVDVTK E R AAIGLSEHGFTACITK L R AYFSATSAHTCTGDGNAMVAR A + Oxidation (M)
48	RuBisCO large subunit	Metabolismo	<i>Brassica</i>	P21239	484	57692	4,8	64685 4,9 0,3	R AALQAGIDK L

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)											
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pl	PM/pl	Vol	Peptídeos		
		e energia	<i>napus</i>						K DIIPILEK T K LLVEFENAR V K VGAATELEDR K R GYISPOFVTNPEK L K TNSAGDGGTTASVLAR E  R AIELPDAMENAGAALIR E + Oxidation (M) R APLIIAEDVTGEALATLVVVK L		
47	NADP-dependent malic enzyme 2	Metabolismo e energia	<i>Hydrilla verticillata</i>	Q6PMI2	135	68310	8,8	64775	6,9	0,4	K YGSIFR R K IWLVDK G K GLIYPPFSNIR K K GLIYPPFSNIR K R ILGLDGLGCGMGIPVGK L + Oxidation (M)
49	Aspartyl-tRNA synthetase	Vias de Informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q1S114	97	61035	6,0	64685	6,6	0,3	K LGQLVLEK Y R VFEIGPVFR A K YGTEFYILHR Y K AIPTLPINIEDAAR S R HLCEFTGLDVEIMEIKK H + Oxidation (M)
59	Putative T-complex protein 1	Vias de Informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF16	256	59776	6,0	62256	6,6	0,3	K ILVDIK S K ILVDIK S K ALEVIPR Q R SLHDAIMVR R + Oxidation (M) K SQLFINSYAK A R DSFLVDGVAFK K K TFSYAGFEQQPK K R LAIGDLATQYFADR D

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

										(continuação)	
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos		
61	Probable protein phosphatase 2C 57	Processos Celulares	<i>Oriza sativa</i>	Q69VD9	39	39.44	5,2	61898	6,7	0,3	R SISAEGLR E R AVLCCRGKA VWEALSPR
69	GDP dissociation inhibitor 1	Vias De informação	<i>Solanum chilense</i>	Q5ER63	148	49716	5,7	60.47	5,8	0,2	K LYAESLAR F K LYAESLAR F R VLIHTDVTKY K VPATDMEALK S + Oxidation (M) K ECILSGLLSVDGLK V R LSAVYGGTYMLNKPECK V + Oxidation (M)
	Rab GDI protein		<i>Medicago truncatula</i>	Q1R6N6	129	50183	5,6				K LYAESLAR F R VLIHTDVTKY K VIGTSEGETAK C K VIGTSEGETAK C R LSAVYGGTYMLNKPECK V + Oxidation (M)
70	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	Metabolismo e energia	<i>Oenothera villaricae</i>	Q7M2G6	92	53323	6,5	60026	6,4	0,2	K LEAQYR E K AVDSLVPGR G R KIELDAFLK E R AAELTTLESR I R VVDALGVPIDGR G
75	Beta-tubulin 5	Estrutura e Organização	<i>Physcomitrella patens</i>	Q6TYR3	296	49757	4,8	58432	5,0	0,4	R YLTASAMFR G + Oxidation (M) K LAVNLIPFPR L R FPGQLNSDLR K R VSEQFTAMFR R + Oxidation (M) R INVYYNEASGGR Y R MMLTFSVFPSPK V + 2 Oxidation (M)

