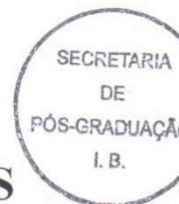


EDUARDO LEAL OLIVEIRA CAMARGO

**“INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA FORMAÇÃO E
QUALIDADE DA MADEIRA DE EUCALIPTO”**

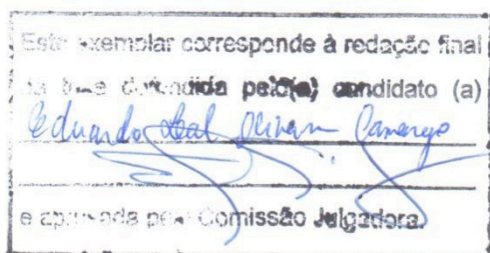
**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDUARDO LEAL OLIVEIRA CAMARGO

**“INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA FORMAÇÃO E
QUALIDADE DA MADEIRA DE EUCALIPTO”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

**CAMPINAS,
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C14i

Camargo, Eduardo Leal Oliveira, 1981-
Influência do nitrogênio na formação e qualidade da
madeira de eucalipto / Eduardo Leal Oliveira Camargo. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Eucalipto. 2. Madeira. 3. Nitrogênio. 4. RNA-
seq. 5. Transcriptoma. I. Pereira, Gonçalo Amarante
Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Influence of nitrogen fertilization on eucalypt wood formation and
quality

Palavras-chave em Inglês:

Eucalyptus

Wood

Nitrogen

RNA-seq

Transcriptome

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Helaine Carrer

Carlos Alberto Labate

José Antonio Bressiani

Marcelo Menossi Teixeira

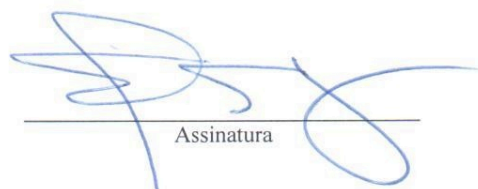
Data da defesa: 19-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 19 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



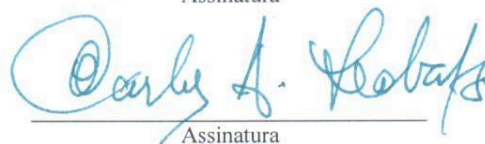
Assinatura

Profª. Dra. Helaine Carrer



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate



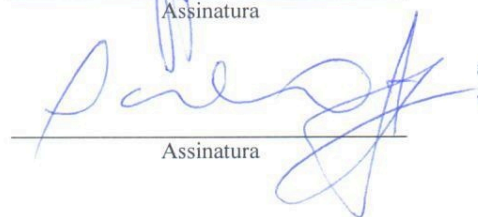
Assinatura

Dr. José Antônio Bressiani



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Assinatura

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Dra. Odalys Garcia Cabrera

Assinatura

Querida Vó Cyrilla,

durante todos esses anos...

pereebi o quanto da senhora há em mim,

o quanto seu exemplo me fez chegar até aqui!

A senhora está comigo hoje mais do que nunca!

Sei que hoje estaria muito orgulhosa...

*como forma de agradecimento, **lhe dedico** minha Tese de Doutorado.*

Aos meus pais Espídio e Elisabeth,

minhas irmãs Cláudia e Carolina

e minha querida madrinha Enid,

por todo apoio e amor incondicional,

pela paciência e confiança,

lhes ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me iluminou durante toda minha vida, por todos os caminhos escolhidos e percorridos que me levaram até aqui. Agradeço a Nossa Senhora, que intercedeu em resposta as minhas orações, seja em Fátima, Lourdes ou em qualquer lugar que passei durante esse período de aprendizado. Agradeço ao Sagrado Coração de Jesus, que desde pequeno tem sido aquele a quem recorro instintivamente, um amigo que me foi apresentado ainda nos primeiros dias de escola e que desde então me acompanha e acompanhará nas futuras escolhas.

