

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

**Caracterização do proteoma de folhas de plantas de  
*Eucalyptus grandis* sob déficit hídrico**

**Andressa Fernanda Ducatti de Gois**

Monografia apresentada para obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas,

**Piracicaba  
(2017)**



**Andressa Fernanda Ducatti de Gois**  
**Bacharel em Ciências Biológicas**

**Caracterização do proteoma de folhas de pantas de *Eucalyptus grandis*  
sob déficit hídrico**

Orientador:  
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Monografia apresentada para obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba**  
**(2017)**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Gois, Andressa Fernanda Ducatti

Caracterização do proteoma de folhas de plantas de *Eucalyptus grandis* sob déficit hídrico/ Andressa Fernanda Ducatti de Gois. - - Piracicaba, 2017.

88 p.

Monografia (Bacharelado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Eucalipto; 2. Proteômica quantitativa label-free; 3. Déficit Hídrico

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## RESUMO

### Caracterização do proteoma de folhas de plantas de *Eucalyptus grandis* sob déficit hídrico

O setor florestal é de grande importância para a economia brasileira, sendo responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais e 6,2% do PIB Industrial no país. Entre as diversas espécies arbóreas plantadas o eucalipto é a que ocupa maior área, com mais de 5 milhões de hectares, e está disperso por quase todo o território nacional, mas principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Por conta dessa diversidade de paisagem necessita-se utilizar variedades adaptadas a cada local, para que sejam as mais produtivas possíveis. Em relação ao eucalipto a principal limitação para o seu crescimento é a água. Assim, identificar e compreender os mecanismos responsáveis pela resistência à seca permitirá o desenvolvimento de plantas tolerantes à seca e com maior produtividade. A resposta a deficiência hídrica gera mudanças importantes nos processos fisiológicos e morfológicos das plantas, tais como redução da dimensão foliar e biomassa. Neste sentido, a biologia molecular aparece como uma importante ferramenta na identificação de genes, proteínas e vias metabólicas, que regulam a resposta da planta ao estresse. Nesse trabalho foi usada a proteômica quantitativa *label-free* para a caracterização do proteoma foliar de dois genótipos de eucalipto contrastantes, em resposta a restrição hídrica e foi feita a análise dos parâmetro fisiológicos. Dentro de cada genótipo foi feito um grupo controle onde as plantas permaneceram irrigadas. A comparação controle versus tratamento do genótipo tolerante (CTxTT), resultou na quantificação de 1135 proteínas, entre elas Hsp70, RPS1 e LHC4.2. Os processos biológicos mais importantes para o tratamento foram resposta ao calor, resposta ao estímulo de luz e resposta ao estresse. E para a comparação do genótipo suscetível, controle versus tratamento (CSxTS) foram quantificadas 1255 proteínas, entre elas VAR2, GR e AT4G02530 (CYP26-2), e entre os processos biológicos no tratamento destacam-se resposta ao estresse e resposta a estímulos. Sendo assim, o proteoma refletiu a expressão das moléculas que influenciam, mais diretamente, a bioquímica e o funcionamento celular, revelando que ambos os genótipos respondem diferentemente a influência do déficit hídrico.

**Palavras-chave:** 1. Eucalipto; 2. Proteômica Quantitativa *Label-Free*; 3. Déficit Hídrico

## ABSTRACT

### **Characterization of plant proteome of *Eucalyptus grandis* under water stress**

Silviculture has been of great importance to Brazilian economy, accounting for 91% of all wood produced for industrial purposes and 6.2% of the Industrial PIB in the country. Among the several arboreal plant species planted in Brazil, eucalyptus occupies the largest area with more than 5 million hectares, and is spread throughout most of the territory, but mainly Minas Gerais, São Paulo and Mato Grosso do Sul. Due to the different landscapes it is necessary to use varieties adapted to each local, to assure the greatest yields. The main limitation for eucalyptus growth is water. So discovering and understanding the mechanisms responsible for drought resistance allows the development of drought tolerant plants with higher productivity. As a response, water deficit generates important changes in morphological and physiological processes in plants as it causes the limitation of individual leaves size as well as biomass. In this sense, molecular biology appears as an important tool to identify genes, proteins and metabolic paths, which regulate the plant response to stress. To characterize the proteome of the leaves of eucalyptus under drought stress of two contrasting genotypes, it was used label-free quantitative proteomics and it was done the physiologics parameters analyses. For each genotype was created a control group which was kept irrigated. The comparison of the control versus treatment tolerant genotype (CTxTT) were quantified 1135 proteins, among them Hsp70, RPS1 and LHCb4.2. The most important biological processes were heat response, light stimulation response and response to stress. And for the comparison of the susceptible genotype, control versus treatment (CSxTS) were quantified 1255 proteins, among them VAR2, GR and AT4G02530 (CYP26-2), and between the biological processes the most important ones were response to heat and response to stimulus. Therefore, the proteome reflects the expression of the molecules it influences, primarily the biochemistry and cellular functioning, revealing that both genotypes respond differently to water deficit.

**Key-words:** 1. Eucalyptus; 2. Quantitative label-free proteomics; 3. Water Deficit

## 1. INTRODUÇÃO

*Eucalyptus* é um dos mais importantes gêneros, pertencente à família Myrtaceae, sendo usado na indústria de papel e celulose e de madeira (LEONARDI et. al., 2015). Há mais de 700 espécies desse gênero, que é originário da Austrália e Indonésia. Este é o gênero mais cultivado mundialmente por causa de sua adaptabilidade a diferentes condições climáticas e seu fácil uso em programas de melhoramento genético, além disso, proporciona um rápido retorno financeiro e uma alta produtividade com custos reduzidos (PIRES et al., 1996; MARTINS et al., 2001; VELLINI, 2007; LEONARDI et. al., 2015).

No Brasil, dos 851 milhões de hectares menos de 1% é destinado a plantação de florestas, o que corresponde a 7,84 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto, pinus e outras espécies. Esse setor é responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais e 6,2% do PIB Industrial no País, sendo o líder mundial em produtividade de madeira (IBÁ, 2017). Além disso, em 2016 a produção brasileira de celulose cresceu 8,1% em relação a 2015 tornando o Brasil o segundo maior produtor mundial de celulose (IBÁ, 2017). Ainda de acordo com o IBÁ 2017, as plantações de eucalipto ocupam 5,7 milhões de hectares de floresta plantada no Brasil em mais de 15 estados, sendo os principais: Minas Gerais com 24%, São Paulo com 17% e Mato Grosso do Sul com 15%, por isso a importância em se estudar este gênero.

A deficiência hídrica no solo e na atmosfera aliada a altas ou baixas temperaturas e radiação são os principais estresses que limitam a sobrevivência e produtividade agronômica e florestal (BOYER, 1982; FLEXAS et al., 2002; AREND e FROMM 2007; MARTINEZ-MEIER et al. 2008; CRAMER et al., 2011; ZADRAŽNIK et. al. 2013). Como resposta a deficiência hídrica, as plantas sofrem mudanças importantes nos seus processos fisiológicos (PIMENTEL, 2005) e morfológicos (CHAVES et al., 2004), havendo restrição ao acúmulo de biomassa (SILVA, 1998). Essa restrição prejudica o crescimento inicial e também em estádios mais tardios das plantas, pois causa limitação da dimensão das folhas individuais, do número de folhas, do número e taxa de crescimento dos ramos e do crescimento do caule (OSÓRIO et al., 1998).

Neste sentido, a biologia molecular aparece como uma importante ferramenta na identificação de genes, proteínas e vias metabólicas, que regulam a resposta da planta ao estresse, permitindo a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na resposta ao estresse hídrico nos níveis celulares e moleculares (PRABU et al., 2011).

Umas das ferramentas da biologia molecular é a proteômica que refere-se ao estudo do proteoma, ou seja, do conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma célula sob determinado ambiente. Sendo assim, o proteoma reflete a expressão das moléculas que influenciam diretamente a bioquímica e o funcionamento celular, auxiliando na compreensão da resposta de plantas que estão sob condições de estresses bióticos e abióticos, podendo ser um aliada em programas de melhoramento vegetal (SILVA et.al., 2007).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Eucalipto

O eucalipto é uma angiosperma pertencente à família *Myrtaceae* e ao gênero *Eucalyptus*. O gênero possui mais de 700 espécies originárias principalmente da Austrália, mas também tendo espécies da Nova Guiné, Indonésia e Filipinas. Por sua capacidade em se adaptar a diferentes condições climáticas e por seu fácil uso em programas de criação, além de proporcionar um rápido retorno financeiro e uma alta produtividade com custos reduzidos, é, atualmente, o gênero mais cultivado mundialmente (PIRES et al., 1996; MARTINS et al., 2001; VELLINI, 2007; LEONARDI et. al., 2015).

No Brasil, as principais espécies plantadas são o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus viminalis*, híbridos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis* (CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM FLORESTAS, 2017).

*E. grandis* é a espécie de eucalipto mais cultivada no país, pois tem rápido crescimento, características silviculturais desejáveis, propriedades diversas da madeira, importância econômica e variabilidade genética grande (MIRANDA, 2012). Sua madeira é marrom-rosada e apresenta densidade baixa sendo destinada em sua maioria para a produção de celulose e papel, painéis de fibra e aglomerado, combustível industrial, doméstico e produtos de serraria (SOARES et al., 2003). Além disso, segundo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) sua madeira também pode ser utilizada na construção civil leve (ripas, partes secundárias de estruturas, cordões, guarnições, rodapés, forros, lambris, pontaletes, andaimes, tábuas, tacos e parquetes).

O *E. saligna* é plantado principalmente nos estados de São Paulo e Paraná. Sua madeira vermelha-clara é pesada e de boa qualidade, podendo ser utilizada para diversos fins (FERREIRA, 1979). Suas folhas contém 1% de óleo essencial (LORENZI et al. 2003).

A madeira de *E. urophylla* apresenta densidade mediana (MOURA, 1986), e pode ser usada na produção de carvão, biomassa, chapas, aglomerados, painéis, celulose, postes e dormentes (MOURA, 2004).

Em *E. viminalis* a madeira pode ser utilizada para caixotaria, escoras de construção, mourões e lenha. A espécie é altamente resistente à geadas, suscetível à deficiências hídricas e apresenta boa capacidade de regeneração por brotações das cepas. Por conta disso, é uma espécie com alto potencial para regiões com ocorrência de geadas severas (FERREIRA, 1979).

O *E. citriodora* ou *Corymbia citriodora* é muito cultivada para reflorestamentos e para extração de óleo essencial das folhas para a indústria de perfumaria e desinfetantes (LORENZI et al. 2003). Sua madeira marrom é dura e de fácil manuseio, e segundo Reis et al. (2013), ela é utilizada na produção de carvão vegetal, cabos de ferramentas, cercas, cruzetas, dormentes, lenha, mourões, pontaletes, postes e serraria (vigas, caibros e móveis). Além disso, o óleo essencial extraído de suas folhas tem sido usado na aromatização de ambientes e produção de desinfetantes, detergentes, sabões, mascarantes industriais, ceras, saponáceos, pedras sanitárias e como matéria-prima para a indústria de perfumaria e fármacos (VITTI et. al, 2003; VIEIRA, 2004).

O *E. camadulensis* é utilizado para reflorestamento. Sua madeira é avermelhada, dura e muito densa, sendo uma das madeiras com maior durabilidade. Por isso, em estudos feitos em São Paulo a espécie demonstrou ser útil para serraria, postes, dormentes, mourões, lenha e carvão. Para celulose e papel não é muito aceita (FERREIRA, 1979).

## **2.2. Estresse hídrico**

A deficiência hídrica no solo e na atmosfera aliada a altas ou baixas temperaturas e radiação são os principais estresses que limitam a sobrevivência e produtividade agronômica e florestal (BOYER, 1982; FLEXAS et al., 2002; AREND & FROMM 2007; MARTINEZ-MEIER et al. 2008; CRAMER et al., 2011; ZADRAŽNIK et. al. 2013). Como resposta à deficiência hídrica, as plantas sofrem mudanças importantes nos seus processos fisiológicos (PIMENTEL, 2005) e morfológicos (CHAVES et al., 2004). A primeira reação ao déficit hídrico é o fechamento dos estomatos (SILIM et. al., 2009; CARUSO et. al. 2002), para assim, limitar a perda de água e, consequentemente danos nos tecidos.

Durand et. al., 2011 viram que os efeitos do estresse hídrico em populus foram o fechamento estomático, a redução do potencial hídrico foliar, queda de

folhas e inibição geral de crescimento. Eles mostraram que um dos principais efeitos do estresse hídrico em folhas de populus foi a redução na quantidade de proteínas relacionadas à fotossíntese, como *4 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/-oxygenase* (rubisco). Além disso, houve redução também no metabolismo de carboidratos (*fructose-bisphosphate aldolase* e *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e no metabolismo de proteínas (*O-acetylserine (thiol)lyase*). Proteínas relacionadas à membrana celular também foram afetadas, tendo aumentado suas expressões (*2 plastid-lipid-associated proteins* e *SHOOT 1*). As proteínas do complexo *water-splitting* (proteínas do fotossistema II como D1, D2, CP43) são conhecidas por serem boas indicadoras de seca, portanto houve redução em abundância dessas proteínas nas plantas sob estresse hídrico e, após a recuperação dessas plantas. Em relação aos dados fisiológicos, a condutância estomática reduziu 77% e a taxa fotossintética 74% nas plantas sob estresse hídrico.

Valdés et. al. 2013 em estudo com *Eucalyptus globulus* mostrou que as plantas tolerantes sob estresse hídrico apresentaram queda parcial de folhas e um sistema radicular mais complexo. Além disso, as sementes dessas plantas apresentaram tamanho e pesos menores do que as sementes das plantas sensíveis sob estresse. Segundo os autores, o estresse hídrico dos tecidos vegetativos está diretamente correlacionado com o grau de desidratação das sementes maduras, sendo que tanto a dessecação das sementes quanto a tolerância ao estresse dependem da acumulação de proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), e nesse trabalho eles encontraram duas proteínas RAB (RAB17 e RAB28), pertencentes a família de proteínas LEA. Eles também mostraram que nas plantas tolerantes sob estresse a quantidade de ácido abscísico (ABA) foi maior tanto nas folhas quanto nas raízes, mostrando estar de acordo com o fato de nessas plantas o sistema radicular ter se apresentado mais ampliado e de ter sido mantido o crescimento da raiz mesmo sob estresse.

Bedon et. al. 2012 em estudo com genótipos contrastantes de *Eucalyptus* viram que o estresse hídrico afetou todas as variáveis de crescimento das plantas, como altura, biomassa e número e área foliar. Segundo os autores, o tratamento de não irrigação afetou a parte aérea de ambos os genótipos, de forma diferente. Em relação às proteínas envolvidas com a resposta ao déficit de água os autores identificaram proteínas

relacionadas à modificação da parede celular, detoxificação celular e osmoreregulação.

Ainda segundo Bedon et. al. 2012, em relação às modificações da parede celular eles identificaram a actina, que é uma proteína essencial durante a deposição de celulose da parede celular secundária (WIGHTMAN & TURNER 2008); a endoquitinase básica (EC 3.2.1.14), que o seu acúmulo pode ser em consequência de alterações na parede celular. Outra proteína encontrada que está relacionada a modificações da parede celular é a *caffeic acid/5-hydroxyferulic 3-Omethyltransferase* (COMT, EC 2.1.1.68), que é uma enzima que está envolvida com a biossíntese de lignina e que foi encontrada em baixa quantidade no caule (BEDON et. al. 2012).

Já para as proteínas identificadas no trabalho de Bedon et. al. 2012 envolvidas com detoxificação celular e osmoregulação são a *disulfide-isomerase* (PDI; EC5.3.4.1) e a *serine glyoxylate aminotransferase* (SGAT, EC2.6.1.45). SGATs são enzimas chaves da fotorrespiração e catalisam a reação do glutamato e glioxilato para produzir 2-oxoglutarato e glicina. Duas isoformas da enzima ADK 2 (EC 2.7.1.20, *Adenosine 5'-phosphotransferase* 2, ADK), catalisam a formação de ATP e acredita-se que mantenham as atividades de metilação durante o estresse salino (WERETILNYK et al. 2001). Além disso, funcionam como osmólitos para manter o turgor da célula e estabilizar a conformação da proteína e a estrutura celular quando sob estresse hídrico (BARTELS & SUNKAR 2005), estando relacionada à osmorregulação; e duas proteínas ATP sintase subunidade beta de cloroplasto e mitocôndria, ambas com baixa abundância durante o período de seca, assim como foi visto por Lawlor & Tezara 2009, que mostraram que o déficit de água altera a produção de ATP como consequência do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo fato de haver baixa assimilação de CO<sub>2</sub> e fotorrespiração devido ao aumento da energia de transdução.

### **2.3. Proteômica**

A biologia molecular aparece como uma importante ferramenta na identificação de genes, proteínas e vias metabólicas que regulam a resposta da planta ao estresse, permitindo a compreensão dos mecanismos básicos

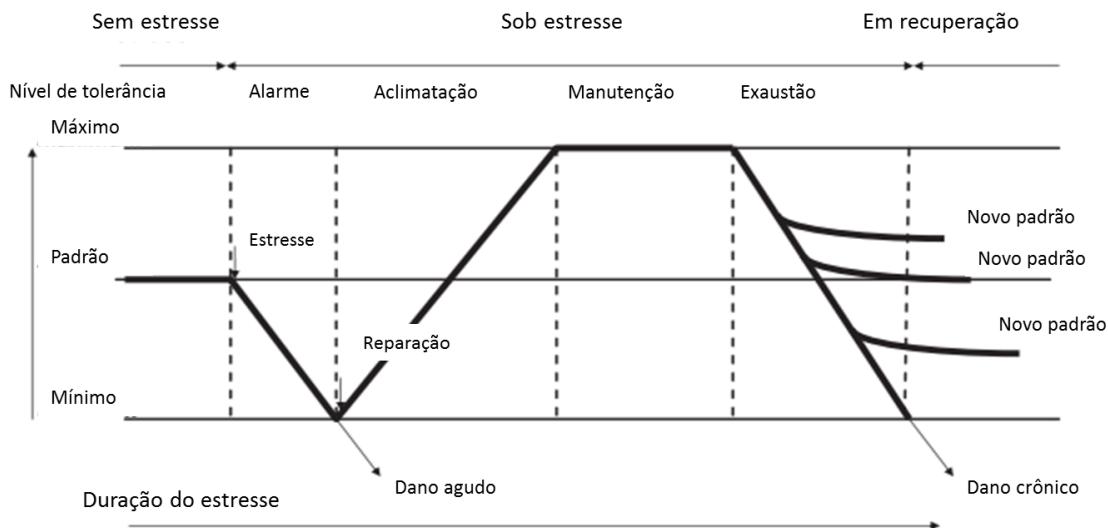
envolvidos na resposta ao estresse hídrico nos níveis celulares e genéticos (PRABU et al., 2011).

A proteômica refere-se ao estudo do proteoma, ou seja, do conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma célula sob determinado ambiente. Sendo assim, o proteoma reflete a expressão das moléculas que influenciam diretamente a bioquímica e o funcionamento celular, auxiliando na compreensão da resposta de plantas que estão sob condições de estresses bióticos e abióticos, podendo ser uma aliada em programas de melhoramento vegetal (SILVA et.al., 2007).

Estresses abióticos limitam bastante o crescimento e desenvolvimento de plantas. E uma das estratégias para as plantas reagirem ao estresse é por meio da aclimatação (LEVITT, 1980 e LARCHER, 2003). A aclimatação ao estresse é mediada via mudanças profundas na expressão gênica, o que resulta em mudanças na composição do transcriptoma, proteoma e metaboloma da planta (KOSOVÁ et al., 2011). Gygi et al. 1999 e Bogeat-Triboulou et al. 2007 mostram que as mudanças que ocorrem a nível de expressão gênica ou no transcriptoma nem sempre correspondem às mudanças a nível de proteína, e as proteínas, diferente dos transcritos, correspondem diretamente às respostas das plantas ao estresse.

Kosová et al., 2011 mostra que a resposta das plantas ao estresse é um processo dinâmico onde diversos estágios podem ser estabelecidos, como é visto na Figura 1, e cada um desses estágios pode ser caracterizado por sua composição proteômica única.

Em trabalhos como os de Abbasi et al. 2004, Yan et al. 2006, Gao et al. 2009 e Bohler et al. 2010 é visto que muitas proteínas de resposta ao estresse mudam em relação a abundância, de acordo com mudanças no nível de tolerância da planta sob estresse. Por exemplo, em plantas no estágio de alarme as respostas ao estresse podem ser caracterizadas pela ativação de diversos caminhos de sinalização de indução de estresse e pelo aumento de estresse oxidativo. Já os estágios de aclimatação estão associados com sínteses *De Novo* de muitas proteínas protetoras, como chaperonas; ROS; COR/LEA; PCs, e outros compostos, como antioxidantes e osmoprotetores.



**Figura 1.** Esquema da dinâmica de resposta de plantas a estresses abióticos. Cada estágio de resposta ao estresse da planta corresponde a uma composição proteômica diferente. (Adaptado de: Kosová et al. 2011).

Inicialmente, a proteômica estava associada à identificação de um grande número de proteínas de uma célula ou organismo, por meio da focalização isoelétrica e géis bidimensionais (MEIRELES, 2007). Nesse contexto, os primeiros estudos relacionados à proteômica surgiram na década de 1970, quando pesquisadores iniciaram o mapeamento de proteínas de alguns organismos e construíram os primeiros bancos de dados (O'FARREL, 1975; KLOSE, 1975; SCHEELE, 1975). No entanto, o termo “proteoma” surgiu em 1994, para designar o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma célula, em um determinado ambiente (WILKINS et al., 1995; ANDERSON e ANDERSON, 1996).

Uma das técnicas usadas em proteômica é a espectrometria de massas, que converte moléculas em íons em fase gasosa que serão separados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (WILSON E WALKER, 2010). Os espectrômetros de massas possuem um sistema de entrada de amostras, uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector, sendo que esses dois últimos compartimentos estão em um sistema de alto vácuo.

Dentre os tipos de fontes de ionização usadas na análise de proteômica, destacam-se duas, a ionização por Eletrospray (ESI) e a ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Há também diversos tipos de analisadores de

massas como o tempo de voo (TOF), orbitrap, híbridos quadrupolo-TOF, entre outros.

A proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas tem contribuído para o entendimento de processos biológicos fundamentais (AEBERSOLD E MANN, 2003). A partir dessa técnica é possível quantificar as diferenças existentes entre dois ou mais estádios fisiológicos de um determinado sistema biológico ou entre dois ou mais genótipos de uma mesma espécie (BUDZINSKI et. al. 2013).

Dentre as técnicas de proteômica quantitativa, as mais utilizadas são: a quantificação com marcação isotópica de proteínas e peptídeos e a quantificação *label-free* (livre de marcação), em que é possível fazer a quantificação absoluta sem a necessidade de usar padrões de referência marcados com isótopos estáveis (BUDZINSKI et. al. 2013). Esta técnica de identificação e quantificação sem a necessidade de marcação isotópica tem crescido bastante na última década (NAHNSEN et al., 2013), e baseiam-se em dois métodos: os que utilizam a intensidade do sinal de MS (espectro completo – full scan) do peptídeo intacto para a quantificação direta da proteína equivalente (TIMM et al, 2008), e os que inferem na quantificação, de forma indireta, baseados na contagem dos espectros obtidos para cada proteína (ZANG et al, 2006). Os métodos que usam a intensidade do sinal de MS são mais comumente utilizados para o caso de quantificação absoluta (SCHWANHAUSSER et al, 2011). O *High<sup>3</sup>* ou *Top<sup>3</sup>* é um método alternativo de quantificação (SILVA et al, 2006). Nesse caso, considera-se o sinal dos três peptídeos mais intensos de uma proteína, assumindo-se que a intensidade do sinal de MS desses peptídeos seja aproximadamente a mesma.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi a análise do proteoma foliar de plantas de eucalipto submetidas ao déficit hídrico, visando, assim, a compreensão global dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos nas respostas ao déficit hídrico e dos mecanismos de tolerância a esse estresse.

Para alcançar tal objetivo, foi realizado o processamento e a análise estatística de dados fisiológicos e de proteômica quantitativa, obtidos através de trabalhos realizados previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas. Toda a parte experimental foi realizada pelo pós-doutor Leonardo Cesar Ferreira.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Caracterização dos genótipos contrastantes

Foram selecionados dois genótipos contrastantes do *E. grandis Putiri*, um tolerante e um suscetível, comparando a velocidade de murchamento das folhas em função da submissão ao déficit hídrico. O material vegetal foi fornecido pela empresa Suzano Papel e Celulose. Dentro de cada genótipo foi feito um grupo controle, Controle Suscetível (CS) e Controle Tolerante (CT), onde as plantas permaneceram irrigadas (capacidade de campo), e um grupo tratamento: Tratamento Suscetível (TS) e Tratamento Tolerante (TT), que foi submetido ao estresse hídrico, com 40% da capacidade de campo, condição suficiente para manter o estado de murchamento, porém sem levar à necrose e abscisão foliar. Para cada grupo foram feitas três repetições biológicas (Figura 2).