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)											
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos		
									R L H F F M V G F A P L T S R G + Oxidation (M) R A V L M D L E P G T M D S V R S + 2 Oxidation (M) K N S S Y F E V E W I P N N V K S K M S S T F I G U R A N S T S I Q E M F R R + Oxidation (M)		
78	Lipoamide dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Capsicum annuum</i>	Q6QJL7	52	53345	6,7	6,8	0,4	K A I D D A E G I V K V R I V S S T G A L A L T E V P K N K F L S P S E V S V D T I D G G N T V V K G	
80	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	Metabolismo e energia	<i>Oenothera villaricae</i>	P05492	98	55597	6,2	57814	6,5	0,4	R A A E L T T L L E S R I R V V D A L G V P I D G R G K T A I A I D T I L N Q K Q
85	serine-tRNA ligase	Vias de Informação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39230	79	51629	6,3	57374	6,7	0,3	R D T L G I F R V R Y A G Y S S C F R K R T I C C I L E N Y Q R E
89	Putative ATP synthase	Metabolismo e energia	<i>Oriza sativa</i>	Q5N7P9	49	45908	5,3	57022	5,3	0,5	K I G L F G G A G V G K T R T I A M D G T E G L V R G + Oxidation (M)
	ATPase beta subunit		<i>Sequoiadendron giganteum.</i>	Q8MFU9	40	43004	5,0				K I G L F G G A G V G K T - A T D G L M R D M R V + 2 Oxidation (M)
98	Helicase, C-terminal	Vias de Informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SD62	97	48803	5,5	54922	5,8	0,2	R F E V D I K Q R I L V A T D L V G R G K G Y V G I H S S G F R D R D F L L K P E L L R A R V N I V I N Y D M P D S A D T Y L H R V + Oxidation (M)

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)											
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos	
99	6-phosphogluconate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Cleome spinosa</i>	Q1KUX5	206	53582	5,8	54661	6,5	0,5	R FL SGLKE R AIFLDR I K GFPI SVYNR T R DYFGAHTYER V K ICSYAQGMNLR A + Oxidation (M)
104	Tubulin A	Estrutura e Organização	<i>Glycine max</i>	Q2TFP2	118	49692	5,0	53965	5,1	0,3	K FDLMYAK R + Oxidation (M) K EIVDLCLDR V R LISQISSLTSLR F R TVQFVDWCPTGFK C R SLDIERPTYTNLNR L
109	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Cynodon dactylon</i>	Q6E4A3	84	17975	4,9	53358	6,5	0,1	K GLVVPVIR D R EAVFFLR R K DWVEDPR R
113	UDP-glucose:protein transglucosylase-like	Metabolismo e energia	<i>Solanum Tuberosum</i>	Q38M71	235	41155	5,6	52752	5,5	0,2	K ASNPFVNLK K K DINALEQHIK N K TGLPYIWHSKA K VICDHLGLGVK T K DELDIVIPTIR N K YIYTI DDDCFVAK D
116	Proteasome component	Vias de Informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SV78	89	30681	5,4	52320	6,7	0,2	R LIEPFSR V K VVDSL YVR S K IMVNGADDVGGIISSK A + Oxidation (M)
	citrate (si)-synthase	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P20115	47	52782	6,4				K LYEIVPPVLTGK V
	Citrate synthase		<i>Sesbania rostrata</i>	Q8H9E3	45	20877	5,9				R LPAIAAYIR R

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

										(continuação)	
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos		
127	Cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	Metabolismo e energia	<i>Zea mays</i>	Q84JX6	87	31626	5,0	5,8	0,3	K FAAGTEAIAK K K IGVIESLLAK V K ELDYLVGAVANPK K  K GVSLLLPTDIVADK F K LASVADLYVNDAFGTAHR A	
133	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q4ABU8	164	43849	5,2	48720	5,2	0,3	R DLTDSLMMK I + Oxidation (M) R DLTDSLMMK I + Oxidation (M) K EITALAPSSMK I + Oxidation (M) R GYMFTTTAER E + Oxidation (M) K IWHHTFYNELR V K NYELPDGQVITIGAER F R VAPEEHPVLLTEAPLNPK A
142	67KD PROTEIN vicilin precursor	Metabolismo e energia	<i>Theobroma cacao</i>	Q43358	307	66256	6,3	68048	4,7	0,3	K ELSFGVPSK L K ELSFGVPSK L R FAENSPPLK G R NNPYFPK R K LEEILEEQR G R EKLEEILEEQR G K LTIAVLALPVNSPGK Y K LNQGAIIVPHYNSK A R FAENSPPLK GINDYR L R EQEEEESEETTFGEFQQVK A K APLSPGDVAVAPAGHAVTFFASK D
147	Pyruvate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Beta vulgaris</i>	Q852R9	99	43776	8,3	46179	6,6	0,3	R GDYVPGLK V K RGDYVPGLK V K GYGVESFGADR K K NGPIILEMDTYR Y + Oxidation (M)