Agradeço a minha família, mãe, pai, irmãs e tia Enid. Meu sucesso é o sucesso de vocês, assim como compartilhamos os fracassos, medos e situações impostas pela vida. Esse título nada mais é do que o resultado da base, dos ensinamentos e até mesmos das dificuldades que enfrentamos juntos. Obrigado por todo amor e confiança que sempre depositaram em mim!

Agradeço ao Gonçalo, que aceitou me orientar e possibilitou que realizasse a minha pesquisa. Obrigado por sempre confiar, mesmo quando eu, por qualquer contratempo, deixei de acreditar em mim e em meus resultados. Sua confiança muitas vezes me assustou, principalmente por sempre ter noção de minhas responsabilidades. Houve momentos que me questionei, que não aceitei... mas termino esse doutorado com a certeza que você me possibilitou crescer tanto como pesquisador quanto como pessoa, muito obrigado!

Agradeço à Jacqueline, profissional que eu sempre admirei! Quando escrevi para você imaginei que um dia poderia trabalhar e vivenciar um ambiente que sempre idealizei. Não esperava que além de dar um salto em minha formação iria conquistar uma amiga, uma família. Você Jacqueline, me impulsionou a acreditar em mim e em meus resultados, me proporcionou toda a infraestrutura que tinha disponível no seu laboratório e me garantiu o sucesso que hoje agradeço a tantas pessoas nessas páginas de agradecimento. Você foi essencial. A amizade cultivada se manteve forte entre oceanos, me transmitindo força e tranquilidade durante todo o processo de término desse doutorado. Eu consegui! Por te conhecer acho que o melhor agradecimento está no simbolismo desse documento, minha Tese de Doutorado!

Agradeço também...

Ao Prof. Carlos A. Labate e Mônica V. Labate pela amizade e orientação durante os anos de trabalho em conjunto, o que me proporcionou uma base científica e segurança para o desenvolvimento de meu doutorado.

À Eliane, que me recebeu, desde o primeiro dia, de braços abertos no laboratório e por sempre estar disposta a ajudar, ouvir e incentivar a todos. Saber que sempre poderíamos contar com você nos dava tranquilidade e segurança para continuar. Muito obrigado!

À Sula, amiga-irmã. Em muitos momentos de dificuldade ter te conhecido me fazia refletir que todas as escolhas que fiz valeram a pena! Obrigado pelo apoio, por sempre me lembrar o quanto sou especial e saber que sempre podia contar com você. Além de sempre poder desabafar e encontrar um reflexo das mesmas idéias e opiniões. Fico feliz de ter encontrado no doutorado uma pessoa como você, como encontrei durante meu mestrado, a próxima pessoa dessa lista de agradecimentos...

...à Fernanda, prego! Passamos por tantas coisas... e mesmos distantes ainda compartilhamos nossos medos, revoltas, momentos felizes... Você foi a principal incentivadora para eu mudar e tentar novos desafios como vir para Campinas, apresentar meu “projeto de doutorado”... muito obrigado Fer!

Ao Osmar/ Marmita/ Pinça, que foi o responsável por eu ter vindo para UNICAMP fazer meu doutorado. Obrigado pela amizade e apoio durante esses anos. Que bom que deu certo, e esse doutorado pode estreitar nossa amizade.

À Andréia por toda ajuda junto a pós-graduação BFM.

Aos grandes amigos Beça, Dani, Peteí, Sil e Desireé, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos e parceiros de trabalho no LGE Ana, Marcela, Jorge e Wesley.

À Laudiene pela amizade, confiança e orientação.

Aos amigos e parceiros de trabalho no LRSV Marçal, Nathalie, Jorge, Hua, Audrey, Mathieu, Hong, Malla, Sahar, Yves.

Aos amigos e demais integrantes do LGE.

À FAPESP pela bolsa de estudos e auxílio à pesquisa durante meu doutorado.

À International Paper do Brasil, em especial ao Luis Fernando, Adriano e Carla, pelo apoio e incentivo a pesquisa realizada.