As plantas foram mantidas a 40% da capacidade de campo, valor escolhido a partir de avaliações visuais de murchamento. Para tanto, a mistura substrato e vermiculita era coletada da superfície dos vasos, disposta em placas de Petri, pesada para obtenção da massa da mistura úmida e posteriormente acondicionada em estufa a 105°C por 24h. Após este período, as placas foram novamente pesadas para obtenção da massa da mistura seca. Desta forma, a quantidade de água presente no vaso foi obtida a partir de uma regra de três simples, a qual envolvia a massa de água e a massa da mistura seca presentes na placa de Petri e também as presentes no vaso. Assim, com base na curva de retenção, foi possível obter o volume de água a ser reposto no vaso para que as plantas permanecessem a 40% da capacidade de campo. Esta atividade era realizada três vezes por semana para manutenção deste teor de água.



**Figura 2.** Fotos dos genótipos selecionados contrastantes quanto ao déficit hídrico.

#### **4.1.1. Medidas de trocas gasosas**

A taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração foram avaliadas em folhas do terço médio de plantas de ambos os genótipos, nas duas condições hídricas por meio de um analisador de gás infravermelho (Licor, LI-6400). Para este trabalho foi utilizado apenas o valor de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR). As medições foram realizadas no período da manhã, entre 9 e 11h, no interior da casa de vegetação e em condições de céu aberto. A referência de CO<sub>2</sub> foi estabelecida a 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  e a referência de água, entre 18 e 20 mmol mol<sup>-1</sup>. O fluxo de CO<sub>2</sub> foi estabelecido a 350  $\mu\text{mol s}^{-1}$ .

#### **4.1.2. Análise estatística**

Os resultados referentes às medidas de troca gasosa foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) usando o ponto de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medido em folhas de três plantas diferentes. Os resultados passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene, e foi feito o teste de TukeyHSD a 5% de significância pelo programa R (R Development Core Team 2017).

### **4.2. Caracterização do proteoma foliar dos genótipos contrastantes de plântulas de *E. grandis* Putiri submetidas ao estresse hídrico**

#### **4.2.1. Coleta de material vegetal**

Amostras de folha foram coletadas de ambos os genótipos contrastantes, os quais apresentavam plantas bem-irrigadas (controle) e plantas submetidas ao déficit hídrico (tratamento, 40 % da capacidade de campo). Os tecidos foram embalados em papel alumínio, mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. No total foram coletadas doze amostras biológicas, sendo seis para cada genótipo. Dessas seis amostras, três são controle e três tratamentos.

#### 4.2.2. Extração das proteínas

As proteínas foliares foram extraídas conforme o protocolo de Hurkman & Tanaka (1986). Após maceração (2g de tecido foliar) em almofariz com nitrogênio líquido, adicionaram-se 15 mL de tampão de extração gelado constituído de 0,7 M sacarose; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M KCl; 50 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1% m/v PVPP e 2% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol. Após homogeneização das amostras em agitador por 30 min, com os tubos mantidos no gelo, adicionaram-se 15 mL de fenol saturado em Tris-HCl pH 7,5, seguido de nova homogeneização em agitador por 30 min e com os tubos mantidos no gelo. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Em seguida, adicionaram-se 15 mL do tampão de extração. Novamente as amostras foram homogeneizadas em agitador por 30 min, com os tubos mantidos no gelo.

Após centrifugação nas mesmas especificações acima, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente 15 ml de tampão de extração foram adicionados, porém agora sem a presença da PVPP. Após homogeneização em agitador e centrifugação nas mesmas especificações anteriores, o sobrenadante foi coletado e dividido em dois tubos, nos quais se adicionaram 30 mL de 0,1 M acetato de amônio preparado em metanol 100% (-20°C). Os tubos foram mantidos a -20°C para precipitação *overnight* das proteínas. No segundo dia, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 20 min a 4 °C, de modo que os *pellets* dos tubos iguais foram concentrados em um único apenas. Após esta etapa, adicionaram-se novamente 30 mL de 0,1 M de acetato de amônio preparado em metanol 100% (-20°C), de modo que os tubos foram mantidos por no mínimo 1h a -20°C, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4 °C e descarte do sobrenadante. Após repetição deste processo por mais duas vezes, adicionaram-se 30 mL de acetona 100%, os tubos também foram mantidos por no mínimo 1h a -20°C, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4 °C e descarte do sobrenadante.

Posteriormente, os *pellets* foram secos mantendo-se os tubos abertos inseridos em potes fechados preenchidos com sílica, os quais foram mantidos *overnight* e câmara fria a 4 °C.

As proteínas foram ressuspendidas em tampão de solubilização constituído de 7 M uréia, 2 M tiouréia, 10 mM DTT e 0,01% C7BzO.

#### **4.2.3. Dessalinização**

As amostras foram dessalinizadas em bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,5 por meio de filtros Amicon Ultra 0,5ml 3K (Millipore®).

#### **4.2.4. Quantificação das proteínas**

As proteínas foram quantificadas conforme o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o kit comercial *Protein Assay* (BioRad, catálogo 500-0006). Alíquotas de 1 a 2 µL da amostra adicionadas de bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,5 qsp 20 µL e com 980 µL do corante diluído em água milliQ (1:4) foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente, tendo suas absorbâncias medidas a 595 nm em espectrofotômetro. As concentrações de proteínas (µg/µL) foram calculadas por comparação com uma curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA).

#### **4.2.5. Digestão tríptica**

Alíquotas das amostras contendo 50 µg de proteína foram submetidas à digestão tríptica conforme o protocolo de Murad et al. (2011). Após adição de 25 µL da solução RapiGest SF (0,2%), as amostras foram mantidas a 80 °C por 15 min. Após centrifugação (pulso), adicionaram-se 2,5 µL de 100 mM de ditiotreitol (DTT), para a redução das pontes de dissulfeto . Após agitação em vórtex, as amostras foram mantidas a 60 °C por 30 min e novamente centrifugadas (pulso) após o resfriamento à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 2,5 µL de 300 mM de iodoacetamida (IAA) para a alquilação de cisteínas. Após agitação em vórtex, as amostras foram transferidas para o escuro por 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 10 µL de solução de tripsina (Promega) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Após agitação em vórtex, procedeu-se a digestão overnight a 37 °C. A proporção enzima:proteína foi de 1:100. O tempo de digestão foi padronizado em 14h. Após a digestão, adicionaram-se 10 µL de 5% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) para hidrolisar o RapiGest SF. Após

agitação em vórtex, as amostras foram incubadas a 37 °C por 90 min. Em seguida, estas foram centrifugadas a 18.000 x g por 30 min a 6 °C, secas em concentrador à vácuo e armazenadas a -80 °C.

#### **4.2.6. Purificação das amostras complexas**

Após ressuspensão das amostras em 50 µL de solução 0,1% TFA preparada em água milliQ, estas foram subdivididas em cinco frações de 10 µL e purificadas por meio de colunas *ZipTip Reversed-Phase C18 P10* (Millipore®). Após a purificação, os peptídeos de cada fração foram eluídos em 10 µL da solução 0,1% TFA em 50% ACN e combinados em um único *vial* e secas em concentrador à vácuo.

#### **4.2.7. LC-MS<sup>E</sup>**

As amostras foram ressuspensas em 32 µL de Formiato de amônio 20 mM pH10 e 8 µL de *Phosphorylase B* (SwissProt P00489, padrão interno 100 fmol.µL<sup>-1</sup>). Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters, Manchester, UK), acoplado ao sistema Acquity UPLC Mclass, com tecnologia 2D (Waters, Manchester, UK). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18 (5 µm, 300 µm x 50 mm) (Waters, Manchester, UK) e uma coluna analítica Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18 (1.7 µm, 75 µm x 150 mm) (Waters, Manchester, UK). As fases móveis da primeira dimensão foram: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico). Essa técnica combina a separação das proteínas usando-se um pH 10, na separação da primeira dimensão e um pH 2 na segunda dimensão, com auxílio de colunas de fase reversa (GILAR et al., 2005). A eluição foi realizada usando-se cinco gradientes binários diferentes de 20 mM de formiato de amônio pH 10 e acetonitrila, a um fluxo de 2µL·min<sup>-1</sup>). A proporção de acetonitrila da primeira fração até a quinta variou de 11,4 a 50%. Os peptídeos eluídos da coluna da primeira dimensão foram diluídos em linha com 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila a um fluxo de 20 µL·min<sup>-1</sup> e capturados por uma coluna Trap 2D

Symmetry. A separação, na segunda dimensão, foi realizada com um gradiente binário de 7 a 85% de acetonitrila, em 0,1% (v:v) de ácido fórmico durante 75 minutos, a um fluxo de 500 nL·min<sup>-1</sup>.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadruplo-tempo de voo (Q-TOF) Synapt G2 MS, equipado com uma fonte *nanolockspray* operando no modo positivo (Water, Manchester, UK), com *ion mobility*. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo "V", com a cela de *ion mobility* ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com (Glu1) fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> e a mesma solução foi empregada para o *lock mass* utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS<sup>E</sup> (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do *T-wave CID*, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de *m/z* entre 50 e 2000.

#### 4.2.8. Análise dos dados

O processamento dos espectros e a busca em bancos de dados disponíveis foram realizados com auxílio do ProteinLynx Global Server v.3.1 (PLGS). A versão do banco utilizada foi o *Eucalyptus grandis* v2.0 (<https://genome.jgi.doe.gov/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=Phytozome>), depositado no Phytozome v.12. O banco de dados foi anexado ao banco de dados original para avaliação da taxa de falsos positivos, definida a uma margem de até 4%. Nessas análises, os parâmetros de processamento utilizados foram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de íons fragmentos consecutivos (y<sup>+</sup>, b<sup>+</sup>) por peptídeo igual a 3; mínimo de fragmentos consecutivos por proteína igual a 7; mínimo de peptídeos (identificados pelos critérios anteriores), por proteína, igual a 2; apenas uma clivagem perdida foi permitida; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso-positivos (FDR) a 4%.

Para a identificação e quantificação proteica, as intensidades dos espectros obtidos foram calculadas por método estequiométrico, em detrimento

ao padrão interno de concentração conhecida conforme a linearidade do método, por análise de MS<sup>E</sup> e normalizado pela função de “auto-normalização” do próprio *software*. Somente as proteínas identificadas em pelo menos duas das três réplicas biológicas foram consideradas para as análises posteriores. Além disso, a quantificação de cada proteína foi normalizada, dividindo a sua concentração, em fmol, pela concentração total da amostra.

As análises estatísticas, foram realizadas no programa *on-line MetaboAnalyst* (XIA et al., 2011). Foi realizada transformação logarítmica ( $\log_2$ ) e escalonamento por Pareto, que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão para fazer o escalonamento de cada variável encontrada em Análises de Componentes Principais (PCA) (VAN DEN BERG et al., 2006). A PCA não leva em consideração os grupos analisados (teste estatístico não supervisionado), mas sim as características de cada indivíduo e cada componente principal (CP), o qual é constituído a partir da combinação linear das variáveis originais. Ela permite a observação da tendência de separação/formação de grupos nas amostras analisadas e permite também que amostras discrepantes (*outliers*) sejam identificadas (SENGUPTA et al., 2011).

Paralelamente as análises descritas acima foi realizado Teste-*t* de Student, para cada uma das comparações, também no *MetaboAnalyst* (XIA et al., 2011). O critério de seleção das proteínas diferencialmente expressas foi baseado no *p*-valor<0,05 do Teste-*t*. Para a etapa de anotação e categorização funcional foi utilizado o arquivo de anotação do genoma de *E. grandis* (Egrandis\_297\_v2.0.annotation\_info.txt) fornecido pelo website *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A descrição geral das funções das proteínas foi baseada no processo biológico do *Gene Ontology* (GO). O enriquecimento das categorias GO e identificação dos termos GO mais representativos foi realizado pelo aplicativo BINGO (versão 3.0.3), presente na plataforma *Cytoscape* 3.4.0 (CLINE et al., 2007), utilizando a distribuição hipergeométrica como teste estatístico e um FDR de 0,05. Para a compreensão de funções biológicas complexas e identificação de vias metabólicas, foi utilizada a plataforma REVIGO para filtrar os termos GOs e excluir as redundâncias.

Para a etapa de construção das redes de interação proteína-proteína foi utilizado o *software String* (versão 10.5), em que as interações incluem

associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). Além disso, ele pode ser usado em interface *front-end*, não havendo a necessidade, portanto, de ter esse *software* no computador (SZKLARCZYK et al. 2017).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Medidas de trocas gasosas

Os genótipos susceptíveis e tolerantes foram caracterizados quanto à taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração por meio do analisador de gás infravermelho (*infrared gas analyzer - IRGA*) (Licor, LI-6400). Para o presente trabalho apenas o valor de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossintética ativa (PAR) foi utilizado.

A Tabela 3 apresenta os valores das medidas de trocas gasosas para todos os tratamentos. Descreve também os resultados obtidos a partir da estatística de variância realizada.

**Tabela 3.** Médias dos valores obtidos para a Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos genótipos de *E. grandis* Putiri contrastantes.

Amostra	Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Teste de Tukey	Condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Teste de Tukey 2	Taxa de Transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Teste de Tukey 3
CT	16,99	a	0,485	a	5,427	a
TT	6,71	b	0,045	c	1,168	bc
CS	9,88	b	0,324	b	4,873	ab
TS	0,54	c	0,011	c	0,291	c

Segundo o teste de Tukey para a fotossíntese, os genótipos TT e CS não apresentaram diferença estatística entre si. O genótipo CT apresentou valor superior aos demais tratamentos, enquanto que o genótipo TS apresentou o menor valor. Isso revela que em ambos os genótipos as menores taxas fotossintéticas ocorreram entre os tratamentos sob estresse hídrico (TS e TT). Em relação à condutância estomática, os genótipos TS e TT não diferiram estatisticamente entre si e, ainda, apresentaram os menores valores quando comparados a todos os tratamentos, indicando assim que em plantas TS e TT esteja ocorrendo fechamento estomático. Tal fato é esperado uma vez que os genótipos encontram-se sob estresse, e acaba por corroborar com as menores taxas fotossintéticas observadas, as quais podem estar sendo influenciadas pela limitação de entrada do  $\text{CO}_2$ . Já o genótipo CT apresentou o maior valor

para essa medida, indicando que sob disponibilidade hídrica adequada a planta é capaz de manter seus estômatos abertos.

As respostas dos genótipos para taxa fotossintética e condutância estomática foram similares e isso é explicado por Whitehead & Beadle (2004), pois como as folhas de plantas do gênero *Eucalyptus* apresentam alta capacidade de fixação de carbono, é natural a observação de fortes relações lineares entre a fotossíntese e a condutância estomática. Sánchez-Rodríguez et al. (2011), também mostraram que o fechamento estomático devido ao estresse hídrico diminui a concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, limitando assim, a fotossíntese.

Para a taxa de transpiração, os genótipos CT e CS não diferiram estatisticamente entre si, para os genótipos CS e TT também não houve diferenças estatísticas, assim como para os tratamentos TT e TS. De acordo com a Tabela 3, ambos os genótipos tenderam a apresentar maiores taxas de transpiração nas plantas bem-irrigadas (CS e CT). Em relação às plantas submetidas ao estresse hídrico, os valores observados no genótipo tolerante foram ligeiramente maiores que os do suscetível. No trabalho de Costa e Silva et al. (2004) os autores avaliaram clones de *Eucalyptus globulus* contrastantes em relação ao estresse hídrico e observaram que houve maior transpiração em ambos os clones sob condições de boa irrigação (controle) e sob condições de estresse hídrico, ambos os clones apresentaram menor transpiração, assim como observado no presente estudo.

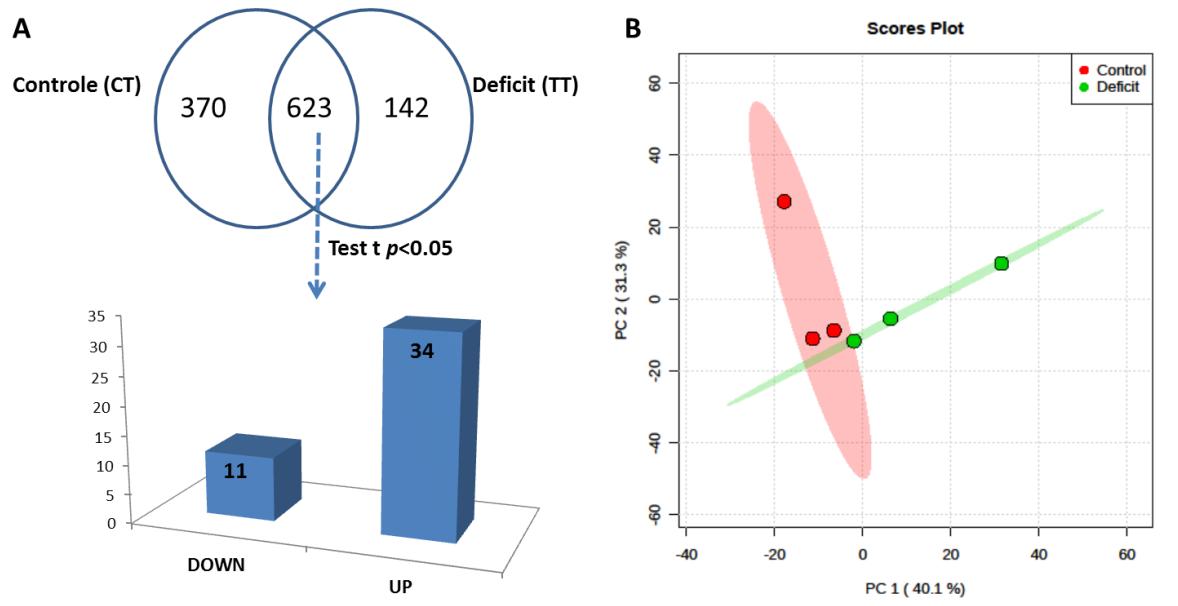
## **5.2. Caracterização do proteoma foliar dos genótipos contrastantes de *E. grandis* Putiri submetidos ao estresse hídrico**

### **5.2.1. Comparação CT xTT**

Foi realizada a análise comparativa dentro do genótipo tolerante e um total de 1135 proteínas foram quantificadas. A Figura 3A revela que, 370 proteínas foram identificadas como únicas para o tratamento sob irrigação (CT), enquanto 142 proteínas únicas foram identificadas nas folhas das plantas sob estresse hídrico (TT). Por sua vez, 623 proteínas compartilhadas foram encontradas em folhas de plantas dos dois tratamentos. Foi realizado um teste estatístico univariado (*teste t*) com as proteínas comuns. A partir desse teste

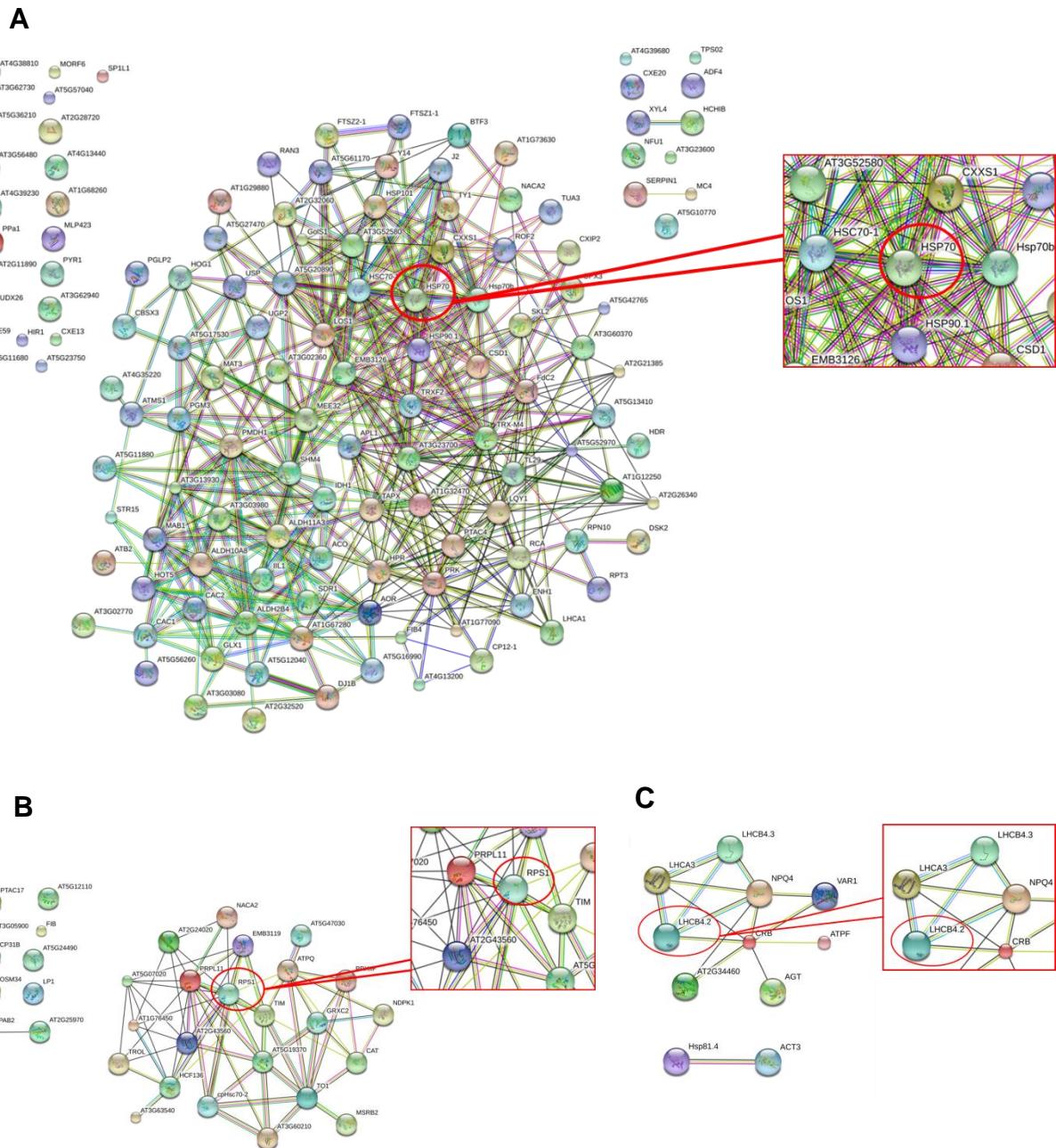
foram encontradas 34 proteínas mais expressas no TT e 11 que tiveram sua expressão diminuída no tratamento em relação às plantas controle.

Pela análise do PCA (Figura 3B) foi possível observar uma tendência de separação entre os dois grupos de estudo. A soma dos dois primeiros componentes principais da PCA explica 71,4 % da variância dos dados do modelo.



**Figura 3.** **A)** Diagrama de Venn que mostra o número de proteínas comuns entre os tratamentos (CTxTT). Além do gráfico que indica o número de proteínas com diferença estatística ( $p<0,05$ ). **B)** PCA Scores Plot da comparação entre os 2 grupos de estudo (CTxTT). O conjunto de dados obtidos para as repetições biológicas das plantas CT é representado pela cor vermelha, o das plantas TT pela cor verde.

De forma separada, as proteínas do TT foram categorizadas em processo biológico usando o *Cytoscape*. A redundância de tais processos biológicos foi eliminada com auxílio do software *ReVigo* e, em paralelo, foram construídas as redes de interação proteína-proteína no software *String*, como pode ser visto na Figura 4. As interações proteína-proteína ocorrem de forma bastante específica e desempenham um papel fundamental em muitos processos celulares, por isso a importância na construção dessas interações (Pedreira, 2012).



**Figura 4. A)** Interação proteína-proteína, das proteínas exclusivas para o tratamento do genótipo TT. Em destaque a proteína Hsp70. **B)** Interação proteína-proteína das proteínas mais abundantes no tratamento na comparação com o controle ( $p<0,05$ ). Em destaque a proteína RPS1. **C)** Interação proteína-proteína das proteínas com abundância diminuída no tratamento em relação ao controle ( $p<0,05$ ). Em destaque a proteína LHCb4.2. As proteínas que não interagiram estão dispostas na parte superior da figura. A linha azul clara representa as interações conhecidas de base de dados curada, a linha rosa representa as interações determinadas experimentalmente, a linha verde representa interações entre genes vizinhos, enquanto que a linha vermelha é para fusões de genes e a azul escura para co-ocorrência de genes, a linha amarela representa textmining, a linha preta co-expresão e a linha cinza representa proteínas homólogas.