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	PM/pi	Voi	Peptídeos
	pyruvate dehydrogenase		<i>Oryza sativa</i>	Q654V6	91	43655	8,8			R GDYVPGLK V K RGDYVPGLK V
153	Formate dehydrogenase	Processos Celulares	<i>Quercus robur</i>	Q7XHJ0	72	40588	6,5	45589	6,8 0,2	R ILILVR N K GVLVNNAR G K HIPDLHLVLTTPFFHPAYVTAER I
162	(+)-pulegone reductase	Metabolismo e energia	<i>Mentha piperita</i>	Q6WAU0	107	37915	6,3	43913	6,3 0,3	K FLEMVLPRI + Oxidation (M) K KGETVFTAAAGSVGQLVGQFAK M
	Quinone oxidoreductase-like protein		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L997	46					K LMGCYVVGSAQSK.E + Oxidation (M) K NLYLSCDPYMR N + Oxidation (M)
163	(+)-pulegone reductase	Metabolismo e energia	<i>Mentha piperita</i>	Q6WAU0	69	37915	6,3	43913	6,6 0,2	K FLEMVLPRI + Oxidation (M) K KGETVFTAAAGSVGQLVGQFAK M K MFGCY V
171	protein disulfide-isomerase	Processos Celulares	<i>Prunus avium</i>	Q9FUL2	101	21763	6,1	42081	5,7 0,5	K ADEFTLK K K YGVSGFFPTLK F K GQLTSKAGV L
173	aldehyde dehydrogenase	Processos Celulares	<i>Zea mays</i>	Q7FWR0	80	58627	6,4	41833	5,6 0,2	K VGPALACGNTVVLK T K LAFTGSTG T K TAEQTPLSA L
177	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Panax ginseng</i>	Q6VAL5	236	31812	6,4	40593	6,6 0,3	R SSIFDAK A K LTGMAFR V + Oxidation (M) K KVVISAPSK D

## ANEXO U

Tabela 13 -- Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos	(continuação)
										R AASFNIIPSSSTGAAK A R VPTVDVSWDLTVR L R FGIVEGLMTTVHSITATQK T + Oxidation (M)	
										K GILGYTEDDVVSTDFLGDSR S	
										R SSIFDAK A K LTGMAFR V + Oxidation (M) K KVISAPSK D R AASFNIIPSSSTGAAK A R VPTVDVSWDLTVR L R DDVELVAVNDPFISTDYMTYMFK Y + 2 Oxidation (M)	
										R SSIFDAK A K TLLFGEK A K VIISAPSK D K IGINGFGR I K KVIISAPSK D K DAPMFVVGVNEK E + Oxidation (M) R VPTVDVSWDLTVR L	
										K VVISAPSK D K TLLFGEK A K LTGMSFR V + Oxidation (M) K IGINGFGR I K KVISAPSK D K DAPMFVVGVNEK Q + Oxidation (M) R VPTVDVSWDLTVR L	
										K VVISAPSK D K TLLFGEK A K LTGMSFR V + Oxidation (M) K IGINGFGR I K KVISAPSK D K DAPMFVVGVNEK Q + Oxidation (M) R VPTVDVSWDLTVR L	
178	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo e energia	<i>Nicotiana glauca</i>	Q9XG67	329	36725	7,7	40510	6,7	0,5	
			<i>Tabalaacum</i>								
			<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. nigra</i> .	Q3LUR8	326	37241	7,7				



## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

(continuação)									
Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos
191	Pyruvate dehydrogenase	Metabolismo e energia	Zea mays	Q9ZQY1	92	39963	5,5	36828	5,5 0,4 0,4 K VLTPTYSSSEDARG K SNYMSAGQISVIPVFR G + Oxidation (M) K RACYRAVP M
192	NADPH-thioredoxin reductase	Metabolismo e energia	Oryza sativa	Q6ZFU6	78	34676	6,2	36503	6,3 0,1 0,1 K GVFAAGDVQDK K K GVFAAGDVQDKK Y R GISACAVCDGAAPIFR N
209	26S proteasome	Vias de Informação	Oryza sativa	Q9SDD1	92	34339	6,1	0,3	K LAIANVGR Q K VVIDAFR L R HYYSIAINYR K K AVQEEDELPEK L R LNPQTMMLGQEPR Q + 2 Oxidation (M)
225	Hypothetical protein	unknown	Arabidopsis thaliana	Q8LF67	50	29971	7,1	27798	6,2 0,1 0,1 R TLMNVFDK A + Oxidation (M) R GSSIWYGCVLR G R AFYSVGFW I
230	Ascorbate peroxidase	Metabolismo e energia	Vitis pseudoreticulata	Q1AFF4	62	27615	5,6	26411	6,7 0,4 0,4 K SYPTVSEEEK K K SYPTVSEEEK A KNCAPIML R K YAADEDAFFEDYKEAHL K
236	proteasome endopeptidase	Vias de Informação	Arabidopsis thaliana	O81149	207	25947	4,7	24706	4,6 0,1 0,1 K EGVWLAVEK R K EGVWLAVEK R R GVNTFSPEGR L K VTPNNVDIAK V R ITSPLLEPSSVEKI R LFQVEYAEIAIK L K IMEIDDHIGCAMSLIADAR T + 2 Oxidation (M)