À família e amigos que sempre torceram pelo meu sucesso.

À todos que de alguma forma contibuíram para essa Tese de Doutorado, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
LISTA DE FIGURAS	03
LISTA DE TABELAS	05
1 INTRODUÇÃO	07
2 PUBLICAÇÕES	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 O eucalipto	11
3.2 Qualidade da madeira	13
3.3 Regulação transcricional e formação da biomassa lignocelulósica.....	15
3.4 Influência do nitrogênio na formação e qualidade da madeira	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Material vegetal	23
4.2 Análises histológicas	24
4.3 Análises químicas	25
4.4 Análise da expressão gênica por RNA-seq	26
4.4.1 Extração do RNA total	26
4.4.2 Sequenciamento de RNA... ..	27
4.4.3 Construção do banco de dados de referência	27
4.4.4 Alinhamento dos <i>reads</i> e análise de expressão gênica.....	28
4.4.5 Validação por PCR em Tempo Real	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Experimento preliminar	31
5.2 Experimento para análise do transcrito	33
5.2.1 Efeitos da fertilização de N no crescimento e desenvolvimento.....	33
5.2.2 Análises histológicas	36
5.2.3 Análises químicas	38
5.2.4 Análise do RNA-seq	40
5.2.4.1 Extração do RNA total	40
5.2.4.2 Sequenciamento e construção do banco de dados de eucalipto.....	40
5.2.4.3 Determinação dos genes diferencialmente expressos	41
5.2.4.4 Genes induzidos por N- e/ou reprimidos por N+	44

5.2.4.5 Genes reprimidos por N ⁻ e/ou induzidos por N ⁺	49
5.2.4.6 As altas taxas de lignificação em condições deficientes de N são mantidas por um fluxo de NH ₄ ⁺ reciclado	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	67

RESUMO

O nitrogênio (N) é o principal macronutriente necessário para o desenvolvimento das plantas e acúmulo de biomassa. O gênero *Eucalyptus* é a principal fonte de biomassa para as indústrias de base florestal, principalmente a de papel e celulose. Suas altas taxas de crescimento, propriedades da madeira e repostas a manejo silviculturais tem grande potencial para utilização na geração de biocombustíveis e químicos. Neste novo cenário, a projeção é de uma crescente demanda de biomassa e, em função disso, é necessário associar novas estratégias aos programas de melhoramento genético, que resultem não somente no aumento da produtividade, como também na adequação de caracteres da qualidade da madeira. A qualidade da madeira depende de diversas propriedades do xilema secundário que são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, como a disponibilidade água e nutrientes. Neste estudo foi demonstrado que a fertilização nitrogenada causa alterações na formação e qualidade do xilema secundário de eucalipto. Plantas de um clone comercial de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* foram submetidas a adubações contrastantes de N. Análises histológicas de regiões caulinares demonstraram que a deposição de lignina foi reduzida pela fertilização em excesso de N, enquanto um aumento consistente foi observado nas plantas cultivadas em solução deficiente em N. Esses resultados foram corroborados por análises químicas. Pela análise de sequenciamento de RNA foram identificados 1.469 genes diferencialmente expressos e exibindo um padrão de expressão relacionado a quantidade de N disponível. Dentre esses destacam-se genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio e fenilpropanóides. Os resultados possibilitaram entender o mecanismos envolvidos na manutenção das altas taxas de lignificação sob deficiência de N, bem como apontar possíveis genes candidatos relacionados com a qualidade da madeira de eucalipto.