O estresse hídrico induz várias respostas fisiológicas e bioquímicas na planta. Uma variedade de genes que respondem à seca tem sido descrita (INGRAM E BARTELS, 1996). Os genes induzidos durante condições de estresse hídrico funcionam não somente na proteção da célula à seca, pela produção de proteínas importantes, mas também na regulação de genes envolvidos na via de transdução de sinal como resposta ao déficit hídrico. Desse modo, o produto desses genes é classificado em dois grupos: um contém fatores de transcrição envolvidos na regulação da transdução de sinal; e o outro inclui proteínas que atuam no mecanismo de tolerância ao estresse, como proteínas que formam o canal de passagem de água através da membrana (aquaporinas), enzimas requeridas para biossíntese de vários osmoprotetores, proteases para o “turnover” de proteínas, enzimas de desintoxicação e proteínas que protegem macromoléculas e membranas. Incluídos nessa última classe estão os chaperonas moleculares (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

Dentro da rede de interação exclusiva para o tratamento do genótipo TT (Figura 4A) destacam-se as proteínas de choque térmico (Hsp - *Heat shock proteins*) que são importantes para o desenvolvimento celular e viabilidade em muitos organismos. Dentro desse grupo de proteínas há a Hsp70.

A Hsp70 é uma chaperona que interage com outras chaperonas e faz a troca de polipeptídeos nascentes ou desdobrados. Ela controla a atividade de proteínas regulatórias como *heat-shock factors*, que são os fatores transcricionais dos genes Hsps (MORIMOTO, 1998). Em plantas, membros da família Hsp70 são expressos em resposta a estresses ambientais ou abióticos como calor, frio, seca etc. (GUY AND LI, 1998; SUNG et al., 2001). Como a planta está sob estresse, espera-se que ela produza proteínas em resposta ao estresse, nesse caso estresse à seca.

As chaperonas compreendem várias famílias altamente conservadas de proteínas não relacionadas que assistem a correta montagem de outros peptídeos, sendo essenciais para a célula em condições normais de crescimento e em períodos de estresses (FELDMAN E FRYDMAN, 2000). *Binding Protein* (BiP) é um chaperona do retículo endoplasmático (RE) que pertence à família de proteínas relacionadas ao estresse, denominada Hsp70. Durante o processo de translocação co-traducional de proteínas secretórias,

BiP associa-se com proteínas recém-sintetizadas, prevenindo interações improdutivas de intermediários de dobramento e subsequente agregação, atuando também no fechamento do poro de translocação, na extremidade voltada para o lúmem (HAMMAN et al., 1998; HAIGH E JOHNSON, 2002). Como outras Hsp70, a proteína BiP é regulada pela atividade de ATPase (HARTL, 1996; PEDRAZZINI e VITALE, 1996), que é estimulada por peptídeos sintéticos (BLOND-ELGUINDI et al., 1993)

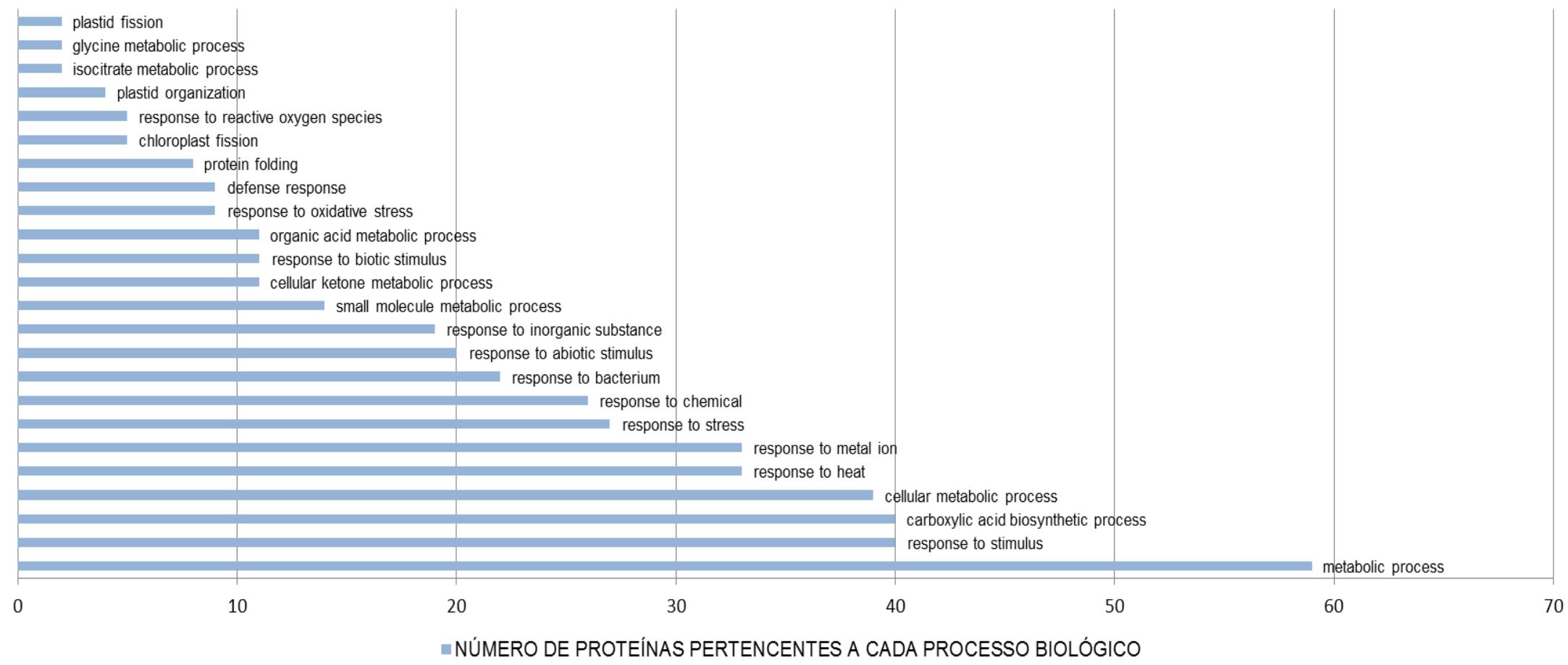
Já na interação com as proteínas mais abundantes para o genótipo TT (Figura 4B), a proteína 30S ribosomal protein S1 (gene RPS1) se destacou, pois compõe o ribossomo cloroplástico, sendo responsável pela síntese de proteínas do cloroplasto, incluindo proteínas relacionadas à transcrição e tradução e aquelas relacionadas ao aparato fotossintético (YAMAGUCHI et al. 2000; BIERI et al. 2016). Essa proteína aumenta a eficiência da inicialização da tradução pelo fato dela fazer a ponte entre o mRNA e a subunidade ribossomal 30S (SUBRAMANIAN, 1983; BONI et al. 1990). Ela possui dois domínios e cada um é responsável por uma função diferente: o domínio NH<sub>2</sub>-terminal está envolvido com a ligação da proteína com a subunidade ribossomal 30S, enquanto que o domínio COOH-terminal é responsável pela ligação entre o mRNA e o ribossomo durante o início da tradução (SUBRAMANIAN, 1983; WITTMAN-LIEBOLD et al. 1983). O fato de esta proteína estar sendo mais expressa em plantas tolerantes sob deficiência hídrica pode indicar que estas estão lançando mão de mecanismos para proteção de seu aparato fotossintético, além de uma possível busca pela manutenção da eficiência fotossintética. Além dessa proteína, outras proteínas como a NACA2, GRXC2 também são de grande importância nessa rede de interação proteína-proteína.

Para a interação das proteínas diminuídas em relação ao controle (Figura 4C), a LHC B 4.2 é uma proteína do complexo LHC (*light-harvesting complex*), funcionando como um receptor de luz, capturando e levando a energia de excitação para o fotossistema ao qual está associado. A LHC B4 e a LHC B5 mediam a ligação do complexo LHCII-S e formam uma estrutura complexa do PSII, chamada C<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (BOEKEMA et al., 1999), que é encontrada em plantas crescendo sob muita luz (MOROSINOTTO et al., 2006; FRIGERIO et al., 2007). De Bianchi et al. 2011 em um estudo com *Arabidopsis* mostraram que a proteína LHC B4 exerce papel central no complexo antena, do

fotossistema II (PSII), pois os organismos que não a possuíam apresentaram maior sensibilidade a fotoinibição. Além disso, ela é determinante para a macroorganização do PSII e para fotoproteção. Isto pode indicar que sob estresse o fotossistema está sendo afetado o que pode estar modificando a abundância da proteína no tratamento. Outras proteínas igualmente importantes presente nessa rede de interação proteína-proteína são a LHCA3, LHC4.3, VAR1, entre outras.

A Figura 5 mostra a distribuição das classes de proteínas exclusivas do genótipo Tolerante, que descreve a distribuição do número de proteínas envolvidas em cada processo biológico revisado pelo software Revigo (Anexo 1).

## Proteínas exclusivas para o genótipo TT



**Figura 5.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas exclusivas para o genótipo TT envolvidas em cada processo.

É possível observar (Figura 5) que os processos biológicos com o maior número de proteínas envolvidas foram: processo metabólico, resposta a estímulo, processo biossintético de ácido carboxílico, processo metabólico celular, resposta ao calor, resposta à íons metálicos e resposta ao estresse.

Para o processo biológico “processo metabólico” muitas das proteínas encontradas têm atuação no cloroplasto. Um exemplo é a proteína isomerase-disulfídica LQY1 que forma um complexo com a proteína HHL1, na manutenção da atividade do PSII sob alta luminosidade, regulando a reparação e remontagem dos complexos do PSII (LU et al. 2011; JIN et al. 2014).

Dentre as proteínas para o processo de resposta a estímulos o gene a *Heat shock protein* 90-1 (Hsp90-1) está envolvida com a resposta contra bactérias, arsênico e temperatura elevada (GHANDI et al. 2016; SVOZIL et al. 2015). No caso do eucalipto, talvez essa proteína esteja envolvida com resposta à seca.

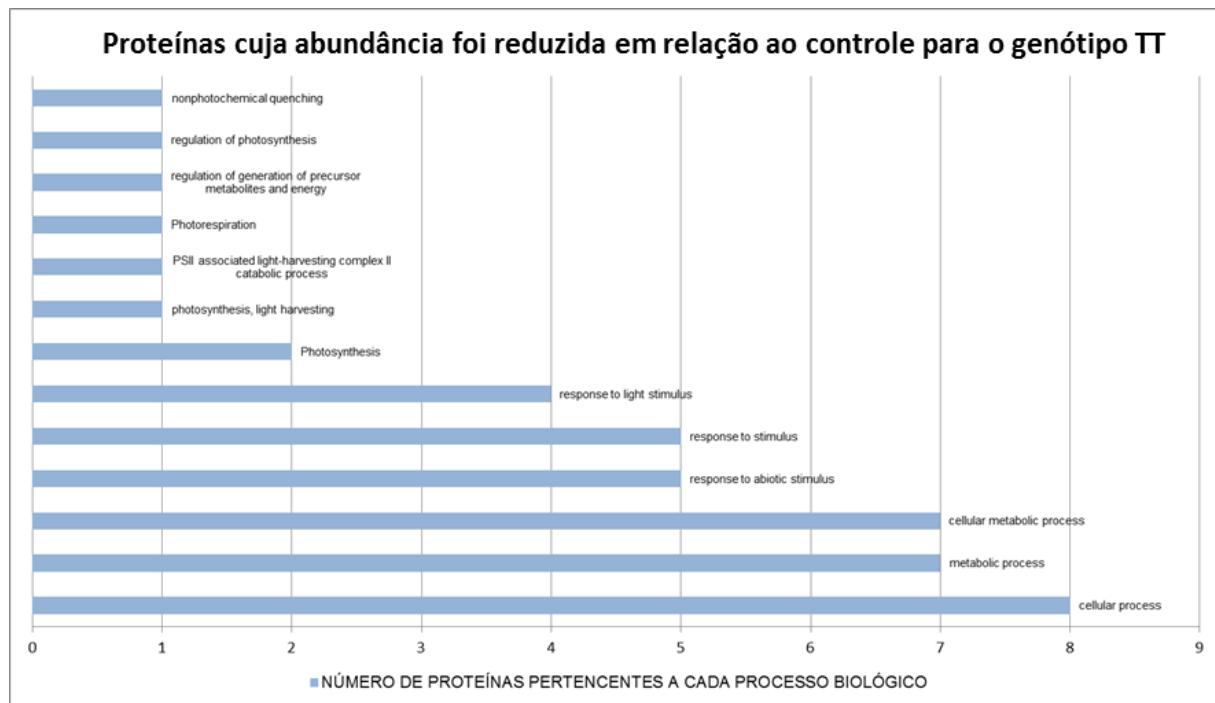
Para o processo biossintético de ácido carboxílico, dentre as proteínas há a proteína carreadora de carboxilato de biotina da acetil coA carboxilase (*Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase 1* - BCCP1) que é um componente do complexo acetilcoenzima A carboxilase, isto é, está envolvida na biossíntese de ácidos graxos (THELEN et al. 2001).

Dentre as proteínas para o processo de resposta ao calor há a proteína GolS1. Oligossacarídeos da família rafinose (RFO) tem sua biossíntese iniciada pela formação do galactinol e da UDP-galactose pela galactinol sintase (GolS) (PETERBAUER e RICHTER, 2001). Não se sabe ainda qual o papel das RFO na tolerância ao déficit hídrico, mas em *Arabidopsis thaliana* a super expressão das proteínas GolS1 e GolS2 gera um acúmulo de galactose e rafinose e as torna mais tolerantes aos estresses hídrico e salino (TAJI et al. 2002; NISHIZAWA et al. 2008). Enquanto o gene AT1G17880 codifica a proteína BTF3, que é um fator de transcrição que possui papel em vários processos de estresses bióticos e abióticos (LI et al. 2009 e WANG et al. 2012). Segundo KANG et al. 2013, esta proteína é também responsável pelo início da transcrição da RNA polimerase II, além de estar envolvida na apoptose celular, regulação do início da tradução, crescimento, desenvolvimento, entre outras funções. Ainda, segundo os autores plantas sob estresse hídrico que tiveram a proteína silenciada apresentaram baixas taxas de sobrevivência, conteúdo de água

relativo e alta taxa de perda de água, sugerindo que o silenciamento dessa proteína prejudica a tolerância à seca.

Dentre as proteínas para o processo de resposta a estresse há a proteína álcool desidrogenase classe III. Esta proteína é requerida para aclimatação de plantas a altas temperaturas e para fertilidade. (LEE et al. 2008). Para o eucalipto, talvez essa proteína esteja envolvida com a aclimatação da planta à seca.

Ainda com os dados gerados no site Revigo, na Figura 6 estão representados os processos biológicos e o número de proteínas que tiveram sua expressão diminuída em relação ao controle do genótipo TT (Anexo 2).



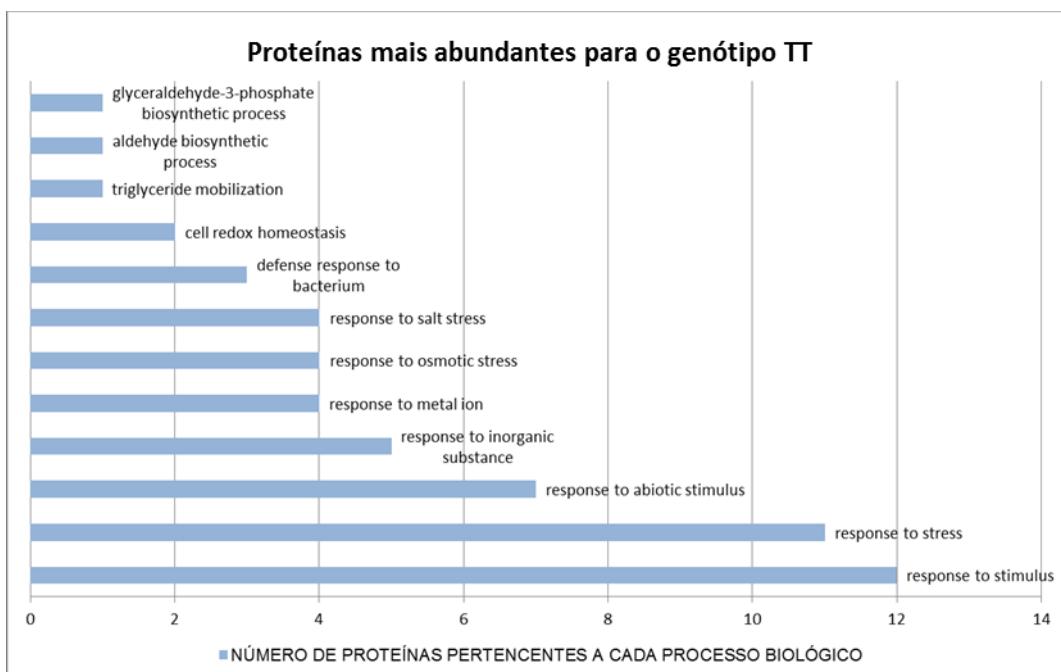
**Figura 6.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas que tiveram suas abundâncias diminuídas em relação ao controle para o genótipo TT.

Entre os processos biológicos com o maior número de proteínas envolvidas estão: processo celular, processo metabólico, processo metabólico celular, resposta a estímulos abióticos, resposta a estímulos e resposta ao estímulo de luz (Figura 6). Dentre as proteínas do processo de resposta ao estímulo de luz, a proteína FtsH é a maior protease de membrana do tilacoide envolvida no processo de degradação de proteínas desses sistemas de

membranas internas do cloroplasto (LINDAHL et al., 1996; NARBERHAUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011).

Outra proteína presente nesse processo é a PSII-S. O acúmulo da PSII-S é regulado e restrito aos tecidos fotossintéticos. A função da proteína PSII-S pode não ser a obtenção de luz, mas é necessária para que ocorra a ligação transitória de pigmentos durante a biogênese ou *turnover* de proteínas ligantes de clorofila. Essas funções podem ser essenciais para a coordenação entre biossíntese de pigmentos e ligação, assim como evitar efeitos tóxicos de moléculas não ligantes de clorofila (FUNK et al. 1995).

Já a Figura 7 representa os processos biológicos e o número de proteínas mais abundantes para o genótipo TT (Anexo 3).



**Figura 7.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas mais abundantes no tratamento para o genótipo TT.

Dessa figura os processos biológicos com o maior número de proteínas foram o de resposta ao estímulo de luz com 12 proteínas envolvidas e o de resposta ao estresse com 11 proteínas.

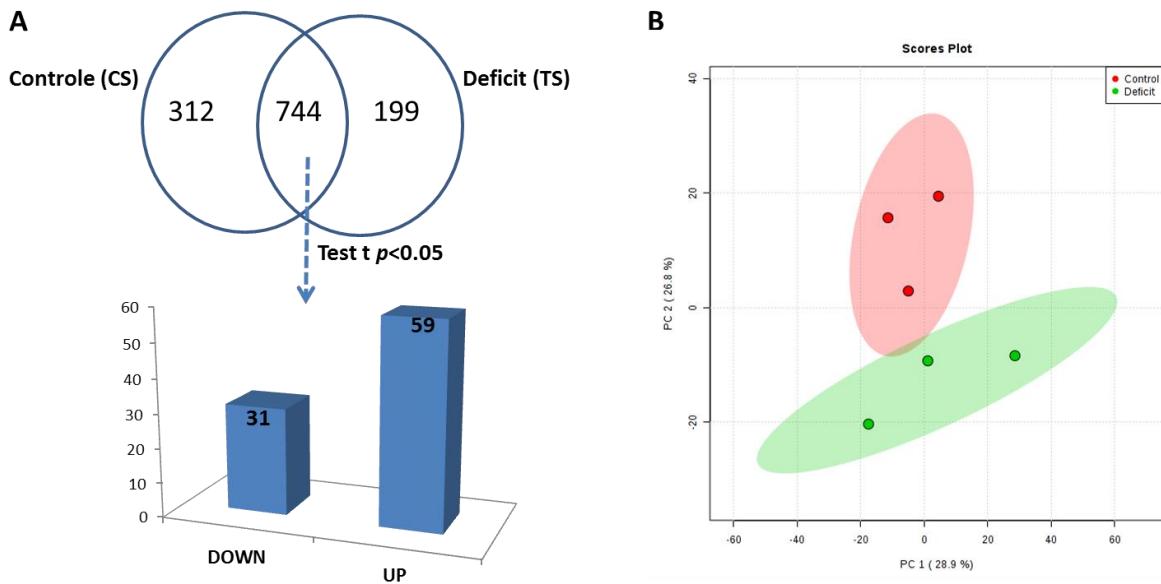
Para ambos os processos, dentre as proteínas presentes há a proteína PRXIIIF que já foi previamente descrita no proteoma mitocondrial de *Arabidopsis* (KRUFT et al., 2001). Sua sequência de aminoácidos é homóloga

a de algumas peroxiredoxinas de bactérias e ela parece participar com o sistema tioredoxina mitocondrial para reduzir o peróxido de hidrogênio da água (LALOI et al., 2001). Enquanto que a proteína CAT2 (peroxissomos e citosol) é encontrada em tecidos fotossintéticos (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014) e segundo Suzuki et al. 2016, sua expressão não se alterou durante o estresse salino, mas diminuiu em plantas sujeitas ao calor ou a uma combinação de estresse salino e de calor.

### **5.2.2. Comparação CS x TS**

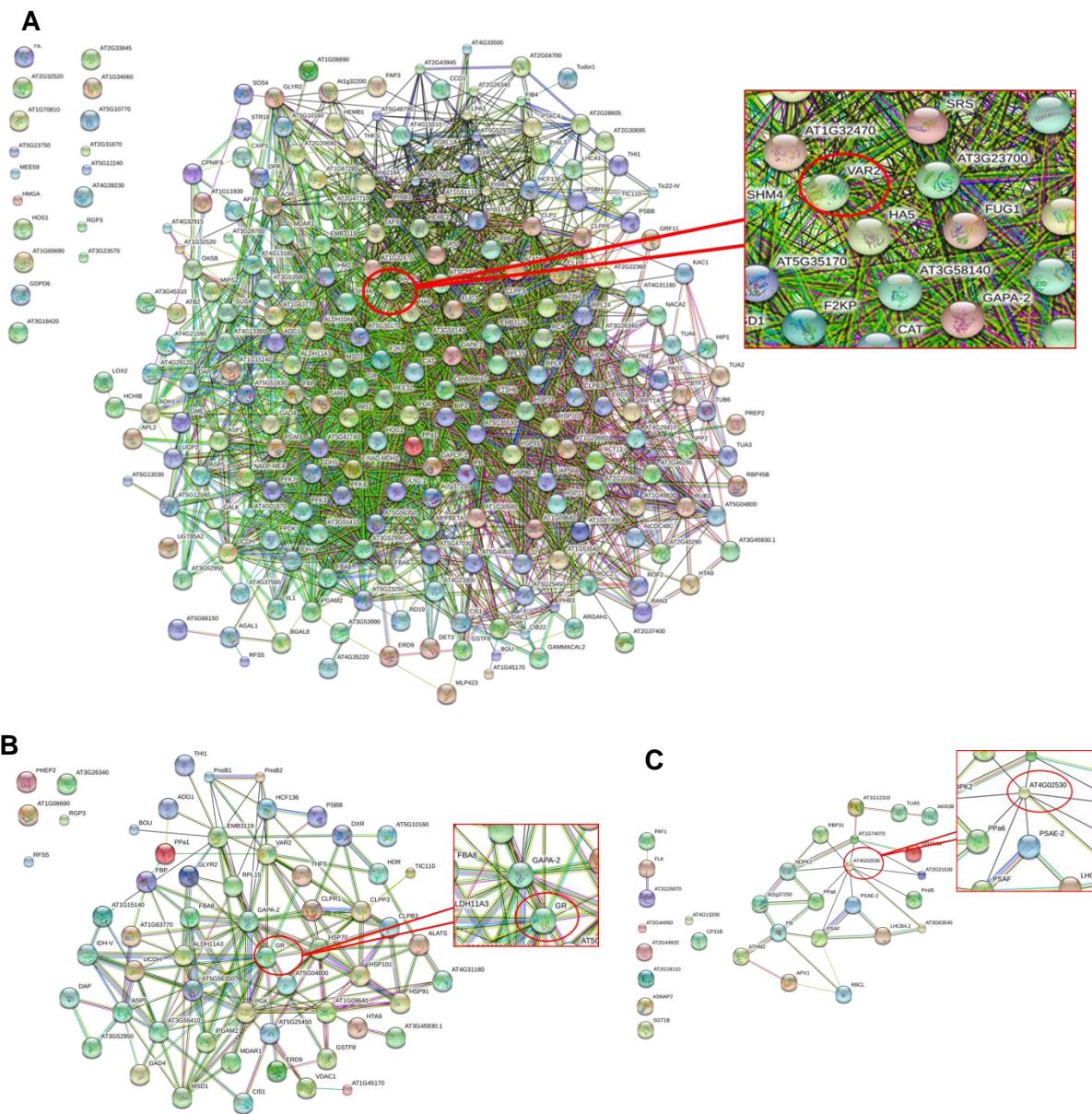
Foi realizada a análise comparativa dentro do genótipo suscetível e um total de 1255 proteínas foram quantificadas e a figura 8A do Diagrama de Venn revela que, 312 proteínas foram identificadas como únicas para o tratamento sob irrigação (CS), enquanto 199 proteínas únicas foram identificadas nas folhas das plantas sob estresse hídrico (TS). Por sua vez, 744 proteínas compartilhadas foram encontradas em folhas de plantas dos dois tratamentos. Foi realizado um teste estatístico univariado (*teste t*) com as proteínas comuns. A partir desse teste foram encontradas 59 proteínas mais abundantes no TS e 31 que tiveram sua abundância diminuída no tratamento em relação às plantas controle.