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pi	PM/pi	PM/pi	Vol	Peptídeos	(continuação)
233	L-ascorbate peroxidase 1b	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q1PER6	122	28006	5,9	25945	6,4	0,4	K TGGPFGTIR H K TGGPFGTIR H K TGGPFGTIR H K DIVALSGGHTLGR C
239	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT2)	Estrutura e Organização	<i>Eucalyptus globulus</i>	Q9SWB9	119	19816	4,8	24320	5,4	0,5	R ILAMDINR E + Oxidation (M) R DFVLELNK A R ENFEIGLPIQK A R LAWHSAGTFDVTKT T
	Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase		<i>Codonopsis lanceolata</i>	Q2WFL0	41	27799	5,3				R ILDLVK.V K ILAMDINR E + Oxidation (M) R DFVLELNK A
	AAA ATPase; 26S proteasome subunit P45	Vias de Informação	<i>Medicago truncatula</i>	Q2HTA3	44	49486	5,9				K AICTEAGLLALR E R IESLDPALLRPRGR I
246	inorganic diphosphatase	Metabolismo e energia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P21216	89	24671	5,3	22782	6,2	0,2	K IIVCADDPEFR H R AIGLMPMIDQGEKDDK I + 2 Oxidation (M)
	Soluble inorganic pyrophosphatase		<i>Papaver rhoea</i>	Q2P9V1	63	24417	5,9				K IIVCADDPEYR.H R AIGLMPMIDQGEKDDK I + 2 Oxidation (M) R VLYSSVYVPHNYGFIPR T
248	Ascorbate peroxidase	Metabolismo e energia	<i>Phaseolus lunatus</i>	Q4ZJ68	65	13508	4,8	21864	5,5	0,3	R LPDATK G K ALLTDPVFRPLVEK Y
	Ascorbate peroxidase		<i>Hordeum vulgare</i>	Q945R5	65	27639	5,1				K TGGPFGTMK C + Oxidation (M) K NCAPLMLR L + Oxidation (M)

## ANEXO U

Tabela 13 – Proteínas exclusivas na madeira oposta em relação à madeira normal aos 15 dias de indução

Spot	Proteína	Classificação	Espécie	N°	Score	PM/pl	PM/pl	Vol	Peptídeos	(conclusão)	
									R QDKPEPPEGR L K YAADEDAFFADYAEHLK L		
249	Cytosolic ascorbate peroxidase	Metabolismo e energia	<i>Dimocarpus longan.</i>	Q5IAC4	44	23095	4,7	21788	5,4	0,5	R DVFGHMGLSDKDIVALSGGHTLGR C + Oxidation (M)
	Ascorbate peroxidase		<i>Pinus pinaster</i>	Q6RY58	37	27267	5,4				R IAWHSAGTYDVK T
253	Putative proteasome subunit	Vias de Informação	<i>Oryza sativa</i>	Q6ZIB4	91	23817	5,8	19661	6,7	0,4	K GCVFTYDAVGSYER T R FFPYYAFNVLGGLDSEGK G K SPSPLLLPA R

Spots diferencialmente expressos através da ANOVA e teste de comparação de médias t-student  $P \leq 0,01$ . Score: obtido através do MASCOT. PM/pl teórico, peso molecular e ponto isoelétrico teóricos; PM/pl exp, peso molecular e ponto isoelétrico experimentais; Vol, volume normalizado %