ABSTRACT

The nitrogen (N) is the main macronutrient required for plants development and biomass accumulation. The genus *Eucalyptus* is the principal source of biomass to forest industries, mainly to the pulp and paper. Their fast growth, valuable wood properties and ease of management have great potential to generate biofuel and chemicals. In this scenario, the projections lead to a high demand of biomass, resulting in the need to associate new strategies of genetic improvement programs, which results in a higher productivity with a better wood quality. The wood quality depends from many properties of secondary xylem that are influenced by genetics and environment factors, like water and nutrients availability. In this study, we demonstrate in *Eucalyptus* that N fertilization promotes changes on secondary xylem formation and quality. Plants from a commercial clone of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* were submit to contrasting N fertilizations. The histological analyses from stem regions demonstrate that lignin deposition were reduced by high N fertilization, whereas a consistent increased were observed on those cultivate at N deficient treatment. These results were corroborate by chemical analyses. By the RNA sequencing analyses, it was identified 1,469 differently expressed genes, exhibiting a N-dependent expression pattern. Between those are genes related to N and phenylpropanoid metabolisms. The results aloud us to understand the mechanism involved on the maintenance of the high rates of lignification under N depletion, and also to point some possible candidates genes involve on *Eucalyptus* wood quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A - Secção transversal da madeira de <i>Populus sp.</i> evidenciando o floema e xilema (A, B, C, D e E); B - Representação esquemática dos diferentes tipos celulares e estágios durante o desenvolvimento vascular. As barras representam os diferentes estágios de desenvolvimento. Adaptado de Hertzberg <i>et al.</i> (2001).....	16
Figura 2 -	Diagrama esquemático do modelo de regulação transcricional de biossíntese da parede celular secundária (Demura e Ye, 2010).....	17
Figura 3 -	Caracterização de plantas de <i>Arabidopsis</i> transgênicas que superexpressam os fatores de transcrição EgMYB1 e EgMYB2. Em vermelho células lignificadas em coloração com Floroglucinol-HCl.....	18
Figura 4 -	Corte transversal do caule de plantas de <i>Populus</i> submetidas a tratamentos de N, 0mM (a,d,g), 1mM (b,e,h) e 10mM (c,f,i). Pela coloração histológica dupla com Safranina – Azul de Astra (SREBOTNIK E MESSNER, 1994), observa-se um aumento da concentração de celulose (em azul) e uma diminuição da concentração de lignina (vermelho) (PITRE et al., 2007).....	21
Figura 5 -	Plantas de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivadas em casa de vegetação. a) Plantas submetidas à fertilização com diferentes concentrações de nitrogênio. b) Plantas induzidas a formação de madeira de tensão.....	32
Figura 6 -	Análise histológica do experimento preliminar. a) Coloração dupla de Safranina-O e Azul de Astra de cortes do caule de plantas submetidas a fertilização com nitrogênio em quantidades limitantes (i), controle (ii) e excesso (iii). Barra= 100um. b) Segmentos caulinares de plantas de eucalipto com e sem indução de madeira de tensão. A seta indica a localização da madeira de tensão. Barra= 1cm. c) Coloração dupla de Safranina-O e Azul de Astra de cortes do caule de plantas submetidas a formação de madeira de tensão. (i) Barra=100um. (ii)Barra= 50um.....	33
Figura 7 -	Efeitos de fertilizações contrastantes de nitrogênio no crescimento e desenvolvimento de plantas de eucalipto. Barra= 20 cm. a) Plantas representativas de cada tratamento. b) Gráficos referentes as medidas de altura e diâmetro de plantas de eucalipto submetidas a fertilizações com concentrações limitantes de N (N-) e em excesso (N+). c) Folhas retiradas do caule principal de plantas representativas de cada tratamento e em destaque, folhas dos tratamentos mais contrastantes (N- e N+). Barra maior= 20 cm, barra menor= 2 cm.....	35