Pela análise do gráfico de PCA, foi possível observar uma tendência de separação entre os dois grupos de estudo e a soma dos dois primeiros componentes principais da PCA explica 55,7 % da variância dos dados do modelo (Figura 8B).



**Figura 8.** **A)** Diagrama de Venn que mostra o número de proteínas sobrepostas entre os tratamentos (CSxTS). Além do gráfico que indica o número de proteínas com diferença estatística ( $p<0,05$ ). **B)** PCA 2D Scores Plot da comparação entre os 2 grupos de estudo (CSxTS). O conjunto de dados obtidos para as repetições biológicas das plantas CS é representado pela cor vermelha, o das plantas TS pela cor verde.

Na Figura 9 temos as redes de interações proteína-proteína para as proteínas exclusivas do tratamento do genótipo TS, para as proteínas mais abundantes e para aquelas diminuídas em relação ao controle.



**Figura 9.** **A)** Intereração proteína-proteína exclusivas para o tratamento do genótipo TS. Em destaque a proteína VAR2. **B)** Intereração proteína-proteína das proteínas mais abundantes no tratamento na comparação com o controle ( $p<0,05$ ). Em destaque a proteína GR. **C)** Intereração proteína-proteína das proteínas com abundância diminuída no tratamento em relação ao controle ( $p<0,05$ ). Em destaque a proteína AT4G02530. As proteínas que não interagiram estão dispostas no canto esquerdo superior da figura. A linha azul clara representa as interações conhecidas de base de dados curada, a linha rosa representa as interações determinadas experimentalmente, a linha verde representa interações entre genes vizinhos, enquanto que a linha vermelha é para fusões de genes e a azul escura para co-ocorrência de genes, a linha amarela representa textmining, a linha preta co-expresão e a linha cinza representa proteínas homólogas.

Dentro da rede de interação proteína-proteína com as proteínas exclusivas para o tratamento do genótipo TS destaca-se a proteína VAR2

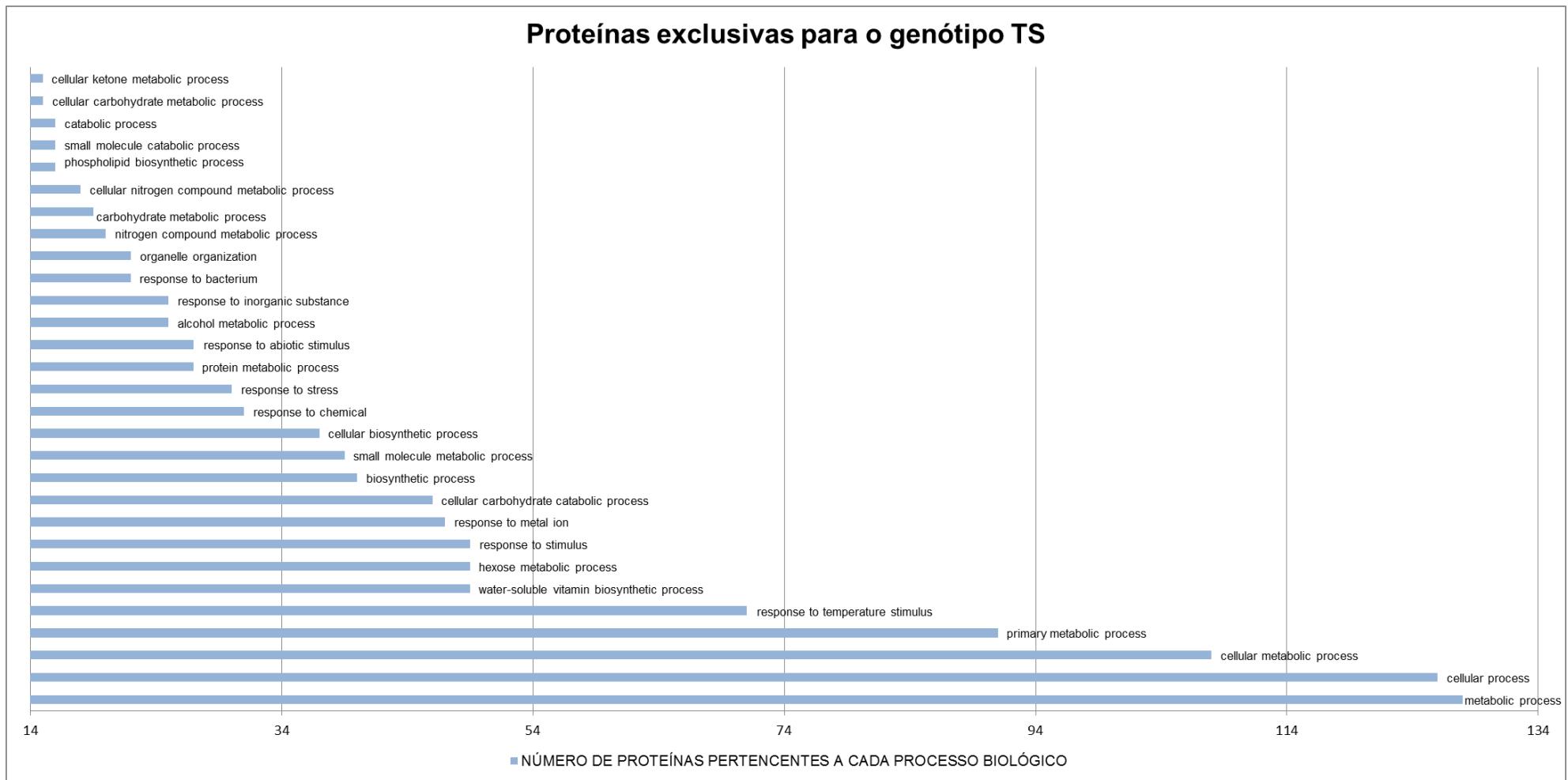
(Figura 9A), que é uma subunidade do complexo FtsH do cloroplasto, que medeia uma variedade de funções importantes para a biogênese e manutenção do cloroplasto (CHEN et al., 2000; ZALTSMAN et al., 2005a; YU et al., 2007). Esse complexo FtsH está envolvido na degradação de proteínas D1 do centro de reação do Fotossistema II (LINDAHL et al., 2000; BAILEY et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2002; SILVA et al., 2003; CHEN et al., 2006; YOSHIOKA et al., 2006). Além disso, o papel desempenhado pelo complexo FtsH nos tilacóides é o controle de qualidade desse compartimento organelar, atuando na degradação de proteínas mal dobradas ou danificadas por oxidação. A observação da proteína VAR2 em destaque entre as proteínas exclusivas do genótipo TS corroboram a importância do complexo FtsH no mecanismo de reparo do PSII danificado por fotoxidação. Além do papel cooperativo de proteases cloroplastidiais nos processos de degradação da proteína D1 danificada, como também discutido por Kato e Sakamoto 2009 e 2012 que sugeriram um modelo para degradação da proteína D1 envolvendo a participação das proteases FtsH e Deg (família de endoproteases do tipo serina-proteases), associadas perifericamente às membranas de cloroplastos em *A. thaliana* e mostrou que fragmentos de D1 gerados por Deg podem ser substratos do complexo FtsH. O fato da proteína VAR2 ser exclusiva para o genótipo suscetível mostra que a planta está tentando manter seu crescimento, para assim, aumentar sua superfície de absorção. Além dessa proteína, outras proteínas como a GAPA-2, CAT, HA5, entre outras também são de grande importância nessa rede de interação proteína-proteína.

Para a rede de proteínas mais abundantes no TS encontra-se a glutationa redutase (GR) (Figura 9B), que é uma flavo-proteína oxireduktase e potencial enzima antioxidante do ciclo ascorbato-glutationa (ASH-GSH), onde possui um papel importante no ciclo glutationa (GSH) na determinação de tolerância, sob vários estresses, de plantas. É um dos componentes da maquinaria de antioxidantes, protegendo as células contra danos oxidativos. Em condições de estresse, a GR ajuda na manutenção do pool de glutationa reduzida para o fortalecimento dos processos antioxidativos nas plantas. E sua superexpressão protege as células de danos oxidativos provocados por estresses abióticos (TRIVEDI et al. 2013). Tal fato indica que a planta está lançando mão de um mecanismo antioxidativo para tentar lidar com a situação

estressante. Outras proteínas importantes nessa rede de interação proteína-proteína são: GAPA-2, HSP70, HSP101, VAR2, entre outras.

Já para aquelas com abundância diminuída no tratamento em relação ao controle (Figura 9C), há a proteína CYP26-2. A CYP26 é uma enzima do citocromo P450 família 26 com função na determinação da exposição celular ao ácido retinoico (RA) através da inativação de ácido retinoico em células que não precisam dele (THATCHER e ISOHERRANEN 2010). O RA é uma molécula sinalizadora importante na regulação da transcrição de genes e do ciclo celular (THATCHER e ISOHERRANEN 2010), além de reduzir a apoptose e o estresse oxidativo (AHLEMEYER et al. 2001), o que demonstra que estas plantas apresentam um desbalanço em sua homeostase redox.

Com os dados obtidos pelo software Revigo foi construído o gráfico da Figura 10 com a descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas exclusivas do genótipo TS pertencentes a cada processo (Anexo 4).



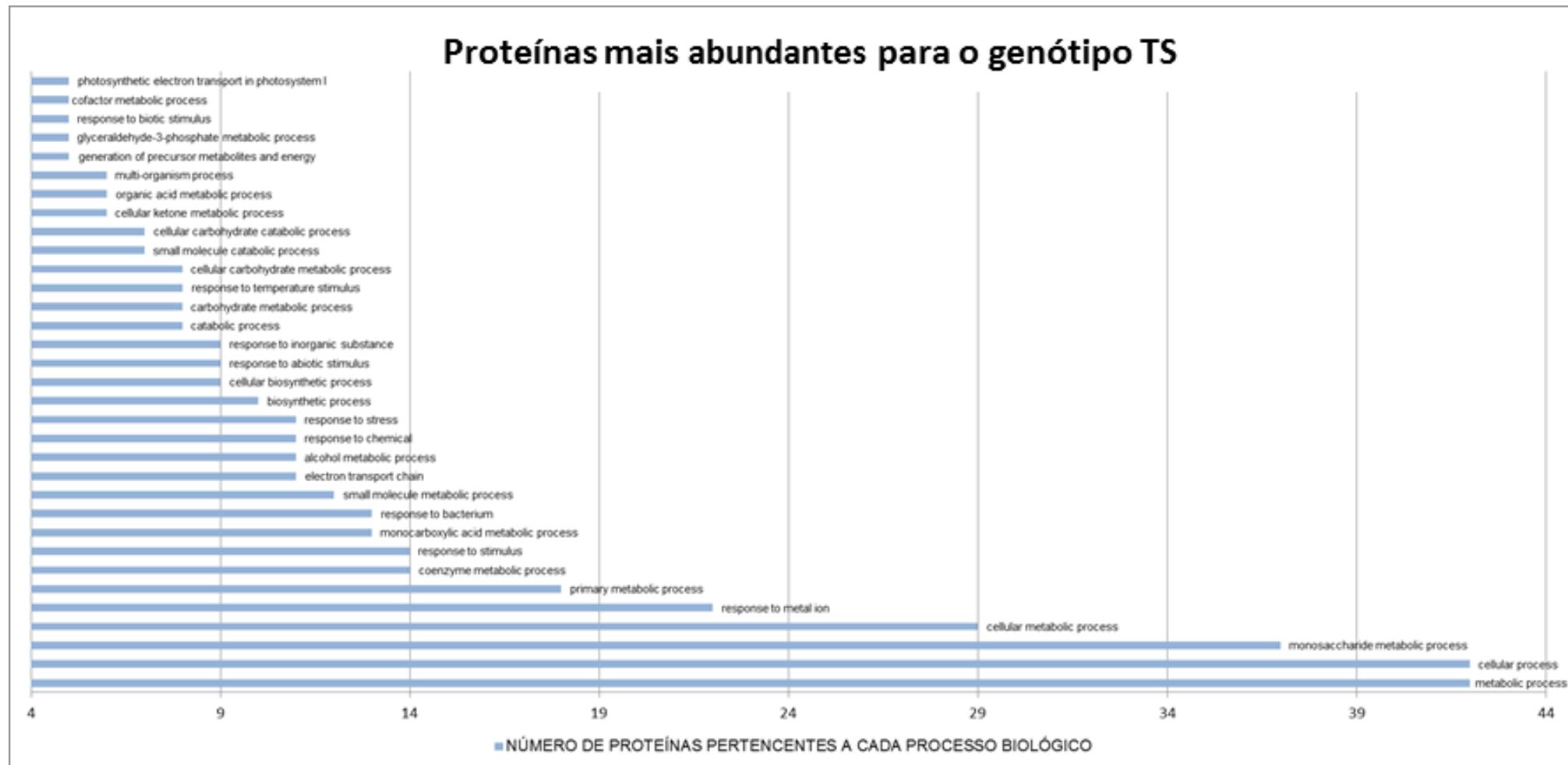
**Figura 10.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas exclusivas para o genótipo TS. Estão representados no gráfico os processos biológicos que tiveram mais que 15 proteínas envolvidas.

Os processos biológicos da Figura 10 que se destacaram pelo maior número de proteínas foram: processo metabólico, processo celular, processo metabólico celular, processo metabólico primário, resposta ao estímulo de temperatura, processo biossintético de vitaminas solúveis em água, processo metabólico de hexose e resposta ao estresse.

Para o processo de resposta ao estímulo de temperatura a proteína de estresse universal (USP) funciona como uma chaperona sob condições de choque térmico e estresse oxidativo. A atividade chaperona e o agrupamento em complexos é regulado por oxirredução (JUNG et al. 2015), altamente relacionada ao fato de estar presente com exclusividade ao genótipo suscetível sob a condição de déficit hídrico.

A correlação acima pode ser feita para o processo de resposta ao estresse onde se observa a proteína Protease Cisteína (Cysteine protease). Segundo Bray 2002, em *arabidopsis* sob estresse hídrico há aumento na produção de mRNA correspondentes a protease cisteína. Em soja, essas proteases são induzidas por estresse oxidativo e desempenham papel na morte celular programada (SOLOMON et al. 1999). É possível que em *arabidopsis* esses genes sejam ativados devido ao estresse oxidativo proveniente do estresse hídrico e tragam a morte celular. Essas proteínas também podem ser importantes na quebra de proteínas armazenadas servindo como uma fonte de aminoácidos para quando não houver mais estresse (VIERSTRA 1996). Após a lise dessas células que passaram pela morte programada essas proteases podem ter função de proteção das demais células não afetadas. Já a proteína RS5 – Raffinose Synthase 5 é responsável pelo acúmulo de rafinose nas folhas de *Arabidopsis* quando esta é exposta a uma série de estresses abióticos, entre eles déficit hídrico, alta salinidade, exposição ao frio, entre outros (EGERT et al. 2013).

Na sequencia na Figura 11 estão representados os processos biológicos e o número de proteínas mais expressas para o genótipo TS (Anexo 5).



**Figura 11.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas mais abundantes para o genótipo suscetível (TS). Estão representados no gráfico os processos biológicos que tiveram mais que 5 proteínas envolvidas.

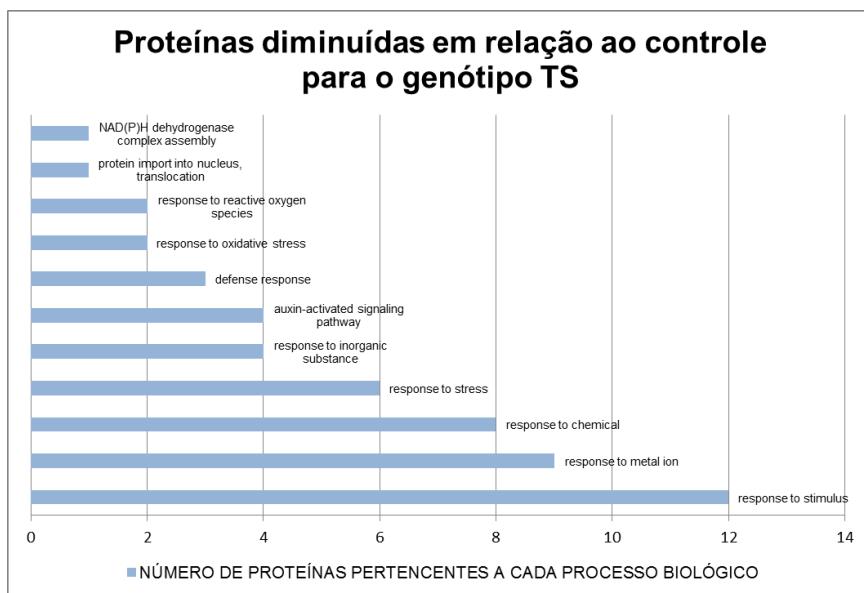
Da figura 11 se observa que os processos biológicos em destaque foram: processo metabólico, processo celular, processo metabólico de monossacarídeos, processo metabólico celular, resposta a íons metálicos, processo metabólico primário, processo metabólico de coenzimas e resposta a estímulos.

Dentre as proteínas para o processo de resposta a íons metálicos a proteína isocitrato desidrogenase citosólica (NADP) contribui para a produção de NADPH para promover a sinalização redox ou homeostase em resposta ao estresse oxidativo (MHAMDI et al. 2010).

Para o processo de resposta a estímulos, dentre as proteínas desse processo, a proteína HCF136 – cloroplasto, fator de estabilidade do fotossistema II está envolvida na resposta à seca para o girassol (CASTILLEJO et al. 2008). Além disso, ela codifica um fator de estabilidade e/ou um fator de montagem do fotossistema II. Indivíduos mutantes para esse gene são completamente desprovidos de qualquer funcionalidade do fotossistema 2 (MEURER et al. 1998). Enquanto que a proteína Ribose 5-phosphate isomerase – R5PI que está envolvida no último passo do ciclo de Calvin, que é uma importante fonte na redução de CO<sub>2</sub> e de metabólitos intermediários e sua regulação é através da luz (SHIN et al. 2007).

Dentre as proteínas para o processo de resposta a estresse a proteína superóxido dismutase elimina radicais livres, normalmente produzidos dentro das células e que são tóxicos para o organismo (KLIEBENSTEIN et al. 1998). Segundo Attia et al. (2008), essa proteína é induzida por estresse oxidativo.

Para as proteínas que tiveram sua abundância diminuída no tratamento em relação ao controle para o genótipo TS os dados sobre os processos biológicos e o número de proteínas são apresentados na Figura 12 (Anexo 6).



**Figura 12.** Descrição dos processos biológicos e a quantidade de proteínas diminuídas no tratamento em relação ao controle para o genótipo susceptível.

Os principais processos biológicos foram (Figura 12): resposta a estímulos, resposta a íons metálicos, resposta a químicos e resposta ao estresse.

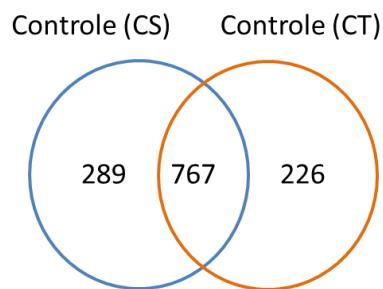
Dentre as proteínas para o processo biológico de resposta a estímulos a proteína SGT1b – Hsp90 é formada pela chaperona Hsp90 e pela co-chaperona SGT1b. Segundo Wang et al. 2015, o aumento da temperatura promove o rápido acúmulo do co-receptor de auxina TIR1, o que depende da chaperona Hsp90. Além disso, eles mostraram que a Hsp90 e a SGT1b interagem com TIR1. Quando a Hsp90 é inibida ocorre a degradação da TIR1, causando defeitos em uma variedade de processos de crescimento mediados por auxina em temperaturas mais baixas e altas. Eles ainda mostram que a Hsp90 e a SGT1 integram temperatura e sinalização de auxina para fazer a regulação do crescimento da planta em um ambiente em modificação. A expressão diminuída da Hsp90 no tratamento pode revelar que a regulação do crescimento da planta do genótipo suscetível pode ser afetada.

Para o processo de resposta a íons metálicos, dentre as proteínas envolvidas, a proteína peroxidase L-ascorbato 1 (APX1) tem função na remoção do peróxido de hidrogênio. Ainda faz parte da rede de genes de oxigênio reativo (ROS) (DAVLETOVA et al. 2005). E para o processo de resposta a estresse oxidativo, dentre as proteínas envolvidas, a proteína

Thioredoxin M2 é uma co-chaperona redox ativada que está envolvida na resposta a estresse oxidativo (ISSAKIDIS-BOURGUET et al. 2001). Segundo Zhang et al. (2015), sua super expressão confere resistência a NaCl e reduz o peróxido de hidrogênio, além de estar envolvido na sinalização de ROS. O resultado é um excelente indicativo mediante a condição de estresse hídrico as plantas do genótipo suscetível tem dificuldade em estabelecer resistência à falta de água, além de ter dificuldade de remoção dos ROS.

### 5.2.3. Comparação CS x CT

Foi realizada a análise comparativa entre os controles dos genótipos suscetível (CS) e tolerante (CT) e um total de 1282 proteínas foram quantificadas e a Figura 13 do Diagrama de Venn revela que, 289 proteínas foram identificadas como únicas para o genótipo CS, enquanto 226 proteínas únicas foram identificadas nas folhas das plantas do genótipo CT. Por sua vez, 767 proteínas compartilhadas foram encontradas em folhas de plantas dos dois controles.

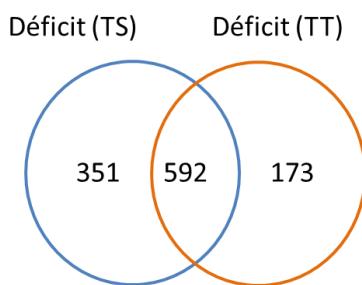


**Figura 13.** Diagrama de Venn representando as proteínas únicas encontradas em plantas controle dos genótipos CS e CT, e proteínas compartilhadas entre os dois genótipos.

A partir do Diagrama de Venn da Figura 12 foi possível distinguir as proteínas, que são por essa análise, consideradas como característica de cada um dos genótipos. Entender como essas proteínas se alteram mediante a indução do estresse pode ser interessante. Isto pode ser obtido por meio da comparação TSxTT.

#### 5.2.4. Comparação TS x TT

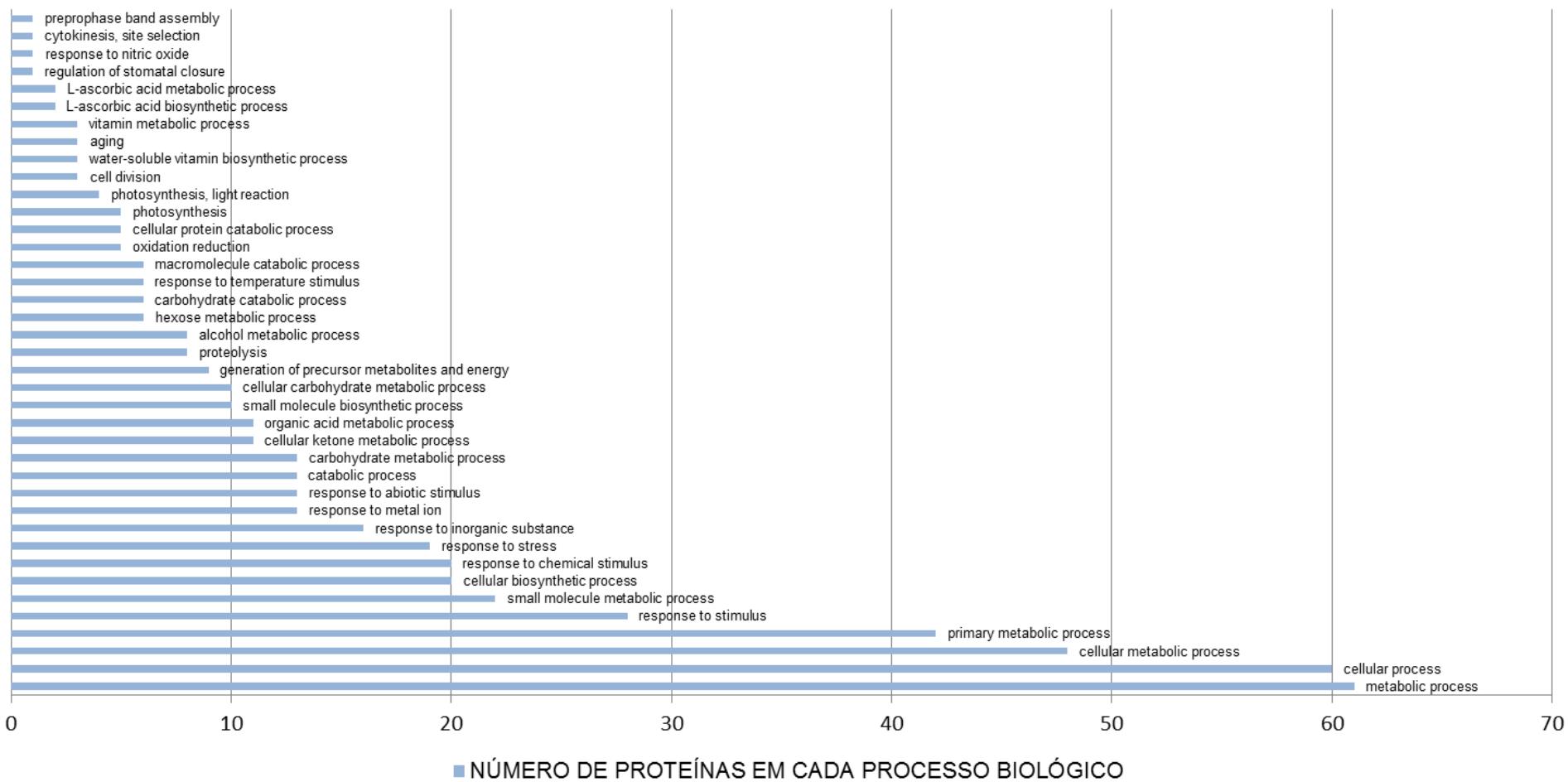
Na comparação entre os tratamentos dos genótipos susceptível (TS) e tolerante (TT), um total de 1116 proteínas foram quantificadas e a Figura 14 do Diagrama de Venn revela que, 351 proteínas foram identificadas como únicas para o genótipo TS, enquanto 173 proteínas únicas foram identificadas nas folhas das plantas do genótipo TT. Por sua vez, 592 proteínas compartilhadas foram encontradas em folhas de plantas dos dois tratamentos.



**Figura 14.** Diagrama de Venn representando as proteínas únicas encontradas em plantas tratamento dos genótipos TS e TT, e proteínas compartilhadas entre os dois genótipos.

Ao listar os IDs das 289 proteínas encontradas no CS na comparação CSXCT e confrontar com os 351 IDs das proteínas exclusivas encontradas no TS na comparação da Figura 14, foi possível identificar 117 proteínas que foram expressas, para o genótipo suscetível somente quando a planta esteve sob estresse. Essas proteínas foram analisadas no *Cytoscape* para gerar os GO termos de cada proteína, depois esses dados foram revisados no software *ReVigo* para retirar a redundância em relação aos processos biológicos (Anexo 7). Com os dados obtidos foram feitos os gráficos das Figuras 15 e 16.

## Proteínas únicas para o genótipo suscetível



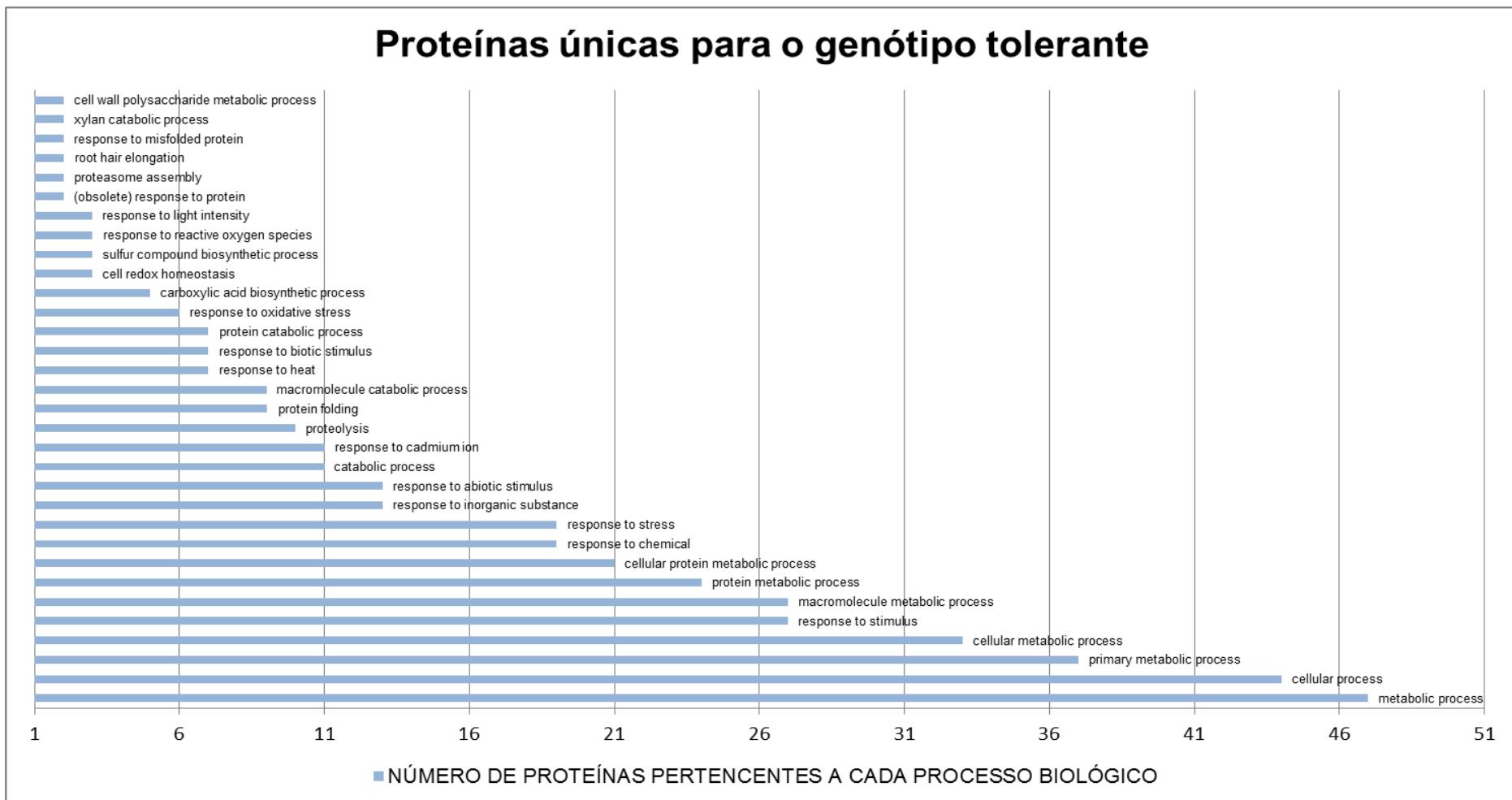
**Figura 15.** Proteínas exclusivas para o genótipo suscetível, apresentando a quantidade de proteínas envolvidas e a descrição dos processos biológicos

A Figura 15 mostra os processos biológicos que as proteínas únicas para o genótipo suscetível sob déficit hídrico estão envolvidas, sendo os de destaque: processo metabólico, processo celular, processo metabólico celular, processo metabólico primário, resposta a estímulos, processo metabólico de moléculas pequenas, processo biossintético celular, resposta a estímulos químicos e resposta a estresse.

Dentre as proteínas para o processo metabólico a proteína TOP1, segundo Moreau et al. (2013), media a sinalização ácido salicílico (SA)-dependente e é necessária para a resposta imune a patógenos não virulentos.

Para o processo celular, dentre as proteínas envolvidas, a proteína Clp, segundo Zheng et al. (2002), está localizada no estroma dos cloroplastos e, apesar de não ser induzida rapidamente sob estresse a curto prazo, é uma proteína constitutiva primária que pode estar envolvida na aclimatação da planta em diferentes condições fisiológicas.

Considerando agora o genótipo tolerante, das 226 proteínas encontradas no CT e 173 no TT, foi possível observar 105 proteínas únicas para o genótipo tolerante que somente foram identificadas sob déficit hídrico. Essas proteínas foram analisadas no *Cytoscape* para gerar os GO termos de cada proteína, depois esses dados foram revisados no software *Revigo* para retirar a redundância em relação aos processos biológicos (Anexo 8). Com os dados obtidos foi feito o gráfico da Figura 16.



**Figura 16.** Proteínas exclusivas para o genótipo tolerante, apresentando a quantidade de proteínas envolvidas e a descrição dos processos biológicos.

O gráfico acima mostra que os processos biológicos com o maior número de proteínas envolvidas são: processo metabólico, processo celular, processo metabólico primário, resposta a estímulos, processo metabólico de macromoléculas, processo metabólico de proteínas, resposta a químicos e resposta a estresse.

Para os processos metabólico e celular, dentre as proteínas envolvidas, há a proteína chaperona de choque térmico 70B (Hsp70B) que junto com as demais chaperonas estabiliza proteínas pré-existentes contra a agregação e media o dobramento de novos polipeptídeos traduzidos. Essas proteínas também ligam segmentos de polipeptídeos após danos induzidos por estresses (ALTUNOĞLU, 2016; MORIMOTO, 1998).

Dentre as proteínas para o processo metabólico de proteínas a proteína proteossomo 26S subunidade RPN12A está envolvida na degradação ATP-dependente de proteínas ubiquitinadas. Ainda ajuda a controlar a degradação de fatores que reprimem a sinalização de citoquinina (RYU et al. 2009), além de ser importante no balanceamento de expansão celular por meio de taxas de proliferação celular durante o desenvolvimento (KUREPA et al. 2009; SMALLE et al. 2002).

Para o processo de resposta a estresses, dentre as proteínas envolvidas, há a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPC), e segundo Guo et al. 2012, essa proteína interage com a membrana plasmática associada a fosfolipase D (PLD) para transportar o sinal do peróxido de hidrogênio ROS em *Arabidopsis thaliana*. A remoção da PLD impede a resposta do estômato ao ácido abscísico (ABA) e ao peróxido de hidrogênio, sendo que é o peróxido de hidrogênio que promove a interação GAPC-PLD e a atividade da PLD. Ainda segundo os autores, quando as proteínas GAPCs estão no cauteleado há a diminuição da ativação induzida por peróxido de hidrogênio e ABA. Dessa forma, quando não houve a expressão do GAPC ou PLD as plantas passaram a ser menos responsivas ao déficit hídrico do que as plantas selvagens (GUO et al. 2012). Isso indica que as plantas do genótipo tolerante sob estresse estão respondendo ao déficit hídrico, o que explica o fato desse genótipo ser tolerante a esse estresse. Já a proteína glycine-rich RNA-binding (GR-RBP4) está envolvida com resposta ao estresse em plantas, sendo que seus níveis de mRNA aumentam sob exposição ao frio, déficit hídrico, lesões,

ácido abscísico, infecções virais, radiação UV e à metais pesados (SACHETTO-MARTINS et al., 2000). Segundo Kwak et al. 2005, a expressão dessa proteína em relação ao déficit hídrico diferiram, sendo que para a GR-RBP4 o alto estresse hídrico diminuiu sua expressão a um quarto ou um terço quando comparada às plantas sem estresse.

## 6. CONCLUSÕES

Conclui-se que por meio das medidas de trocas gasosas e das análises de proteômica quantitativa foi possível fazer a diferenciação dos genótipos contrastantes, sendo um suscetível e um tolerante.

Em relação às medidas de troca gasosa as respostas dos genótipos para taxa fotossintética e condutância estomática foram similares, sendo maiores sempre no genótipo tolerante, isso é explicado pelo fato do genótipo tolerante possuir mecanismos para superar o déficit hídrico e, dessa forma, continuar crescendo e produzindo. Para taxa de transpiração os valores para o genótipo tolerante também foram superiores do que para o suscetível. Para os três parâmetros fisiológicos analisados nesse trabalho os valores encontrados para as plantas controles sempre apresentaram valores maiores do que os tratamentos, o que é de se esperar já que as plantas controles estão sob condições normais de irrigação, enquanto que as plantas tratamentos estão sob déficit hídrico.

Por meio da proteômica quantitativa *label-free* foi possível observar que houve diferenças de expressão de proteínas entre os genótipos. Para as proteínas exclusivas de todas as comparações feitas, o maior número de proteínas foi relacionado aos processos metabólico e celular, indicando que cada genótipo, mesmo possuindo um arsenal proteico próprio, visa manter a manutenção de seus processos biológicos, garantindo assim sua sobrevivência. Para as proteínas mais expressas nas comparações CT/TT e CS/TS, o genótipo tolerante apresentou um número menor de processos biológicos, com uma quantidade menor de proteínas envolvidas, sendo que os principais processos foram resposta ao estresse e resposta a estímulos; já para o genótipo suscetível houve um número maior de processos biológicos envolvidos e um maior número de proteínas, mas os principais processos foram processos metabólico, celular, metabólico de monossacarídeo e metabólico celular. Neste sentido, é plausível supor que a homeostase celular é tão fortemente afetada em plantas suscetíveis culminando em alterações em inúmeras vias metabólicas com o objetivo de tentar lidar com a situação estressante. Da mesma forma, para as proteínas diminuídas no tratamento em relação ao controle nas comparações CT/TT e CS/TS, os principais processos

biológicos também foram distintos entre os genótipos. O genótipo tolerante apresentou mais proteínas envolvidas nos processos de resposta a estímulo de luz, processo metabólico e processo celular, já o genótipo suscetível apresentou mais proteínas relacionadas a resposta a estímulos, resposta a íons metálicos, resposta a químicos e resposta a estresse, o fato desse genótipo apresentar expressão diminuída em proteínas relacionadas a respostas explica o porquê dele ser suscetível ao déficit hídrico e talvez o genótipo tolerante mantenha sua produtividade diante desta situação, enquanto o suscetível esteja apenas tentando se defender e sobreviver.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, F. M, KOMATSU, S. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice sheath. **Proteomics**.4: 2072–81. (2004)
- ABBASI, F. M.; KOMATSU, S. (2004). A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. **Proteomics**, 4: 2072–2081. doi:10.1002/pmic.200300741.
- AEBERSOLD, R.H.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar. 2003.
- AHLEMEYER, B.; BAUERBACH, E.; PLATH, M.; STEUBER, M.; HEERS, C.; TEGTMEIER, F.; KRIEGLSTEIN, J. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. **Free Radic Biol Med**. 2001 May 15;30(10):1067-77. PMID: 11369496.
- ALTUNOĞLU, Y. Ç. Determination and Characterization of Hsp70 Genes from Heat Shock Protein Family in Eucalyptus Genome. Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 16(2), 497–509. <https://doi.org/10.17475/kujff.20647>. (2016).
- AmiGO: Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, AmiGO Hub, Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**. Jan 2009;25(2):288-9.
- ANDERSON, N.G.; ANDERSON, N.L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453. Issue 3, 1996.
- ARENDE, M.; FROMM, J. Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. **Tree Physiol**. Jul;27(7):985-92. PubMed PMID: 17403651. (2007).
- ARRIEL, E. F. Divergência genética em Cnidoscolus phyllacanthus (Mart.) Pax. Et K. Hoffm. 2004. 89f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. (2004).
- ATTIA, H.; ARNAUD, N.; KARRAY, N.; LACHAAL, M. Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. **Physiol. Plantarum** 132:293-305(2008) [PubMed] [Europe PMC].

- BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; CAPEL, M.; MOORE, P. B.; STEITZ, T. A. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. **Nature**, London, v. 400, p. 841-847. (1999).
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. Critical Reviews in **Plant Sciences** 24, 23–58. (2005).
- BIERI, P., LEIBUNDGUT, M., SAURER, M., BOEHRINGER, D., & BAN, N. The complete structure of the chloroplast 70S ribosome in complex with translation factor pY. **The EMBO Journal**, 36(4), 475 LP-486. 2017.
- Biol.**, 156:261-270.
- BLOND-ELGUINDI, S.; FOURIE, A.M.; SAMBROOK, J.F.; GETHING, M.-J.H. (1993) Regulation and Phosphorylation of the Soybean BiP Forms. **J. Biol. Chem.**, 268:12730–12735.
- BOEKEMA, E.J.; VAN ROON, H.; VAN BREEMEN, J.F.; DEKKER, J.P. Supramolecular organization of photosystem II and its lightharvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. **Eur. J. Biochem.** 266: 444–452. 1999.
- BOGEAT-TRIBOULOT, M. B.; BROSCHÉ, M.; RENAUT, J.; JOUVE, L.; LE THIEC, D.; FAYYAZ, P. et al. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. **Plant Physiol.** 143:876–92. (2007).
- BOHLER, S.; SERGEANT, K.; LEFÈVRE, I.; JOLIVET, Y.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J. et al. Differential impact of chronic ozone exposure on expanding and fully expanded poplar leaves. **Tree Physiol.** 30:1415–32. (2010).
- BONI, I. V., ISAIEVA, D. M., MUSICHENKO, M. L., and TZAREVA, N. V. (1990)
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science** 218, 443 e 448. (1982).
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** May 7;72:248-54. PubMed PMID: 942051. (1976).
- BRAY, E. A. Classification of Genes Differentially Expressed during Water-deficit Stress in *Arabidopsis thaliana*: an Analysis using Microarray and Differential Expression Data. **Annals of Botany**, Volume 89, Issue 7, 15 June 2002, Pages 803–811, <https://doi.org/10.1093/aob/mcf104>.

- BUDZINSKI, I.G.; REGIANI, T.; LABATE, M.T.V.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; SILVA, D.I.R.; RODRIGUES, M.J.C.; BORGES, J.S.; MOZOL, I.M.; LABATE, C.A. Proteômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHE-NETO, R. **Ômicas 360º: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federeal de Viçosa, 2013. cap. 7, p.153-179.
- CARUSO, A.; MORABITO, D.; DELMOTTE, F.; KAHLEM, G.; CARPIN, S. Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. **Plant Phys Biochem**.40:1033–42. (2002).
- CASTILLEJO, M.A.; MALDONADO, A.M.; OGUETA, S.; JORRÍN, J.V. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *The Open Proteomics Journal*. 1. 59-71. 10.2174/1875039700801010059. 2008.
- Centro de Inteligência em Florestas. Acesso em 21 de novembro de 2017. Disponível em: <http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>.
- CHAVES, J. H. et al. Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes. **Revista Árvore**, v.28, n.3, p.333-341. (2004).
- CHEN, M.; CHOI, Y.; VOYTAS, D. F.; RODERMEL, S. Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. **The Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 303-313. May 2000.
- CLINE, M.; SMOOTH, M.; CERAMI, E. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. **Nat. Protoc.** 2, 2366–2382. doi:10.1038/nprot.2007.324. 2007.
- CRAMER, G. R., URANO, K., DELROT, S., PEZZOTTI, M., SHINOZAKI, K.. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biol.** 11, 163. (2011).
- DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D.J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 17:268-281(2005) [PubMed] [Europe PMC].
- DE BIANCHI, S.; BETTERLE, N.; KOURIL, R.; CAZZANIGA, S.; BOEKEMA, E.; BASSI, R.; DALL'OSTO, L. *Arabidopsis* mutants deleted in the light-harvesting protein LhcB4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective

- in photoprotection. **Plant Cell.** 2011 Jul;23(7):2659-79. doi: 10.1105/tpc.111.087320. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21803939.
- DURAND, T. C.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; PLANCHON, S.; HOFFMANN, L.; CARPIN, S.; HAUSMAN, J. F. Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. **Journal of Proteomics**, 74(8), 1396–1410. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.013>. (2011).
- EGERT, A.; KELLER, F.; PETERS, S. Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in Arabidopsis leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390). **BMC Plant Biol.** 2013 Dec 20;13:218. doi: 10.1186/1471-2229-13-218. PMID: 24354450.
- EGERT, A.; KELLER, F.; PETERS, S. Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in Arabidopsis leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390). **BMC Plant Biol.** 2013 Dec 20; 13():218.
- Embrapa Florestas, 2013. (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 255).
- FAQUIN, V. Diagnose do estado nutricional das plantas / Valdemar Faquin.
- FELDMAN, D.E.; FRYDMAN, J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. **Curr Opin Struct Biol.** 2000 Feb;10(1):26-33. Review. PMID: 10679467.
- FERREIRA, M. Escolha de Espécies de Eucalipto. **Circular Técnica IPEF**, v.47, p.1-30. (1979).
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J. M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions. **Functional Plant Biology**, Melbourn, v.29, p.461-471. (2002).
- FLEXAS, J.; ESCALONA, J. M.; EVAIN, S.; GULÍAS, J.; MOYA, I.; OSMOND, C. B.; MEDRANO, H. Steady state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO<sub>2</sub> assimilation and stomatal conductance during water-stress in C<sub>3</sub> plants. **Physiologia Plantarum** 114: 231–240. (2002).
- FRIGERIO, S.; CAMPOLI, C.; ZORZAN, S.; FANTONI, L.I.; CROSATTI, C.; DREPPIER, F.; HAEHNEL, W.; CATTIVELLI, L.; MOROSINOTTO, T.; BASSI, R. Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. **J. Biol. Chem.** 282: 29457–29469. 2007.

- FUNK, C.; ADAMSKA, I.; GREEN, B. R.; ANDERSSON, B.; RENGER, G. The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. **J Biol Chem.** 1995 Dec 15;270(50):30141-7. PMID: 8530421.
- GAO, F.; ZHOU, Y.; ZHU, W.; LI, X.; FAN, L.; ZHANG, G. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella* rosette leaves. **Planta.** 230:1033–46. (2009).
- GHANDI et al. (2016). Tomato yellow leaf curl virus infection mitigates the heat stress response of plants grown at high temperature. **Sci Rep.** 2016 Jan 21;6:19715. doi: 10.1038/srep19715.
- GUO, L.; DEVAIAH, S.P.; NARASIMHAN, R.; PAN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, X. Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase D $\gamma$  to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the Arabidopsis Response to Stress. **The Plant Cell.** doi: 10.1105/tpc.111.094946. PMID: 22589465. 2012.
- GUY, C. L; LI, Q. B. The organization and the evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell** 10:539-556. (1998).
- GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol.** 19:1720–30. (1999).
- HAIGH, N.G.; JOHSON, A.E. (2002) A new role for BiP: closing the aqueous HAMMAN, B.D.; HENDERSHOT, L.M.; JOHNSON, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the HARTL, F.-U. (1996) Molecular chaperone in protein folding. **Nature**, 381:571-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).
- IBÁ - Indústria brasileira de Árvores. **Anuario Estatístico Da IBA:** Ano Base 2014. 2015, 100. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>. (2015).
- INGRAM, J. and BARTELS, D. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47, 377-403. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>. (1996).

Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, Informações sobre madeiras, Eucalyptus grandis W. Hill ex Maiden. Acesso em: 26/10/2017. Disponível em: [http://www.ipt.br/informacoes\\_madeiras3.php?madeira=13](http://www.ipt.br/informacoes_madeiras3.php?madeira=13).

ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; MOUAHEB, N.; MEYER, Y.; MIGINIAC-MASLOW, M. Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. **The Plant Journal**. Doi: 10.1046/j.0960-7412.2000.00943.x. PMID: 11169189. 2001.

ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; MOUAHEB, N.; MEYER, Y.; MIGINIAC-MASLOW, M. (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. **Plant J.** 25: 127–135.

JIN, H.; LIU, B.; LUO, L.; FENG, D.; WANG, P.; LIU, J.; DA, Q.; HE, Y.; QI, K.; WANG, J.; WANG, H.B. Hypersensitive to high light1 interacts with low quantum yield of photosystem II1 and functions in protection of photosystem II from photodamage in Arabidopsis. **Plant Cell** 26:1213-1229(2014) [PubMed] [Europe PMC].

JUNG, Y. J.; MELENCION, S. M.; LEE, E. S.; PARK, J. H.; ALINAPON, C. V.; OH, H. T.; YUN, D. J.; CHI, Y. H.; LEE, S. Y. Universal Stress Protein Exhibits a Redox-Dependent Chaperone Function in Arabidopsis and Enhances Plant Tolerance to Heat Shock and Oxidative Stress. **Frontiers In Plant Science**. Doi: 10.3389/fpls.2015.01141. PMID: 26734042.