Figura 8 -	Coloração com floroglucinol-HCl de cortes transversais do caule de plantas de eucalipto submetidas à fertilização com nitrogênio. Tratamentos N- (a,b), CT (c,d), N+ (e,f) e NO ₃ (g,h). Barra= 100µm..	37
Figura 9 -	Análise de microscopia eletrônica de varredura. a) Corte transversal do caule de uma planta de eucalipto submetidas à fertilização com nitrogênio; X=xilema, DX=xilema em desenvolvimento, CZ=zona cambial, B=casca, NT=celulas produzidas durante o tratamento, *área avaliada. b) Células submetidas a fertilização limitante em N (N-). c) Células submetidas a fertilizaçãocom N em excesso (N+).....	38
Figura 10 -	Resultado da análise das amostras de RNA dos tratamentos (N-, CT, N+ e NO ₃) no Bioanalyser (Agilent).....	40
Figura 11-	Construção do Banco de Dados de referência.....	41
Figura 12 -	Distribuição de todos os unigenes expressos (cinza) e dos genes diferencialmente expressos (preto) sob os valores de RPKM.....	43
Figura 13-	Análise dos genes diferencialmente expressos. a) Análise do componente principal. b) Agrupamento hierárquico de expressão: (I) genes induzidos em N- e/ou reprimidos em N+, (II) genes reprimidos em N- e/ou induzidos em N+.....	44
Figura 14-	Expressão de genes relacionados com a biossíntese de lignina por RT-qPCR e RNAseq.	46
Figura 15 -	Modelo proposto para manutenção das altas taxas de lignificação sob deficiência de N.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise química das plantas fertilizadas com tratamentos limitante e em excesso de N. O conteúdo da lignina total e Klason foram determinados por modelos de NIR-PLSR. A determinação dos monômeros S e G foi realizada por pirólise. Cada repetição corresponde a uma amostra composta de 5 plantas. As porcentagens foram calculadas por 20 mg de lignina/ 100 mg massa seca. Teste estatístico Anova: *, $P < 0.01$; ** $P < 0$	39
Tabela 2 -	Genes diferencialmente expressos induzidos em N- e/ou reprimidos em N+.....	48
Tabela 3 -	Genes diferencialmente expressos induzidos em N+ e/ou reprimidos em N+.....	51

1 INTRODUÇÃO

Uma característica inerente a todas as plantas é sua capacidade de produzir biomassa a partir do dióxido de carbono, energia solar, água e nutrientes, sendo os dois últimos importantes fatores limitantes para seu crescimento e desenvolvimento (Rennenberg & Schmidt 2010). Com a demanda global por fontes de energia, a biomassa vegetal se tornou a principal aposta para uma matéria-prima renovável e economicamente viável de produção de biocombustíveis e químicos (Carpita 2011; Séguin 2011; Mansfield et al. 2012). Os interesses se voltam agora para o entendimento dos mecanismos moleculares que controlam a produção de biomassa e consequentemente o aumento da produtividade e melhora da qualidade (Demura & Ye 2010). A produtividade de biomassa está relacionada a um grande número de fatores ambientais, como a eficiência de captura e conversão de energia solar, disponibilidade de água e nutrientes.

Dentre os nutrientes, o nitrogênio (N) é considerado o principal fator limitante para o crescimento e sequestro de carbono pelas árvores (Vitousek & Howarth 1991; Oren et al. 2001). A produção e aplicação de fertilizantes contendo N em culturas agrícolas e florestais consomem grande energia e investimentos (Xu et al. 2012). Os efeitos de N em árvores de rápido crescimento e produtividade são bem documentados, mas poucos estudos tem avaliado os efeitos de fertilizações nitrogenadas nas propriedades da madeira (Pitre et al. 2007a, b; Pitre et al. 2010; Euring et al. 2012; Li et al. 2012; Plavcová et al. 2012).