KANG, G.; MA, H.; LIU, G.; HAN, Q.; LI, C.; GUO, T. Silencing of TaBTF3 gene impairs tolerance to freezing and drought stresses in wheat. **Mol Genet Genomics**. 2013 Nov;288(11):591-9. doi: 10.1007/s00438-013-0773-5. Epub 2013 Aug 14. PMID: 23942841.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. (1998). Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. **Plant Physiology**, 118(2), 637–650.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant Physiol.** 1998 Oct;118(2):637-50. PMID: 9765550.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, 74(8), 1301–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>. (2011).
- KRUFT, V.; EUBEL, H.; JANSCH, L.; WERHAHN, W.; BRAUN, H.P. Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 127, 1694–1710. 2001.
- KUREPA, J.; WANG, S.; LI, Y.; ZAITLIN, D.; PIERCE, A. J.; SMALLE, J. A. (2009). Loss of 26S Proteasome Function Leads to Increased Cell Size and Decreased Cell Number in Arabidopsis Shoot Organs. **Plant Physiology**, 150(1), 178 LP-189. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/150/1/178>.
- KUREPA, J.; WANG, S.; LI, Y.; ZAITLIN, D.; PIERCE, A.J.; SMALLE, J.A. Loss of 26S proteasome function leads to increased cell size and decreased cell number in Arabidopsis shoot organs. **Plant Physiol.** 150:178-189(2009) [PubMed] [Europe PMC].
- KWAK, K. J.; KIM, Y. O.; KANG, H. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **Journal Of Experimental Botany**. Doi: 10.1093/jxb/eri298. PMID: 16207746. 2005.
- KWAK, K.J.; KIM, Y.O.; KANG, H. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **J. Exp. Bot.** 2005;56:3007–3016.
- LALOI, C.; RAYAPURAM, N.; CHARTIER, Y.; GRIENENBERGER, J.M.; BONNARD, G.; MEYER, Y. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 14144–14149. 2001.
- LALOI. C.; RAYAPURAM, N.; CHARTIER, Y.; GRIENENBERGER J.M.; BONNARD, G.; MEYER, Y. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants, **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 2001, vol. 98 (pg. 14144-14149).
- LARCHER, W. Physiological plant ecology. 4th edition. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. (2003).

Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 77 p.: il. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância: Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas no Agronegócio.

LEE, U.; et al. Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. **Plant Cell**, 2008 Mar. PMID 18326829.

LEONARDI, A. G.; CARLOS, N. A.; MAZZAFERA, P.; BALBUENA, T. S. *Eucalyptus urograndis* stem proteome is responsive to short-term cold stress. **Genetics and Molecular Biology**, 38(2), 191–198. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738220140235>. (2015).

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd edition. New York, USA: **Academic Press**. (1980).

LI, G. X.; WU, M. S.; HE, C. Y. Gene expression response of transcription factor OsBTf3 in rice to bacterial and fungal infection and signal molecule treatment revealed by quantitative real-time PCR analysis. **Acta Phytopathologica Sinica**. 2009;39(3):272–277.

LINDAHL, M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A.B.; ADAM, Z.; ANDERSSON, B. The Thylakoid FtsH Protease Plays a Role in the Light-Induced Turnover of the Photosystem II D1 Protein. Published March 2000. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.419>.

LINDAHL, M.; TABAK, S.; CSEKE, L.; PICHERSKY, E.; ANDERSSON, B.; ADAM, Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. **J Biol Chem**. 1996 Nov 15; 271(46):29329-34.

LORENZI, H. Árvores Exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. 391 p. (2003).

LU, Y.; HALL, D.A.; LAST, R.L. A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 23:1861-1875(2011) [PubMed] [Europe PMC].

MARIN, E.; NUSSAUME, L.; QUESADA, A.; GONNEAU, M.; SOTTA, B.; HUGUENEY, P.; FREY, A.; MARION-POLL, A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic

acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. **EMBO J.** (1996).

MARTINEZ-MEIER, A.; SANCHEZ, L.; DALLA SALDA, G.; PASTORINO, M. J.; GAUTRY, J. Y.; GALLO, L. A.; ROZENBERG, P. Genetic control of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) tree-ring response to the 2003 heat-wave in France. **Annals of Forest Sciences** 65, 1. Available in: [www.afs-journal.org](http://www.afs-journal.org). (2008).

MARTINS, I. S.; MARTINS, R. de C. C.; CORREIA, H. de S. Comparação entre seleção combinada e seleção direta em *Eucalyptus grandis*, sob diferentes intensidades de seleção. **Floresta e Ambiente**, v.8, p.36-43. (2001).

mass spectrometry. Protocol Exchange, Nature, London, 2011. Disponível em: MEIRELE, K.G.X. Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal. Embrapa. Documentos 165. Setembro, 2007.

MEURER, J.; PLÜCKEN, H.; KOWALLIK, K.V.; WESTHOFF, P. A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. **EMBO J.** 1998 Sep 15;17(18):5286-97. PMID: 9736608.

MHAMDI, A.; MAUVE, C.; GOUIA, H.; SAINDRENAN, P.; HODGES, M.; NOCTOR, G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. **Plant Cell Environ.** 33:1112-1123(2010) [PubMed] [Europe PMC].

MHAMDI, A.; MAUVE, C.; GOUIA, H.; SAINDRENAN, P.; HODGES, M.; NOCTOR, G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. **Plant Cell Environ.** 2010 Jul; 33(7):1112-23.

MIRANDA, A.C. Produtividade, estabilidade e adaptabilidade em progêneres de *Eucalyptus grandis*. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Florestal, FCA, Unesp, Botucatu, 2012.

MOREAU, M.; WESTLAKE, T.; ZAMPOGNA, G.; POPESCU, G.; TIAN, M.; NOUTSOS, C.; POPESCU, S. The *Arabidopsis* oligopeptidases TOP1 and TOP2 are salicylic acid targets that modulate SA-mediated signaling and the immune response. **The Plant Journal**. Doi: 10.1111/tpj.12320. PMID: 24004003. 2013.

- MORIMOTO, R. I. Regulation of heat shock transcriptional response: Cross talking between a family of transcription factors, molecular chaperones and negative regulators. **Genes Dev** 12:3788-3796. (1998).
- MOROSINOTTO, T.; BASSI, R.; FRIGERIO, S.; FINAZZI, G.; MORRIS, E.; BARBER, J. Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley. Consequences of a chronic over-reduction of the plastoquinone pool. **FEBS J.** 273: 4616–4630. 2006.
- MOURA, V.P.G. O germoplasma de *Eucalypts Urophylla* S. T. Blake no Brasil. EMBRAPA-CPAC, 2004. 12p. (Comunicado Técnico 111).
- MOURA, V.P.G. Provenance variation of *Eucalyptu camaldulensis* Dehnh, in Brazil. Oxford: Oxford University, 1986. 304p. Tese de doutorado.
- MURAD, A.; SOUZA, G.; GARCIA, J.; RECH, E. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nano UPLC mass spectrometry. Protocol Exchange, **Nature**, London. (2011). Disponível em: <<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2046>>. Acesso em: 12 abr. 2017.
- NAHNSEN, S.; BIELOW, C.; REINERT, K.; KOHLBACHER, O. Tools for label-free peptide quantification. **Molecular and Cell Proteomics**, v. 12, p. 549-556, 2013.
- NARBERHAUS, F.; OBRIST, M.; FÜHRER, F.; LANGKLOTZ, S. Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. **Res Microbiol.** 2009 Nov; 160(9):652-9.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiol.** 2008 Jul; 147(3):1251-63.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.10, p. 4007-4021, May 1975.
- OSÓRIO, J.; OSÓRIO, M. L.; CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v.18, p.363- 373. (1998).
- PEDRAZZINI, E.; VITALE, A. (1996) The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiol. Biochem.**, 34:207-216.

- PEDREIRA, A. S. L. Predição de interações proteína-proteína através de cobertura de conjuntos utilizando uma metaheurística GRASP. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense. 2012.
- PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**. 2001;11:185–197.
- PIMENTEL, C. Respostas fisiológicas à falta d'água: limitação difusiva ou metabólica? In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T.; (Ed.). Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária p.13-21. (2005).
- PIRES, I. E.; CRUZ, C. D.; BORGES, R. C. G.; REGAZZI, A. J. Índice de seleção combinada aplicado ao melhoramento genético de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v.20, p.191-197. (1996).
- PRABU, G.; KAWAR, P.G.; PAGARIYA, M. C.; PRASAD, D. T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Mol Biol** Rep 29:291-304. (2011).
- R Development Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- REIS, C.A.F.; ASSIS, T.F.; SANTOS, A.M.; FILHO, E.P. *Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil Dados eletrônicos - Colombo :
- RODRIGUES, R.A.; SILVA-FILHO, M.C.; CLINE, K. FtsH2 and FtsH5: two homologous subunits use different integration mechanisms leading to the same thylakoid multimeric complex. **Plant J**. 2011 Feb; 65(4):600-9.
- RYU, M.Y.; CHO, S.K.; KIM, W.T. RNAi suppression of RPN12a decreases the expression of type-A ARRs, negative regulators of cytokinin signaling pathway, in Arabidopsis. **Mol. Cells** 28:375-382(2009) [PubMed] [Europe PMC].
- SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L. O.; DE OLIVEIRA, D. E. (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? **Biochem. Biophys. Acta** 1492, 1–14. 10.1016/S0167-4781(00)00064-6.
- SENGUPTA, A.; GHOSH, S.; BASANT, A.; MALUSARE, S.; JOHRI, P.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; SONAWAT, H.M. Global host metabolic response to *Plasmodium vivax* infection: a <sup>1</sup> H NMR based urinary metabonomic study. **Malaria Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

- SHIN, D.; SHIN, C.H.; TUCKER, J.; OBER, E.A.; RENTZSCH, F.; POSS, K.D.; HAMMERSCHMIDT, M.; MULLINS, M.C.; STAINIER, D.Y. (2007) Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. **Development** (Cambridge, England). 134(11):2041-2050.
- SHIN, R.; ALVAREZ, S.; BURCH, A.Y.; JEZ, J.M.; SCHACHTMAN, D.P. Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007 Apr 10;104(15):6460-5. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17404219.
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. **Plant Physiology**, 115(2), 327–334.
- SILIM, S.; NASH, R.; REYNARD, D.; WHITE, B.; SCHROEDER, W. Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (*Populus* spp.) clones with contrasting drought tolerance. **Trees-Struct Funct**. 23:959–69. (2009).
- SILVA, A. M. S.; EMERSON, G. C. C; REIS, E. M. Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n. 2, p.01-10, (2007).
- SILVA, J.C.: GORENSTEIN, M.V.; LI, G.Z.; VISSERS, J.P.; GEROMANOS, S.J. Absolute quantification of proteins by LCMSE- A virtue of parallel MS acquisition. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-156, 2006.
- SILVA, M. R. Caracterização morfológica, fisiológica e nutricional de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetidas a diferentes níveis de estresse hídrico durante a fase de rustificação. 1998. 105f. Dissertação (Mestrado e Silvicultura) - Universidade do Federal do Paraná, Curitiba. (1998).
- SMALLE, J.; KUREPA, J.; YANG, P.; BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; DURSKI, A.; VIERSTRA, R.D. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. **Plant Cell** 14:17-32(2002) [PubMed] [Europe PMC].
- SMALLE, J.; KUREPA, J.; YANG, P.; BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; DURSKI, A.; VIERSTRA, R.D. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. **Plant Cell**. 2002 Jan; 14(1):17-32.

- SOARES, T.S.; CARVALHO, R.M.M.A.; VALE, A.B. Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.689-694. (2003).
- SREENIVASULU, N.; HARSHAVARDHAN, V.T.; GOVIND, G.; SEILER, C.; KOHLI, A. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? **Gene**, v.506, p.265–273, 2012.
- SUBRAMANIAN, A. R. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 28 , 101-142. 1983.
- SUNG, D. Y; VIERLING, E; GUY, C. L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis Hsp70* gene family. **Plant Physiol** 126:789-800. (2001).
- SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms.
- SURYANARAYANA, T.; SUBRAMANIAN, A. R. **Biochemistry** 23,1047-1051. 1984.
- SUZUKI, N.; BASSIL, E.; HAMILTON, J. S.; INUPAKUTIKA, M. A.; ZANDALINAS, S. I.; TRIPATHY, D.; ... MITTLER, R. ABA Is Required for Plant Acclimation to a Combination of Salt and Heat Stress. **PLoS ONE**, 11(1), e0147625. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147625>. 2016.
- SVOZIL et al. (2015). Proteasome targeting of proteins in *Arabidopsis* leaf mesophyll, epidermal and vascular tissues. **Front Plant Sci.** 2015 May 28;6:376. doi: 10.3389/fpls.2015.00376. eCollection 2015.
- SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J.H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N.T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Res.** 2017 Jan; 45:D362-68.
- TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 2002 Feb; 29(4):417-26.
- THATCHER, J. E.; ISOHERRANEN, N. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, 5(8), 875–886. <http://doi.org/10.1517/17425250903032681>. 2009.

- THATCHER, J. E.; ZELTER, A.; ISOHERRANEN, N. (2010). The relative importance of CYP26A1 in hepatic clearance of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol* 80, 903–12.
- THELEN, J.J.; MEKHEDOV, S.; OHLROGGE, J.B. Brassicaceae express multiple isoforms of biotin carboxyl carrier protein in a tissue-specific manner. *Plant Physiol.* 125:2016-2028(2001) [PubMed] [Europe PMC].
- TIMM, S.; NUNES-NESI, A.; PÄRNIK, T.; MORGENTHAL, K.; WIENKOOP, S.; KEERBERG, O.; WECKWERTH, W.; KLECZKOWSKI, L.A.; FERNIE, A.R.; BAUWE, H. A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2008 Oct; 20(10):2848-59.
- translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 92:747-758.
- translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J. Cell.*
- TRIVEDI, D. K.; GILL, S. S.; YADAV, S.; TUTEJA, N. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(2), e23021. <http://doi.org/10.4161/psb.23021>. 2013.
- Uniprot. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9XF88>. Acessado em 31 de outubro de 2017.
- VALDÉS, A. E.; IRAR, S.; MAJADA, J. P.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B.; PAGÈS, M. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. *Journal of Proteomics*, 79, 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.019>. (2013).
- VELLINI, A. L. T. T. Desempenho e divergência genética entre clones de *Eucalyptus* spp. em diferentes regimes de irrigação em casa de vegetação. 2007. 94p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. (2007).
- VIEIRA, I.G. Estudo de caracteres silviculturais e de produção de óleo essencial de progêneres de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L.A.S.Johnson Procedente de Anhembi – SP – Brasil, Ex. Atherton QLD – Austrália. Agosto de 2004. 80 p. Wilson & Walker. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7ed. Página 352.
- Vierstra, R.D. (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* 32: 275–302.

- VITTI, A.M.S.; BRITO, O.J. Óleo essencial de eucalipto. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26p. (Documentos Florestais).
- WANG, R.; ZHANG, Y.; KIEFFER, M.; YU, H.; KEPINSKI, S.; ESTELLE, M. HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in *Arabidopsis* by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1, 7, 10269. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10269>. 2016.
- WANG, Y.; ZHANG, X.; LU, S.; et al. Inhibition of a basal transcription factor 3-like gene *Osj10gBTF3* in rice results in significant plant miniaturization and typical pollen abortion. **Plant and Cell Physiology**. 2012;53(12):2073–2089.
- WERETILNYK, E.A.; ALEXANDER, K.J.; DREBENSTEDT, M.; SNIDER, J.D.; SUMMERS, P.S; MOFFATT, B.A. Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. **Plant Physiology** 125, 856–865. (2001).
- WIGHTMAN, R.; TURNER, S.R. The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. **The Plant Journal** 54, 794–805. (2008).
- WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERYSMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50. (1995).
- WILKINS, M.R; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D. HUMPHERYSMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1995.
- WILSON, K. & WALKER, J.M. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. P. 744. 2010.
- XIA, J. and WISHART, D.S. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using *MetaboAnalyst* Current Protocols in Bioinformatics, 14.10.1-14.10.48. (2011).
- YAMAGUCHI, K., VON KNOBLAUCH, K., & SUBRAMANIAN, A. R. The plastid ribosomal proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 275(37), 28455–28465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004350200>. 2000.

YAN, S.P.; ZHANG, Q.Y.; TANG, Z.C.; SU, W.A.; SUN, W.N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice.

**Mol Cell Proteomics.** 5:484–96. (2006).

YAN, S.P.; ZHANG, Q.Y.; TANG, Z.C.; SU, W.A.; SUN, W.N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice.

**Mol Cell Proteomics.** 2006 Mar; 5(3):484-96.

ZHANG, M.; TAKANO, T.; LIU, S.; ZHANG, X. Arabidopsis mitochondrial voltage-dependent anion channel 3 (AtVDAC3) protein interacts with thioredoxin m2. **Fefs Letters.** Doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.034. PMID: 25862497. 2015.

ZHANG, X.; MIAO, Y.C.; AN, G.Y.; ZHOU, Y.; SHANGGUAN, Z.P.; GAO, J.F.; SONG, C.P. K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. **Cell Research**, v.11, p.195–202, 2001.

ZHAO, X.; QIAO, X.R.; YUAN, J.; MA, X.F.; ZHANG, X. Nitric oxide inhibits blue lightinduced stomatal opening by regulating the K<sup>+</sup> influx in guard cells. **Plant Science**, v.184, p.29–35, 2012.

ZHENG, B.; HALPERIN, T.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O.; ADAM, Z.; CLARKE, A.K. Characterization of Chloroplast Clp proteins in Arabidopsis: Localization, tissue specificity and stress responses. **Physiol Plant.** 2002 Jan;114(1):92-101. PMID: 11982939.

## Anexo 1

**Anexo 1:** Proteínas exclusivas categorizadas em cada processo biológico encontradas no genótipo TT.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A CADA PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0008152	AT3G03980 AT3G54890 AT5G17530 AT5G62180 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT4G35260 AT3G60370 AT1G01050 AT1G74310 AT5G43940 AT5G20890 AT5G19220 AT5G16390 AT1G32470 AT2G17200 AT1G74920 AT1G32550 AT2G32060 AT5G17920 AT4G16730 AT4G13940 AT3G12580 AT5G12040 AT1G75690 AT3G03080 AT4G35830 AT3G63490 AT1G08830 AT1G32060 AT2G35500 AT5G47760 AT1G77090 AT5G17310 AT5G22060 AT5G48570 AT1G68010 AT1G11840 AT4G34350 AT3G48700 AT5G11880 AT4G13930 AT1G79340 AT5G58290 AT5G57040 AT4G38630 AT3G52580 AT4G01940 AT2G47180 AT1G11530 AT5G64570 AT2G36880 AT5G36210 AT1G76760 AT1G16030 AT5G35360 AT2G24270 AT5G02500 AT1G32060 AT5G19770 AT5G50850 AT3G54890 AT5G17310 AT1G17880 AT1G23190 AT5G27470 AT4G09010 AT1G11840 AT4G13430 AT4G34350 AT3G15360 AT3G61220 AT1G74310 AT4G13930 AT1G29880 AT1G60710 AT3G48000 AT5G43940 AT4G17870 AT4G38630 AT5G52640 AT2G47180 AT2G39730 AT5G17920 AT3G23600 AT2G43350 AT1G24020 AT1G16030 AT3G12580 AT5G52560 AT4G35830 AT5G59890 AT4G35770 AT1G56070 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0050896	AT2G35500 AT1G77090 AT3G54890 AT5G22060 AT5G48570 AT1G68010 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT4G34350 AT4G35260 AT3G60370 AT5G11880 AT1G01050 AT1G74310 AT4G13930 AT5G58290 AT5G43940 AT4G38630 AT5G20890 AT5G16390 AT3G52580 AT4G01940 AT1G32470 AT2G17200 AT1G32550 AT2G32060 AT1G11530 AT5G17920 AT2G36880 AT4G13940 AT1G16030 AT3G12580 AT5G35360 AT1G75690 AT4G35830 AT3G63490 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0044237	AT2G35500 AT1G77090 AT3G54890 AT5G22060 AT5G48570 AT1G68010 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT4G34350 AT4G35260 AT3G60370 AT5G11880 AT1G01050 AT1G74310 AT4G13930 AT5G58290 AT5G43940 AT4G38630 AT5G20890 AT5G16390 AT3G52580 AT4G01940 AT1G32470 AT2G17200 AT1G32550 AT2G32060 AT1G11530 AT5G17920 AT2G36880 AT4G13940 AT1G16030 AT3G12580 AT5G35360 AT1G75690 AT4G35830 AT3G63490 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0006950	AT1G32060 AT5G50850 AT5G17310 AT1G17880 AT4G09010 AT3G15360 AT3G61220 AT1G74310 AT5G43940 AT4G38630 AT5G52640 AT2G47180 AT2G39730 AT5G17920 AT3G23600 AT2G43350 AT1G24020 AT1G16030 AT3G12580 AT4G35830 AT5G59890 AT4G35770 AT1G56070 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0042221	AT5G17310 AT1G23190 AT5G27470 AT4G09010 AT1G11840 AT4G13430 AT4G34350 AT3G15360 AT1G74310 AT4G13930 AT1G29880 AT1G60710 AT3G48000 AT4G17870 AT4G38630 AT5G52640 AT2G47180 AT5G17920 AT2G43350 AT3G12580 AT5G52560 AT4G35770 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0009628	AT1G32060 AT5G19770 AT3G54890 AT5G17310 AT5G52640 AT2G47180 AT1G17880 AT2G39730 AT5G17920 AT3G23600 AT2G43350 AT1G74310 AT1G16030 AT3G12580 AT5G43940 AT4G35830 AT1G56070 AT4G38630 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500 AT1G77490
GO:0010035	AT5G17310 AT5G52640 AT2G47180 AT1G23190 AT5G27470 AT5G17920 AT1G11840 AT4G13430 AT1G11840 AT4G13430 AT2G43350 AT1G74310 AT4G13930 AT3G12580 AT1G29880 AT1G60710 AT3G48000 AT5G52560 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500
GO:0010038	AT5G17310 AT1G23190 AT5G27470 AT5G17920 AT1G11840 AT4G13430 AT4G13930 AT3G12580 AT1G29880 AT1G60710 AT3G48000 AT5G52560 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500
GO:0044281	AT5G16390 AT2G35500 AT1G32470 AT5G17920 AT2G36880 AT4G34350 AT4G35260 AT5G11880 AT4G13930 AT5G35360 AT5G43940 AT4G35830
GO:0042180	AT5G16390 AT2G35500 AT4G34350 AT4G35260 AT5G11880 AT1G32470 AT4G13930 AT5G35360 AT5G17920 AT2G36880
GO:0009607	AT1G32060 AT5G50850 AT1G24020 AT5G52640 AT3G12580 AT5G59890 AT2G39730 AT4G38630 AT5G02500 AT1G08830 AT3G12500
GO:0006082	AT5G16390 AT2G35500 AT4G34350 AT4G35260 AT5G11880 AT1G32470 AT4G13930 AT5G35360 AT4G35830 AT5G17920 AT2G36880

GO:0006979	AT2G43350 AT3G15360 AT1G74310 AT3G12580 AT2G47180 AT4G35770 AT4G09010 AT1G08830 AT1G77490
GO:0006952	AT1G32060 AT5G50850 AT3G61220 AT1G24020 AT5G52640 AT5G59890 AT2G39730 AT1G08830 AT3G12500
GO:0009408	AT1G74310 AT5G52640 AT1G16030 AT3G12580 AT2G47180 AT5G43940 AT4G38630 AT5G02500
GO:0006457	AT5G20890 AT1G16030 AT3G12580 AT5G22060 AT5G48570 AT1G75690 AT1G11530 AT5G02500
GO:0009617	AT1G32060 AT5G50850 AT5G52640 AT3G12580 AT5G59890 AT2G39730 AT1G08830
GO:0046394	AT5G16390 AT2G35500 AT5G11880 AT5G35360 AT5G17920 AT2G36880
GO:0000302	AT2G43350 AT1G74310 AT3G12580 AT2G47180 AT1G08830
GO:0009657	AT4G01940 AT2G36250 AT1G65260 AT5G55280
GO:0010020	AT2G36250 AT5G55280
GO:0006102	AT4G35260 AT4G35830
GO:0006544	AT1G32470 AT4G13930
GO:0043572	AT2G36250 AT5G55280

## Anexo 2

**Anexo 2:** Proteínas diminuídas no tratamento em relação ao controle categorizadas em cada processo biológico encontradas no genótipo TT.

<b>GO Revigo</b>	<b>PROTEÍNAS PERTENCENTES A CADA PROCESSO BIOLÓGICO</b>
GO:0009987	AT5G42270 AT5G56000 AT1G61520 AT3G53750 AT1G09340 AT2G40100 AT2G34460 AT2G13360
GO:0008152	AT5G42270 AT5G56000 AT1G61520 AT1G09340 AT2G40100 AT2G34460 AT2G13360
GO:0044237	AT5G42270 AT5G56000 AT1G61520 AT1G09340 AT2G40100 AT2G34460 AT2G13360
GO:0009628	AT5G42270 AT3G08940 AT1G09340 AT2G40100 AT1G44575
GO:0050896	AT5G42270 AT3G08940 AT1G09340 AT2G40100 AT1G44575
GO:0009416	AT5G42270 AT3G08940 AT2G40100 AT1G44575
GO:0015979	AT1G61520 AT2G40100
GO:0009765	AT1G61520
GO:0010304	AT5G42270
GO:0009853	AT2G13360
GO:0043467	AT5G42270
GO:0010109	AT5G42270
GO:0010196	AT1G44575

### Anexo 3

**Anexo 3:** Proteínas mais expressas no tratamento categorizadas em cada processo biológico encontradas no genótipo TT.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A CADA PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0050896	AT5G49910 AT4G11650 AT3G52300 AT5G23120 AT3G04790 AT3G06050 AT4G35090 AT5G50250 AT4G09320 AT4G01050 AT4G04020 AT4G34110
GO:0006950	AT5G49910 AT4G11650 AT3G52300 AT3G04790 AT3G06050 AT4G35090 AT5G50250 AT4G09320 AT4G01050 AT4G04020 AT4G34110
GO:0009628	AT5G49910 AT4G11650 AT3G52300 AT4G35090 AT4G09320 AT4G04020 AT4G34110
GO:0010035	AT5G49910 AT5G23120 AT3G06050 AT4G35090 AT4G09320
GO:0010038	AT5G49910 AT5G23120 AT3G06050 AT4G09320
GO:0006970	AT4G11650 AT3G52300 AT4G09320 AT4G34110
GO:0009651	AT4G11650 AT3G52300 AT4G09320 AT4G34110
GO:0042742	AT4G11650 AT3G04790 AT4G01050
GO:0045454	AT4G35090 AT2G35010
GO:0006642	AT2G21170
GO:0046184	AT2G21170
GO:0046166	AT2G21170

## Anexo 4

**Anexo 4:** Proteínas exclusivas no tratamento categorizadas em cada processo biológico encontradas no genótipo TS

	G36460 AT1G31340 AT5G54600 AT1G11750 AT1G12840 AT1G11870 AT3G25920 AT1G53520 AT1G79930 AT3G12580 AT1G09640 AT3G63490 AT5G48570 AT4G22890 AT4G34350 AT5G56350 AT2G24520 AT2G40490 AT1G53750 AT5G56630 AT1G50480 AT1G43670 AT1G69740 AT1G77120 AT5G35170 AT5G66150 AT1G05190 AT2G47730 AT5G10160 AT1G48830 AT1G79550 AT1G75350 AT3G45140 AT5G42800 AT3G63190
GO:0044238	AT1G08490 AT5G40390 AT2G28470 AT3G26340 AT2G30950 AT1G32200 AT4G26270 AT3G56070 AT5G08380 AT5G66140 AT4G13430 AT1G02500 AT1G27680 AT3G63520 AT1G49630 AT1G74310 AT1G07110 AT2G22240 AT4G33680 AT2G22360 AT3G43190 AT1G65930 AT2G39810 AT3G02780 AT3G06580 AT3G54660 AT1G32470 AT2G36460 AT1G17650 AT1G31340 AT5G55G54600 AT2G32060 AT3G14290 AT1G12840 AT1G11870 AT3G58140 AT3G25920 AT1G53520 AT1G79930 AT3G13470 AT3G12580 AT1G09640 AT2G43750 AT1G74040 AT3G63490 AT4G39090 AT5G15250 AT4G08900 AT4G29120 AT5G22060 AT1G66670 AT5G48570 AT5G26780 AT1G17220 AT4G34350 AT5G56350 AT2G24520 AT5G08030 AT1G50200 AT1G53750 AT5G56630 AT3G45310 AT1G43670 AT5G35530 AT4G13930 AT1G49970 AT3G52930 AT5G28840 AT2G02010 AT5G35170 AT5G66150 AT1G05190 AT5G48300 AT1G63770 AT5G61580 AT5G62790 AT1G12900 AT4G29410 AT1G16300 AT3G08900 AT1G79750 AT5G10160 AT3G02090 AT1G48830 AT1G79550 AT1G07320 AT1G75350 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT3G63190
GO:0050896	AT1G08490 AT5G40390 AT3G54890 AT3G01280 AT3G04790 AT1G30580 AT2G30950 AT1G17880 AT3G56070 AT4G22670 AT4G13430 AT4G14960 AT1G02500 AT3G63520 AT5G37850 AT1G74310 AT1G60710 AT5G58070 AT2G22240 AT4G33680 AT2G22360 AT1G65930 AT3G10920 AT2G39810 AT5G23120 AT3G52880 AT1G31340 AT2G39730 AT2G47710 AT1G79930 AT1G50010 AT1G24020 AT3G12580 AT4G31990 AT4G32320 AT5G42740 AT2G43750 AT3G12500 AT5G19770 AT4G39090 AT5G17310 AT5G15450 AT5G40770 AT4G35090 AT1G23190 AT2G30970 AT4G34350 AT1G50200 AT1G52740 AT5G54770 AT1G50480 AT1G29880 AT4G13930 AT5G12250 AT1G77120 AT5G18170 AT3G53990 AT5G51830 AT5G48300 AT5G52640 AT5G62790 AT4G27670 AT2G47730 AT5G07350 AT5G63400 AT1G53540 AT3G45140 AT3G63190 AT1G07400 AT1G77490 AT1G04410
GO:0009058	AT1G08490 AT5G40390 AT1G32200 AT4G13430 AT1G02500 AT1G27680 AT5G37850 AT3G48680 AT2G22240 AT4G33680 AT3G43190 AT3G02780 AT4G34700 AT1G31340 AT5G54600 AT2G32060 AT1G12840 AT1G11870 AT3G58140 AT3G25920 AT1G53520 AT1G09640 AT2G43750 AT1G74040 AT2G43750 AT1G20690 AT4G08900 AT4G29120 AT5G26780 AT4G34350 AT5G56350 AT2G24520 AT5G08030 AT1G50200 AT5G5530 AT1G69740 AT5G28840 AT1G05190 AT5G48300 AT1G62790 AT4G29410 AT3G08900 AT1G79750 AT5G10160 AT1G48830 AT1G07320 AT1G75350 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT3G63190
GO:0044281	AT5G40390 AT4G26270 AT1G02500 AT5G37850 AT1G07110 AT2G22240 AT4G33680 AT1G65930 AT3G06580 AT3G54660 AT1G32470 AT2G36460 AT1G17650 AT1G31340 AT1G12840 AT1G11870 AT3G58140 AT5G03290 AT1G53520 AT4G13940 AT2G43750 AT1G74040 AT2G20690 AT4G08900 AT4G29120 AT5G26780 AT4G34350 AT5G56350 AT2G24520 AT5G08030 AT1G50200 AT5G5530 AT1G69740 AT5G28840 AT1G05190 AT5G48300 AT1G62790 AT1G12900 AT1G16300 AT1G79750 AT5G10160 AT1G79550 AT3G45140 AT5G42800
GO:0044249	AT1G08490 AT5G40390 AT1G32200 AT4G13430 AT1G02500 AT1G27680 AT5G37850 AT3G48680 AT2G22240 AT4G33680 AT3G43190 AT3G02780 AT4G34700 AT1G31340 AT5G54600 AT2G32060 AT1G12840 AT1G11870 AT3G58140 AT3G25920 AT1G53520 AT1G09640 AT2G43750 AT1G74040 AT2G43750 AT1G20690 AT4G08900 AT4G29120 AT5G26780 AT4G34350 AT5G56350 AT2G24520 AT5G08030 AT1G50200 AT5G5530 AT1G69740 AT5G28840 AT1G05190 AT5G48300 AT1G62790 AT4G29410 AT3G08900 AT1G79750 AT5G10160 AT1G48830 AT1G07320 AT1G75350 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT3G63190

	AT1G08490 AT5G40390 AT4G39090 AT5G17310 AT1G30580 AT5G40770 AT4G35090 AT1G23190 AT2G30970 AT3G56070 AT4G22670 AT4G13430 AT4G34350 AT1G02500 AT1G50200 AT1G50480 AT3G63520 AT1G74310 AT1G29880 AT4G13930 AT1G60710 AT1G77120 AT2G22240 AT4G33680 AT5G18170 AT1G65930 AT3G10920 AT5G51830 AT5G23120 AT3G52880 AT5G52640 AT5G62790 AT1G31340 AT4G27670 AT5G07350 AT5G63400 AT1G79930 AT3G12580 AT4G31990 AT4G32320 AT5G42740 AT3G45140 AT2G43750 AT1G07400 AT3G12500 AT1G77490 AT1G04410
GO:0042221	AT5G40390 AT4G39090 AT5G17310 AT3G04790 AT5G15450 AT5G40770 AT1G17880 AT4G35090 AT4G14960 AT1G02500 AT1G52740 AT5G54770 AT3G63520 AT5G37850 AT1G74310 AT5G12250 AT1G77120 AT5G58070 AT2G22240 AT4G33680 AT5G18170 AT2G22360 AT1G65930 AT3G10920 AT3G53990 AT2G39810 AT3G52880 AT5G52640 AT4G27670 AT2G39730 AT2G47730 AT5G07350 AT2G47710 AT1G53540 AT1G79930 AT1G50010 AT1G24020 AT3G12580 AT4G31990 AT4G32320 AT3G45140 AT3G63190 AT1G07400 AT3G12500 AT1G77490 AT1G04410
GO:0006950	AT1G08490 AT4G39090 AT5G15250 AT3G26340 AT2G30950 AT5G22060 AT1G66670 AT5G48570 AT1G17220 AT3G56070 AT5G66140 AT1G50200 AT1G53750 AT3G45310 AT1G49630 AT1G74310 AT5G35530 AT1G49970 AT2G22360 AT2G39810 AT1G05190 AT1G63770 AT1G31340 AT5G54600 AT2G32060 AT3G14290 AT4G29410 AT1G11870 AT3G58140 AT3G25920 AT1G79930 AT3G13470 AT3G12580 AT3G02090 AT1G48830 AT1G07320 AT1G09640 AT1G75350 AT5G04800 AT3G63190
GO:0019538	AT5G40390 AT5G19770 AT4G39090 AT3G54890 AT5G17310 AT5G15450 AT5G40770 AT2G30950 AT1G17880 AT4G35090 AT4G14960 AT1G02500 AT5G54770 AT3G63520 AT5G37850 AT1G74310 AT5G12250 AT1G77120 AT5G58070 AT2G22240 AT5G18170 AT2G22360 AT1G65930 AT3G10920 AT3G53990 AT2G39810 AT5G48300 AT5G52640 AT4G27670 AT2G39730 AT2G47730 AT1G53540 AT1G79930 AT1G50010 AT3G12580 AT4G31990 AT3G45140 AT1G07400 AT1G04410
GO:0009628	AT1G08490 AT5G17310 AT1G30580 AT5G40770 AT4G35090 AT1G23190 AT2G30970 AT3G56070 AT1G50480 AT1G74310 AT1G29880 AT4G13930 AT1G60710 AT1G77120 AT5G58070 AT2G22240 AT5G18170 AT1G65930 AT3G10920 AT5G53990 AT2G39810 AT5G48300 AT5G52640 AT4G27670 AT2G39730 AT2G47730 AT1G53540 AT1G79930 AT1G50010 AT3G12580 AT4G31990 AT3G45140 AT1G07400 AT1G04410
GO:0010035	AT1G08490 AT5G17310 AT1G30580 AT5G40770 AT4G35090 AT1G23190 AT2G30970 AT3G56070 AT1G50480 AT1G74310 AT1G29880 AT4G13930 AT1G60710 AT1G77120 AT2G22240 AT5G18170 AT1G65930 AT3G10920 AT5G51830 AT5G23120 AT3G52880 AT5G52640 AT5G62790 AT4G27670 AT5G07350 AT5G63400 AT1G79930 AT3G12580 AT4G31990 AT5G42740 AT2G43750 AT3G12500 AT1G04410
GO:0010038	AT1G08490 AT5G17310 AT1G30580 AT1G23190 AT2G30970 AT3G56070 AT4G22670 AT4G13430 AT1G02500 AT1G50200 AT1G50480 AT1G74310 AT1G29880 AT4G13930 AT1G60710 AT1G77120 AT5G51830 AT5G23120 AT3G52880 AT5G52640 AT5G62790 AT4G27670 AT5G07350 AT5G63400 AT1G79930 AT3G12580 AT4G31990 AT5G42740 AT2G43750 AT3G12500 AT1G04410
GO:0006807	AT4G08900 AT4G29120 AT5G26780 AT1G02500 AT2G24520 AT2G40490 AT1G50200 AT5G54770 AT1G69740 AT4G13930 AT3G52930 AT5G28840 AT2G0210 AT4G33680 AT5G35170 AT5G18170 AT1G65930 AT3G02780 AT1G32470 AT2G36460 AT1G17650 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT5G37600 AT5G12040 AT2G43750 AT1G74040 AT2G20690 AT3G63490
GO:0005975	AT5G40390 AT2G28470 AT4G29120 AT4G26270 AT5G08380 AT4G13430 AT4G34350 AT5G56350 AT5G08030 AT5G56630 AT1G27680 AT1G43670 AT3G52930 AT1G07110 AT2G22240 AT3G43190 AT5G66150 AT5G48300 AT3G06580 AT5G61580 AT5G62790 AT1G12900 AT2G36460 AT1G17650 AT1G16300 AT3G08900 AT1G79550
GO:0034641	AT4G08900 AT4G29120 AT5G26780 AT1G02500 AT2G24520 AT2G40490 AT1G50200 AT5G54770 AT1G69740 AT4G13930 AT3G52930 AT5G28840 AT2G0210 AT4G33680 AT5G35170 AT1G65930 AT3G02780 AT1G32470 AT2G36460 AT1G17650 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT2G43750 AT1G74040 AT2G20690 AT3G63490
GO:0009056	AT1G10370 AT5G15250 AT3G26340 AT4G08900 AT2G30950 AT4G29120 AT4G35090 AT4G26270 AT5G66140 AT5G56350 AT1G53750 AT5G56630 AT

	3G63520 AT3G52930 AT1G32470 AT3G52880 AT5G61580 AT1G12900 AT2G36460 AT1G17650 AT3G14290 AT1G16300 AT5G03290 AT2G47730 AT1G79550
GO:0044262	AT5G40390 AT4G29120 AT4G26270 AT4G13430 AT4G34350 AT5G56350 AT5G08030 AT5G56630 AT1G27680 AT1G43670 AT3G52930 AT1G07110 AT2G22240 AT3G43190 AT5G66150 AT5G48300 AT3G06580 AT5G61580 AT5G62790 AT1G12900 AT2G36460 AT1G17650 AT1G16300 AT3G08900 AT1G79550
GO:0042180	AT1G65930 AT4G08900 AT1G32470 AT5G62790 AT5G26780 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT5G03290 AT4G34350 AT1G02500 AT1G50200 AT1G50480 AT4G13930 AT5G28840 AT1G79750 AT5G10160 AT2G02010 AT3G45140 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040
GO:0006082	AT1G65930 AT4G08900 AT1G32470 AT5G62790 AT5G26780 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT5G03290 AT4G34350 AT1G02500 AT1G50200 AT1G50480 AT4G13930 AT5G28840 AT1G79750 AT5G10160 AT2G02010 AT3G45140 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040
GO:0006066	AT5G66150 AT5G40390 AT3G06580 AT4G29120 AT5G61580 AT5G62790 AT1G12900 AT4G26270 AT2G36460 AT1G17650 AT1G16300 AT4G34350 AT5G56350 AT5G08030 AT5G56630 AT1G43670 AT3G52930 AT1G07110 AT1G79550 AT2G22240
GO:0009266	AT3G53990 AT2G39810 AT5G15450 AT5G52640 AT4G35090 AT4G27670 AT2G39730 AT2G47730 AT5G54770 AT1G53540 AT1G79930 AT1G74310 AT3G12580 AT5G12250 AT4G31990 AT5G58070 AT2G22240 AT1G07400 AT2G22360
GO:0044283	AT5G40390 AT1G31340 AT1G12840 AT1G02500 AT2G24520 AT1G53520 AT5G54770 AT5G37850 AT5G28840 AT1G79750 AT5G10160 AT3G45140 AT5G42800 AT2G22240 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040 AT2G20690
GO:0006996	AT3G53730 AT5G23120 AT5G15450 AT5G40770 AT2G30950 AT1G65260 AT1G14900 AT1G11750 AT1G11870 AT1G12410 AT4G14960 AT4G13940 AT5G10470 AT3G12110 AT3G63190 AT1G06950
GO:0006091	AT1G15980 AT1G64770 AT3G54890 AT5G61580 AT5G25450 AT1G12900 AT4G26270 AT3G01440 AT1G16300 AT4G22890 AT5G03290 AT5G56350 AT5G56630 AT5G08530 AT1G77120 AT1G79550
GO:0009607	AT1G65930 AT3G10920 AT4G39090 AT3G01280 AT3G04790 AT5G52640 AT2G39730 AT2G47730 AT1G52740 AT1G24020 AT3G12580 AT3G45140 AT2G22240 AT3G63190 AT4G33680 AT3G12500
GO:0019318	AT5G66150 AT3G06580 AT4G29120 AT5G61580 AT1G12900 AT4G26270 AT2G36460 AT1G17650 AT1G16300 AT5G56350 AT5G56630 AT1G43670 AT3G52930 AT1G07110 AT1G79550
GO:0051704	AT1G65930 AT3G10920 AT4G39090 AT3G01280 AT3G04790 AT5G52640 AT2G39730 AT2G47730 AT1G52740 AT3G12580 AT3G45140 AT2G22240 AT3G63190 AT4G33680 AT3G12500
GO:0044282	AT4G08900 AT1G32470 AT4G29120 AT5G61580 AT1G12900 AT4G26270 AT2G36460 AT1G17650 AT1G16300 AT5G56350 AT5G56630 AT3G52930 AT1G79550
GO:0044106	AT4G08900 AT1G32470 AT5G26780 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT1G02500 AT1G50200 AT4G13930 AT2G02010 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040
GO:0051186	AT1G08490 AT1G65930 AT3G02780 AT3G54660 AT4G29120 AT2G36460 AT1G17650 AT5G03290 AT2G40490 AT1G50480 AT5G37850 AT1G69740 AT3G52930
GO:0009308	AT4G08900 AT1G32470 AT5G26780 AT1G31340 AT1G11870 AT3G58140 AT1G02500 AT1G50200 AT4G13930 AT2G02010 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040
GO:0006952	AT1G65930 AT3G10920 AT4G39090 AT3G04790 AT5G52640 AT2G39730 AT2G47730 AT1G52740 AT1G24020 AT2G22240 AT3G63190 AT4G33680 AT3G12500
GO:0009617	AT1G65930 AT2G47730 AT3G10920 AT1G52740 AT4G39090 AT3G01280 AT3G04790 AT5G52640 AT3G12580 AT2G22240 AT3G63190 AT2G39730
GO:0044275	AT5G56350 AT5G56630 AT4G29120 AT5G61580 AT3G52930 AT1G12900 AT1G79550

	T4G26270 AT2G36460 AT1G17650 AT1G79550 AT1G16300
GO:0016052	AT5G56350 AT5G56630 AT4G29120 AT5G61580 AT3G52930 AT1G12900 AT4G26270 AT2G36460 AT1G17650 AT1G79550 AT1G16300
GO:0009657	AT5G23120 AT5G15450 AT5G10470 AT2G30950 AT1G65260 AT1G11750 AT3G63190 AT1G11870 AT1G12410 AT1G06950
GO:0006979	AT3G10920 AT1G74310 AT3G52880 AT3G12580 AT4G32320 AT4G35090 AT2G22240 AT4G27670 AT1G07400 AT1G77490
GO:0044271	AT1G02500 AT2G24520 AT3G02780 AT2G40490 AT5G54770 AT1G69740 AT2G43750 AT4G33680 AT1G74040 AT2G20690
GO:0006732	AT5G03290 AT1G65930 AT1G50480 AT3G54660 AT5G37850 AT4G29120 AT3G52930 AT2G36460 AT1G17650
GO:0000302	AT3G10920 AT1G74310 AT3G52880 AT3G12580 AT4G35090 AT2G22240 AT4G27670
GO:0006457	AT1G79930 AT3G13470 AT3G12580 AT5G22060 AT5G48570 AT3G56070 AT2G22360
GO:0006790	AT1G08490 AT4G13430 AT1G02500 AT5G54770 AT3G54660 AT1G31340 AT2G43750
GO:0006575	AT1G02500 AT1G53520 AT4G08900 AT3G54660 AT1G31340 AT5G42800 AT1G12840
GO:0009658	AT5G15450 AT5G10470 AT1G11750 AT3G63190 AT1G11870 AT1G12410 AT1G06950
GO:0055086	AT1G65930 AT1G02500 AT2G24520 AT4G29120 AT3G52930 AT2G36460 AT1G17650
GO:0009117	AT1G65930 AT2G24520 AT4G29120 AT3G52930 AT2G36460 AT1G17650
GO:0015979	AT1G15980 AT1G64770 AT3G54890 AT3G01440 AT1G11750 AT4G22890
GO:0055114	AT1G15980 AT1G64770 AT5G08530 AT5G25450 AT4G22890 AT4G21580
GO:0009642	AT1G74310 AT3G12580 AT2G30950 AT2G22240 AT4G27670 AT5G18170
GO:0022900	AT1G15980 AT1G64770 AT5G08530 AT5G25450 AT4G22890
GO:0019684	AT1G15980 AT1G64770 AT3G54890 AT3G01440 AT4G22890
GO:0009644	AT1G74310 AT3G12580 AT2G30950 AT2G22240 AT4G27670
GO:0042364	AT5G54770 AT5G37850 AT5G28840 AT2G20690
GO:0008654	AT4G34350 AT5G62790 AT1G32200 AT2G22240
GO:0006800	AT3G10920 AT3G52880 AT2G30950 AT4G35090
GO:0044272	AT4G13430 AT1G02500 AT5G54770 AT2G43750
GO:0009069	AT1G32470 AT4G13930 AT5G26780 AT2G43750
GO:0006766	AT5G54770 AT5G37850 AT5G28840 AT2G20690
GO:0019637	AT4G34350 AT5G62790 AT1G32200 AT2G22240
GO:0006740	AT4G29120 AT3G52930 AT2G36460 AT1G17650
GO:0033014	AT3G02780 AT2G40490 AT1G69740
GO:0006544	AT1G32470 AT4G13930 AT5G26780
GO:0043094	AT4G34700 AT5G37850 AT3G48680
GO:0042744	AT3G52880 AT4G35090
GO:0046173	AT5G40390 AT2G22240
GO:0010304	AT5G15250 AT2G30950
GO:0006102	AT5G03290 AT1G65930
GO:0006090	AT4G34350 AT5G62790
GO:0071258	AT4G14960 AT5G19770
GO:0005986	AT5G40390 AT3G43190
GO:0019252	AT1G27680 AT5G48300
GO:0019406	AT5G40390
GO:0043335	AT1G74310

---

GO:0001887	AT1G08490
GO:0046484	AT5G54770
GO:0015822	AT5G46800
GO:0018131	AT5G54770
GO:0000913	AT5G10470
GO:0006434	AT1G11870
GO:0018283	AT1G08490
GO:0007105	AT5G10470
GO:0018282	AT1G08490
GO:0046677	AT4G34350
GO:0071731	AT5G40770