Esta questão é importante e oportuna uma vez que a madeira, uma das principais fontes de biomassa terrestre, é tradicionalmente utilizada por indústrias de base florestal, como a de papel e celulose, e será intensamente explorada em um futuro próximo para a produção de biocombustíveis e químicos em um contexto de desenvolvimento sustentável (Boudet et al. 2003). O gênero *Eucalyptus* surge como um

possível e potencial protagonista neste novo cenário. Seu rápido crescimento, elevada produtividade, ótimas propriedades de madeira, alta adaptabilidade a diversos tipos de solo, clima e facilidade de manejo, possibilitaram ao *Eucalyptus* e seus híbridos se tornarem o maior gênero florestal de madeira de lei plantado no mundo (Eldridge et al. 1993; Potts 2004). O *Eucalyptus* fornece matéria-prima de alta qualidade para papel, pasta celulósica, madeiramento e carvão (Grattapaglia & Kirst 2008); e ainda um grande potencial a ser explorado na produção de combustíveis de segunda geração (Mizrachi et al. 2012a, b). A principal limitação para utilização da madeira para produção de biocombustíveis está ligada a recalcitrância das paredes celulares secundárias a degradação, intimamente relacionada a sua estrutura e composição (Séguin 2011; Mizrachi et al. 2012a, b).

As paredes celulares secundárias são principalmente compostas por celulose, hemicelulose e lignina. A lignina é o segundo polímero mais abundante nas plantas, depositado principalmente nas paredes de fibras e vasos (Zhong & Ye 2009). Ela é produzida a partir da polimerização desidrogenada de três diferentes álcoois hidroxicinâmicos (cumaril, coniferil e sinapil) que se diferem pelo grau de metoxilação dos carbonos C₃ e C₅ do anel aromático (Baucher et al. 2003). A deposição desse polímero confere rigidez e proteção contra a degradação de microrganismos (Vanholme et al. 2010). Esta alta resistência à degradação é a principal limitação industrial, uma vez que a lignina impede a acessibilidade a celulose durante o processo de polpação (Kraft) assim como durante a sacarificação, passo essencial para a produção de etanol de segunda geração. A biossíntese de lignina é regulada transcricionalmente (Grima et al. 2012) e assim como os demais constituintes da parede celular, influenciada pelas condições ambientais.

Recentemente, muitos trabalhos tem demonstrado que não somente a quantidade, mas a qualidade da biomassa lignocelulósica, pode ser substancialmente

alterada pelo manejo do ambiente no qual determinada cultura é cultivada (Canam & Campbell 2009 e referências). Em *Populus*, a disponibilidade de N influenciou o crescimento e desenvolvimento de plântulas, bem como a xilogênese. A morfologia das fibras e conseqüentemente a estrutura e composição das paredes celulares secundárias foram modificadas em resposta a alta fertilização (Pitre et al. 2007a; Plavcová et al. 2012; Li et al. 2012), incluindo o padrão de lignificação (Pitre et al. 2007b; Euring et al. 2012; Li et al. 2012). O padrão de expressão foi analisado por microarranjos de cDNA e indicou efeitos sobrepostos entre árvores submetidas a adubação nitrogenada e indução de madeira de tensão (Pitre et al. 2010), bem como possibilitou a identificação de genes potencialmente envolvidos com caracteres estruturais e hidráulicos do xilema (Plavcová et al. 2012). Outros trabalhos envolvendo cruzamentos e análises genéticas de híbridos de *Populus* demonstraram que a adubação nitrogenada aumentou o crescimento, bem como a quantidade de celulose e hemicelulose da madeira, com um decréscimo no conteúdo de lignina. Uma correlação negativa entre crescimento e quantidade de lignina foi observada em populações de híbridos de *Populus* (Novaes et al. 2009, 2010), e *Eucalyptus* (Kirst et al. 2004).

Dentre todas as práticas de manejo cultural utilizadas no campo e capazes de promover alterações na qualidade da madeira, a manipulação da disponibilidade do N desponta como uma promissora estratégia para o ganho em quantidade e qualidade da biomassa lignocelulósica produzida (Canam & Campbell 2009). Este trabalho teve como principal objetivo os efeitos da disponibilidade de N na formação e qualidade da madeira de eucalipto. Partindo da hipótese de que alterações seriam provocadas no xilema secundário, plantas de um híbrido comercial de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* foram submetidas a fertilizações contrastantes de N. Observações fenotípicas foram complementadas por análises histológicas e químicas do tecido xilemático e o RNA total do xilema em desenvolvimento foi submetido a sequenciamento.