## Anexo 5

**Anexo 5:** Proteínas mais expressas no tratamento categorizada em cada processo biológico encontradas no genótipo TS.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A ESSE PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0008152	AT5G40390 AT1G10370 AT1G15980 AT1G64770 AT3G26340 AT2G30950 AT1G66670 AT5G25450 AT4G34350 AT5G56350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT1G49630 AT5G08530 AT1G01050 AT1G43670 AT1G74310 AT1G49970 AT3G52930 AT2G02010 AT4G33680 AT1G65930 AT3G10920 AT3G54660 AT5G48300 AT3G52880 AT1G63770 AT5G62790 AT1G12900 AT1G17650 AT3G08900 AT3G25920 AT5G03290 AT2G47730 AT1G79550 AT1G730 AT1G79930 AT3G12580 AT5G10160 AT2G24270 AT1G09640 AT1G79550 AT5G04800
GO:0009987	AT5G40390 AT1G10370 AT1G15980 AT1G64770 AT3G26340 AT5G15450 AT2G30950 AT5G25450 AT4G34350 AT5G56350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT5G08530 AT1G01050 AT1G43670 AT1G74310 AT3G52930 AT2G02010 AT4G33680 AT1G65930 AT3G10920 AT3G53730 AT3G23120 AT3G54660 AT5G48300 AT3G52880 AT5G62790 AT1G12900 AT1G17650 AT3G08900 AT3G25920 AT5G03290 AT2G47730 AT1G79530 AT3G12580 AT5G10160 AT5G46800 AT1G09640 AT1G79550 AT5G04800 AT1G06950
GO:0044237	AT5G40390 AT1G10370 AT1G15980 AT1G64770 AT3G26340 AT2G30950 AT5G25450 AT4G34350 AT5G56350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT5G08530 AT1G01050 AT1G43670 AT1G74310 AT3G52930 AT2G02010 AT4G33680 AT1G65930 AT3G10920 AT3G54660 AT5G48300 AT3G52880 AT5G62790 AT1G12900 AT1G17650 AT3G08900 AT3G25920 AT5G03290 AT2G47730 AT1G79930 AT3G12580 AT5G10160 AT1G09640 AT1G79550 AT5G04800
GO:0044238	AT5G40390 AT3G26340 AT2G30950 AT1G66670 AT4G34350 AT5G56350 AT1G50200 AT1G49630 AT1G43670 AT1G74310 AT1G49970 AT3G52930 AT2G02010 AT4G33680 AT1G65930 AT3G54660 AT5G48300 AT1G63770 AT5G62790 AT1G12900 AT1G17650 AT3G08900 AT3G25920 AT1G79930 AT3G12580 AT5G10160 AT1G09640 AT1G79550 AT5G04800
GO:0050896	AT1G65930 AT3G10920 AT5G40390 AT5G23120 AT3G01280 AT3G04790 AT5G15450 AT5G48300 AT3G52880 AT2G30950 AT5G62790 AT2G47730 AT4G34350 AT1G50200 AT1G52740 AT5G54770 AT1G79930 AT1G50480 AT1G74310 AT3G12580 AT4G31990 AT4G33680
GO:0044281	AT1G65930 AT5G40390 AT3G54660 AT5G62790 AT1G12900 AT1G17650 AT5G03290 AT4G34350 AT5G56350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT1G43670 AT3G52930 AT5G10160 AT2G02010 AT1G79550 AT4G33680
GO:0042221	AT1G65930 AT3G10920 AT5G40390 AT5G23120 AT3G52880 AT5G62790 AT4G34350 AT1G50200 AT1G79930 AT1G50480 AT1G74310 AT3G12580 AT4G31990 AT4G33680
GO:0006950	AT1G65930 AT3G10920 AT5G40390 AT3G04790 AT5G15450 AT3G52880 AT2G47730 AT1G52740 AT5G54770 AT1G79930 AT1G74310 AT3G12580 AT4G31990 AT4G33680
GO:0009058	AT5G40390 AT5G48300 AT5G62790 AT3G08900 AT3G25920 AT4G34350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT5G10160 AT1G09640 AT4G33680 AT5G04800
GO:0044249	AT5G40390 AT5G48300 AT5G62790 AT3G08900 AT3G25920 AT4G34350 AT1G50200 AT5G54770 AT1G50480 AT5G10160 AT1G09640 AT4G33680 AT5G04800
GO:0009628	AT1G65930 AT3G10920 AT2G47730 AT5G40390 AT5G54770 AT1G79930 AT1G50480 AT1G74310 AT3G12580 AT2G30950 AT4G31990 AT5G62790
GO:0010035	AT1G65930 AT3G10920 AT1G50200 AT5G23120 AT1G79930 AT1G50480 AT1G74310 AT3G52880 AT3G12580 AT4G31990 AT5G62790

GO:0009056	AT5G03290 AT2G47730 AT1G10370 AT5G56350 AT3G26340 AT3G528 80 AT2G30950 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550
GO:0005975	AT5G40390 AT4G34350 AT5G56350 AT1G43670 AT5G48300 AT5G627 90 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550 AT3G08900
GO:0044262	AT5G40390 AT4G34350 AT5G56350 AT1G43670 AT5G48300 AT5G627 90 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550 AT3G08900
GO:0010038	AT1G65930 AT3G10920 AT1G50200 AT5G23120 AT1G79930 AT1G504 80 AT3G52880 AT3G12580 AT4G31990 AT5G62790
GO:0006066	AT5G40390 AT4G34350 AT5G56350 AT1G43670 AT5G62790 AT3G529 30 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550
GO:0042180	AT1G65930 AT5G03290 AT4G34350 AT1G50200 AT1G50480 AT5G627 90 AT5G10160 AT2G02010 AT4G33680
GO:0006082	AT1G65930 AT5G03290 AT4G34350 AT1G50200 AT1G50480 AT5G627 90 AT5G10160 AT2G02010 AT4G33680
GO:0005996	AT4G34350 AT5G56350 AT1G43670 AT5G62790 AT3G52930 AT1G129 00 AT1G17650 AT1G79550
GO:0051704	AT1G65930 AT3G10920 AT2G47730 AT1G52740 AT3G01280 AT3G047 90 AT3G12580 AT4G33680
GO:0006091	AT5G03290 AT5G56350 AT1G15980 AT1G64770 AT5G08530 AT5G254 50 AT1G12900 AT1G79550
GO:0009607	AT1G65930 AT3G10920 AT2G47730 AT1G52740 AT3G01280 AT3G047 90 AT3G12580 AT4G33680
GO:0009617	AT1G65930 AT3G10920 AT2G47730 AT1G52740 AT3G01280 AT3G047 90 AT3G12580
GO:0009266	AT2G47730 AT5G54770 AT1G79930 AT5G15450 AT1G74310 AT3G125 80 AT4G31990
GO:0006732	AT1G65930 AT5G03290 AT1G50480 AT3G54660 AT3G52930 AT1G176 50
GO:0051186	AT1G65930 AT5G03290 AT1G50480 AT3G54660 AT3G52930 AT1G176 50
GO:0006952	AT1G65930 AT3G10920 AT2G47730 AT1G52740 AT3G04790 AT4G336 80
GO:0044282	AT5G56350 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550
GO:0044275	AT5G56350 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550
GO:0006508	AT3G26340 AT1G49630 AT1G49970 AT1G63770 AT1G66670
GO:0006996	AT3G53730 AT5G23120 AT5G15450 AT2G30950 AT1G06950
GO:0016052	AT5G56350 AT3G52930 AT1G12900 AT1G17650 AT1G79550
GO:0032787	AT4G34350 AT1G50480 AT5G62790 AT5G10160
GO:0022900	AT1G15980 AT1G64770 AT5G08530 AT5G25450
GO:0000302	AT3G10920 AT1G74310 AT3G52880 AT3G12580
GO:0009657	AT5G23120 AT5G15450 AT2G30950 AT1G06950
GO:0055114	AT1G15980 AT1G64770 AT5G08530 AT5G25450
GO:0006979	AT3G10920 AT1G74310 AT3G52880 AT3G12580
GO:0006800	AT3G10920 AT3G52880 AT2G30950
GO:0055086	AT1G65930 AT3G52930 AT1G17650
GO:0009644	AT1G74310 AT3G12580 AT2G30950
GO:0009642	AT1G74310 AT3G12580 AT2G30950
GO:0019682	AT4G34350 AT5G62790
GO:0009773	AT1G15980 AT1G64770
GO:0046490	AT4G34350 AT5G62790
GO:0009404	AT2G47730 AT1G10370
GO:0006081	AT4G34350 AT5G62790
GO:0006102	AT1G65930 AT5G03290

GO:0006090	AT4G34350 AT5G62790
GO:0009658	AT5G15450 AT1G06950
GO:0006740	AT3G52930 AT1G17650
GO:0009407	AT2G47730 AT1G10370
GO:0006119	AT5G08530 AT5G25450
GO:0009228	AT5G54770
GO:0019406	AT5G40390
GO:0019401	AT5G40390
GO:0006122	AT5G25450
GO:0043335	AT1G74310
GO:0018131	AT5G54770
GO:0042744	AT3G52880
GO:0015822	AT5G46800
GO:0046484	AT5G54770
GO:0006419	AT1G50200
GO:0010325	AT5G40390
GO:0046677	AT4G34350
GO:0006000	AT1G43670

## Anexo 6

**Anexo 6:** Proteínas diminuídas no tratamento em relação ao controle categorizada em cada processo biológico encontradas no genótipo TS.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A ESSE PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0050896	AT4G24770 AT5G19780 AT3G08940 AT4G03520 AT5G42790 AT5G63400 AT1G07890 AT2G44060 AT5G63310 AT5G09650 AT5G50250 AT4G11260
GO:0042221	AT5G19780 AT4G03520 AT5G42790 AT5G63400 AT1G07890 AT2G44060 AT5G63310 AT5G09650 AT4G11260
GO:0006950	AT4G24770 AT4G03520 AT1G07890 AT2G44060 AT5G63310 AT5G09650 AT5G50250 AT4G11260
GO:0010035	AT5G19780 AT5G42790 AT5G63400 AT1G07890 AT5G63310 AT5G09650
GO:0010038	AT5G19780 AT5G63400 AT1G07890 AT5G09650
GO:0006952	AT4G24770 AT5G09650 AT5G50250 AT4G11260
GO:0006979	AT4G03520 AT1G07890 AT5G63310
GO:0009734	AT5G63310 AT4G11260
GO:0000302	AT1G07890 AT5G63310
GO:0000060	AT1G07140
GO:0010275	AT5G13120

## Anexo 7

**Anexo 7:** Proteínas exclusivas do tratamento categorizadas em cada processo biológico para o genótipo suscetível.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A CADA PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0008152	AT2G35500 AT3G03980 AT5G47760 AT5G22060 AT1G14810 AT5G42190 AT1G11840 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT3G60370 AT5G08410 AT5G11880 AT2G01140 AT1G79340 AT5G03300 AT5G58290 AT5G57040 AT4G38630 AT5G20890 AT1G64520 AT5G16390 AT4G26840 AT3G25220 AT4G01940 AT2G47180 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G64570 AT4G16730 AT5G36210 AT5G37640 AT1G76760 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G75690 AT4G33010 AT3G10740 AT5G02500
GO:0009987	AT2G35500 AT5G16880 AT2G36250 AT5G22060 AT1G65260 AT1G14810 AT5G42190 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT3G60370 AT5G08410 AT5G11880 AT2G01140 AT5G03300 AT5G58290 AT4G17870 AT4G38630 AT5G20890 AT1G64520 AT4G04950 AT5G16390 AT4G26840 AT3G25220 AT4G01940 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT2G43350 AT5G37640 AT1G76760 AT4G11740 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G75690 AT4G33010 AT1G07700 AT5G09810 AT5G02500 AT3G12500
GO:0044238	AT2G35500 AT5G22060 AT1G14810 AT5G42190 AT1G11840 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT5G11880 AT2G01140 AT1G79340 AT5G03300 AT5G58290 AT4G38630 AT5G20890 AT1G64520 AT5G16390 AT4G26840 AT3G25220 AT2G47180 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G64570 AT5G36210 AT5G37640 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G75690 AT4G33010 AT3G10740 AT5G02500
GO:0044237	AT2G35500 AT5G22060 AT1G14810 AT5G42190 AT5G61170 AT4G13430 AT1G51510 AT3G60370 AT5G08410 AT5G11880 AT2G01140 AT5G03300 AT5G58290 AT4G38630 AT5G20890 AT1G64520 AT5G16390 AT4G26840 AT3G25220 AT4G01940 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G37640 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G75690 AT4G33010 AT5G02500
GO:0050896	AT5G50850 AT1G17880 AT3G23830 AT5G27470 AT4G09010 AT1G11840 AT4G13430 AT3G12490 AT1G60710 AT2G01140 AT3G48000 AT4G17870 AT4G38630 AT1G64520 AT4G26840 AT2G47180 AT5G16970 AT5G62690 AT3G02540 AT2G43350 AT1G16030 AT3G12580 AT5G59890 AT4G33010 AT5G09810 AT5G02500 AT3G12500
GO:0043170	AT5G22060 AT5G42190 AT5G61170 AT1G51510 AT1G79340 AT5G58290 AT4G38630 AT5G20890 AT1G64520 AT4G26840 AT3G25220 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G64570 AT5G36210 AT5G37640 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT3G02090 AT1G75690 AT4G33010 AT5G02500
GO:0019538	AT5G20890 AT1G64520 AT4G26840 AT3G25220 AT5G22060 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G42190 AT5G61170 AT5G36210 AT5G37640 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G79340 AT5G58290 AT4G38630 AT5G02500
GO:0044267	AT5G20890 AT1G64520 AT4G26840 AT3G25220 AT5G22060 AT2G17200 AT5G24490 AT3G14290 AT1G11530 AT3G02540 AT5G42190 AT5G61170 AT5G37640 AT3G61110 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT1G75690 AT5G58290 AT4G38630 AT5G02500
GO:0042221	AT1G64520 AT2G47180 AT5G16970 AT5G62690 AT5G27470 AT4G09010 AT1G11840 AT4G13430 AT2G43350 AT3G12580 AT1G60710 AT2G01140 AT3G48000 AT4G33010 AT5G09810 AT4G17870 AT4G38630 AT5G02500 AT3G12500
GO:0006950	AT1G64520 AT4G26840 AT5G50850 AT2G47180 AT1G17880 AT5G16970 AT5G62690 AT3G23830 AT3G02540 AT4G09010 AT2G43350 AT1G16030 AT3G12580 AT2G01140 AT5G59890 AT5G09810 AT4G38630 AT5G02500 AT3G12500

GO:0010035	AT2G47180 AT5G16970 AT5G62690 AT5G27470 AT1G11840 AT4G13430 AT2G43350 AT3G12580 AT1G60710 AT3G48000 AT4G33010 AT5G02500 AT3G12500
GO:0009628	AT1G64520 AT4G26840 AT2G47180 AT1G17880 AT5G62690 AT3G23830 AT2G43350 AT3G12490 AT1G16030 AT3G12580 AT5G09810 AT4G38630 AT5G02500
GO:0009056	AT1G64520 AT5G37640 AT2G01140 AT5G58290 AT3G14290 AT3G02540 AT4G33010 AT5G42190 AT3G10740 AT5G64570 AT4G38630
GO:0046686	AT4G13430 AT3G12580 AT1G60710 AT5G16970 AT5G62690 AT3G48000 AT5G27470 AT4G33010 AT1G11840 AT5G02500 AT3G12500
GO:0006508	AT1G64520 AT5G36210 AT5G37640 AT1G79340 AT3G02090 AT5G58290 AT3G14290 AT3G02540 AT5G42190 AT4G38630
GO:0006457	AT5G20890 AT3G25220 AT1G29990 AT1G16030 AT3G12580 AT5G22060 AT1G75690 AT1G11530 AT5G02500
GO:0009057	AT1G64520 AT5G37640 AT5G58290 AT3G14290 AT3G02540 AT5G42190 AT3G10740 AT5G64570 AT4G38630
GO:0009408	AT1G64520 AT4G26840 AT1G16030 AT3G12580 AT2G47180 AT4G38630 AT5G02500
GO:0009607	AT1G64520 AT5G50850 AT3G12580 AT5G59890 AT4G38630 AT5G02500 AT3G12500
GO:0030163	AT1G64520 AT5G37640 AT5G58290 AT3G14290 AT3G02540 AT5G42190 AT4G38630
GO:0006979	AT2G43350 AT3G12580 AT2G47180 AT2G01140 AT5G16970 AT4G09010
GO:0046394	AT5G16390 AT2G35500 AT5G08410 AT5G11880 AT1G14810
GO:0045454	AT4G04950 AT1G76760 AT1G07700
GO:0044272	AT4G13430 AT5G08410 AT1G14810
GO:0000302	AT2G43350 AT3G12580 AT2G47180
GO:0009642	AT1G64520 AT3G12580 AT2G47180
GO:0051789	AT1G64520 AT4G38630
GO:0043248	AT1G64520 AT4G38630
GO:0048767	AT5G09810 AT4G38630
GO:0051788	AT1G64520 AT4G38630
GO:0045493	AT3G10740 AT5G64570
GO:0010383	AT3G10740 AT5G64570

## Anexo 8

**Anexo 8:** Proteínas exclusivas do tratamento categorizadas em cada processo biológico para o genótipo tolerante.

GO Revigo	PROTEÍNAS PERTENCENTES A CADA PROCESSO BIOLÓGICO
GO:0008152	AT5G19990 AT4G04640 AT3G58610 AT3G55260 AT4G26270 AT5G23250 AT3G01440 AT3G56070 AT5G66140 AT4G37000 AT5G08570 AT4G15530 AT4G17830 AT5G08530 AT5G37850 AT4G14880 AT5G22800 AT5G54270 AT4G24620 AT4G34700 AT5G54600 AT3G04400 AT3G14290 AT3G58140 AT3G61470 AT3G03080 AT3G15730 AT5G54160 AT3G04770 AT5G15250 AT4G29120 AT5G22060 AT4G02280 AT4G35090 AT3G02870 AT4G22890 AT5G04590 AT5G08030 AT3G45310 AT5G56630 AT5G13980 AT5G28840 AT5G58290 AT3G16950 AT5G57040 AT5G18170 AT5G35170 AT5G66150 AT5G16570 AT5G25880 AT5G61580 AT4G29410 AT5G64570 AT5G65620 AT5G02780 AT5G10160 AT3G02090 AT3G45140 AT4G13360 AT5G42800 AT5G04800
GO:0009987	AT5G19990 AT4G04640 AT3G58610 AT4G26270 AT3G01440 AT3G56070 AT5G66140 AT4G14960 AT4G37000 AT5G08570 AT4G15530 AT5G08530 AT5G37850 AT4G14880 AT5G22800 AT5G54270 AT4G24620 AT4G34700 AT5G54600 AT3G04400 AT3G14290 AT3G58140 AT5G65360 AT3G61470 AT5G02560 AT3G15730 AT3G12500 AT5G54160 AT3G04770 AT5G15250 AT5G40770 AT4G29120 AT5G22060 AT4G02280 AT4G35090 AT3G02870 AT4G22890 AT5G04590 AT5G08030 AT5G56630 AT5G10470 AT5G12250 AT5G28840 AT5G58290 AT5G03940 AT3G16950 AT5G35170 AT5G66150 AT5G25880 AT5G61580 AT4G29410 AT3G06720 AT5G07350 AT5G02780 AT5G10160 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT5G09810
GO:0044237	AT3G04770 AT5G19990 AT4G04640 AT5G15250 AT3G58610 AT4G29120 AT5G22060 AT4G02280 AT4G35090 AT4G26270 AT3G02870 AT3G01440 AT3G56070 AT4G22890 AT5G66140 AT4G37000 AT5G04590 AT5G08570 AT4G15530 AT5G08030 AT5G56630 AT5G08530 AT5G37850 AT5G28840 AT5G58290 AT3G16950 AT4G14880 AT5G22800 AT5G54270 AT5G35170 AT5G66150 AT4G24620 AT4G34700 AT5G25880 AT5G61580 AT5G54600 AT3G04400 AT3G14290 AT4G29410 AT3G58140 AT3G61470 AT5G02780 AT5G10160 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT3G15730 AT5G54160
GO:0044238	AT3G04770 AT5G19990 AT4G04640 AT5G15250 AT3G58610 AT4G29120 AT5G22060 AT4G02280 AT3G55260 AT4G26270 AT3G02870 AT3G56070 AT5G66140 AT5G08570 AT4G17830 AT5G08030 AT3G45310 AT5G56630 AT5G13980 AT5G28840 AT5G58290 AT4G24620 AT4G34700 AT5G25880 AT5G61580 AT5G54600 AT3G04400 AT3G14290 AT4G29410 AT5G64570 AT3G58140 AT5G65620 AT5G02780 AT5G10160 AT3G02090 AT3G45140 AT5G42800 AT5G04800 AT3G15730 AT5G54160
GO:0050896	AT5G17330 AT5G40770 AT4G35090 AT3G02870 AT3G56070 AT4G09010 AT4G14960 AT4G37000 AT5G04590 AT3G17020 AT5G37850 AT5G60640 AT5G12250 AT4G14880 AT5G18170 AT5G51830 AT5G23060 AT3G25800 AT4G27670 AT3G18190 AT5G07350 AT2G47710 AT5G63400 AT3G46970 AT3G45140 AT5G09810 AT3G15730 AT3G12500
GO:0044281	AT5G66150 AT4G04640 AT3G58610 AT5G25880 AT4G29120 AT5G61580 AT4G26270 AT3G02870 AT3G58140 AT5G08570 AT5G08030 AT5G56630 AT5G37850 AT5G28840 AT5G60640 AT3G04400 AT3G02870 AT4G29410 AT3G58140 AT5G37850 AT5G28840 AT5G14880 AT5G42800 AT4G14880 AT3G16950 AT5G54160 AT3G15730 AT5G22800 AT5G54160
GO:0044249	AT3G04770 AT4G04640 AT4G34700 AT3G58610 AT4G02280 AT5G54600 AT3G04400 AT3G02870 AT4G29410 AT3G58140 AT5G37850 AT5G28840 AT5G10160 AT3G45140 AT3G16950 AT5G42800 AT4G14880 AT5G04800 AT5G22800 AT5G54160
GO:0042221	AT5G51830 AT5G17330 AT5G40770 AT4G35090 AT5G23060 AT3G25800 AT3G56070 AT4G27670 AT4G09010 AT3G18190 AT5G07350 AT5G63400 AT5G60640 AT3G46970 AT3G45140 AT4G14880 AT5G09810 AT3G15730 AT3G12500 AT5G18170
GO:0006950	AT5G40770 AT4G35090 AT3G02870 AT4G27670 AT4G09010 AT4G14960 AT4G37000 AT5G04590 AT5G07350 AT2G47710 AT3G17020 AT5G37850 AT5G

	60640 AT3G46970 AT5G12250 AT3G45140 AT5G09810 AT3G12500 AT5G181 70
GO:0010035	AT5G51830 AT5G17330 AT5G40770 AT4G35090 AT5G23060 AT3G25800 AT 3G56070 AT4G27670 AT3G18190 AT5G07350 AT5G63400 AT3G46970 AT4G 14880 AT3G15730 AT3G12500 AT5G18170
GO:0010038	AT5G51830 AT5G17330 AT5G23060 AT3G25800 AT3G56070 AT3G18190 AT 5G07350 AT5G63400 AT3G46970 AT4G14880 AT3G15730 AT3G12500 AT5G 18170
GO:0009628	AT5G40770 AT4G35090 AT3G02870 AT4G27670 AT4G14960 AT5G04590 AT 3G17020 AT5G37850 AT3G46970 AT5G12250 AT3G45140 AT5G09810 AT5G 18170
GO:0009056	AT5G19990 AT5G15250 AT4G29120 AT5G61580 AT4G35090 AT4G26270 AT 3G14290 AT5G64570 AT5G66140 AT4G37000 AT5G08570 AT5G56630 AT5G 58290
GO:0005975	AT5G66150 AT4G24620 AT4G29120 AT5G61580 AT4G02280 AT3G55260 AT 4G26270 AT3G02870 AT5G64570 AT5G08570 AT5G08030 AT5G56630 AT5G 13980
GO:0042180	AT3G58610 AT5G25880 AT5G28840 AT5G10160 AT3G45140 AT3G02870 AT 3G16950 AT4G14880 AT3G15730 AT5G22800 AT3G58140
GO:0006082	AT3G58610 AT5G25880 AT5G28840 AT5G10160 AT3G45140 AT3G02870 AT 3G16950 AT4G14880 AT3G15730 AT5G22800 AT3G58140
GO:0044283	AT4G04640 AT3G58610 AT5G37850 AT5G28840 AT5G10160 AT3G45140 AT 3G02870 AT5G42800 AT4G14880 AT5G54160
GO:0044262	AT5G66150 AT5G08570 AT5G08030 AT4G24620 AT5G56630 AT4G29120 AT 5G61580 AT4G02280 AT4G26270 AT3G02870
GO:0006091	AT5G08570 AT4G04640 AT3G61470 AT5G56630 AT5G08530 AT5G61580 AT 4G26270 AT3G01440 AT4G22890
GO:0006508	AT5G19990 AT4G17830 AT3G45310 AT5G65620 AT3G02090 AT5G58290 AT 3G14290 AT5G66140
GO:0006066	AT5G66150 AT5G08570 AT5G08030 AT5G56630 AT4G29120 AT5G61580 AT 4G26270 AT3G02870
GO:0019318	AT5G66150 AT5G08570 AT5G56630 AT4G29120 AT5G61580 AT4G26270
GO:0016052	AT5G08570 AT5G56630 AT4G29120 AT5G61580 AT4G26270 AT5G64570
GO:0009266	AT5G04590 AT3G17020 AT5G12250 AT4G35090 AT3G02870 AT4G27670
GO:0009057	AT5G19990 AT5G15250 AT5G58290 AT3G14290 AT5G64570 AT5G66140
GO:0055114	AT4G04640 AT5G08530 AT5G25880 AT3G03080 AT4G22890
GO:0044257	AT5G19990 AT5G15250 AT5G58290 AT3G14290 AT5G66140
GO:0015979	AT4G04640 AT3G61470 AT3G01440 AT4G22890 AT5G54270
GO:0019684	AT4G04640 AT3G61470 AT3G01440 AT4G22890
GO:0051301	AT5G40770 AT5G10470 AT5G09810
GO:0042364	AT5G37850 AT5G28840 AT3G02870
GO:0007568	AT5G66170 AT4G27700 AT4G14880
GO:0006766	AT5G37850 AT5G28840 AT3G02870
GO:0019853	AT5G28840 AT3G02870
GO:0019852	AT5G28840 AT3G02870
GO:0090333	AT5G23060
GO:0071731	AT5G40770
GO:0007105	AT5G10470
GO:0000913	AT5G10470