2 PUBLICAÇÕES

2.1 Publicação diretamente relacionada ao trabalho:

Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*.

Eduardo Leal Oliveira Camargo, Leandro Costa do Nascimento, Marçal Soler, Marcela Mendes Salazar, Jorge Lepikson-Neto, Wesley Leoricy Marques, Ana Alves, Paulo José Pereira Lima Teixeira, Piotr Mieczkowski, Marcelo Falsarella Carazzolle, Yves Martinez, Ana Carolina Deckmann, José Carlos Rodrigues, Jacqueline Grima-Pettenati, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Artigo submetido à publicação. (ANEXO 1).

2.2 Publicações em co-autoria:

Transcriptional Regulation of the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights.

Jacqueline Grima-Pettenati, Marçal Soler, **Eduardo Leal Oliveira Camargo**, Hua Wang. *In Advances in Botanical Research*, 61 (2012) eds L. Jouanin & C. Lapierre, pp. 173-218. Academic Press, Burlington. (ANEXO 2).

Identification of four *Eucalyptus* genes potentially involved in cell wall biosynthesis and evolutionarily related to SHINE transcription factors.

Wesley Leoricy Marques, Marcela Mendes Salazar, **Eduardo Leal O. Camargo**, Jorge Lepikson-Neto, Ricardo Augusto Tiburcio, Leandro Costa do Nascimento, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. *Plant Growth Regulation* (2012), september. (ANEXO 3).

Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription–pcr analysis of gene expression in organs and tissues of *Eucalyptus* grown in various environmental conditions.

Hua Cassan-Wang, Marçal Soler, Hong Yu, **Eduardo Leal O. Camargo**, Victor Carocha, Nathalie Ladouce, Bruno Savelli, Jorge A. P. Paiva, Jean-Charles Leplé, Jacqueline Grima-Pettenati. *Plant Cell Physiology* (2012), 53(12): 2101-2116. (ANEXO 4).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O eucalipto

O *Eucalyptus* é o maior gênero florestal de madeira de lei plantado no mundo, ocupando mais de 18 milhões de hectares (Myburg et al. 2007). O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália mas hoje pode ser encontrado em mais de 90 países, onde é utilizado para os mais diversos fins como madeira, carvão, papel, celulose, óleos essenciais etc (Doughty 2000). Pertencente a família *Myrtaceae*, o gênero possui cerca de 700 espécies e híbridos adaptadas a diversas condições de clima e solo (Brooker 2000). Estas apresentam várias características favoráveis para a produção de madeira como facilidade de propagação vegetativa, crescimento rápido, alta produtividade, boa forma de fuste, ótimas propriedades de madeira, alta adaptabilidade e boa resposta a tratamentos culturais de manejo e ao melhoramento genético (Eldridge et al. 1993; Potts 2004).

No Brasil, o plantio do eucalipto foi implantado em 1909 pelo engenheiro agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, então funcionário da Cia. Paulista, para utilização na fabricação de dormentes. Com o passar do tempo e resposta a investimentos de empresas privadas e universidades, a eucaliptocultura consolidou-se e hoje o setor florestal brasileiro exerce papel de destaque no comércio mundial. Em 2011, a produção brasileira de celulose alcançou 14 milhões de toneladas e a de papel 9,9 milhões de toneladas. Segundo pesquisas de institutos internacionais, o Brasil passou da 4ª para a 3ª posição como produtor mundial de celulose total e o 11º maior fabricante de papel (ABRAF 2012).

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

diferentes condições ambientais (Kageyama, 1980). Com espécies mais adaptadas, o melhoramento florestal passou a buscar o aumento da produtividade volumétrica da madeira a cada ciclo de seleção, sem com isso, comprometer a base genética da população (Menk 1989). Com o sucesso desses esforços, hoje a produtividade dos plantios comerciais de eucalipto no Brasil passou de 12 m³/ha.ano para uma média de 41 m³/ha.ano (ABRAF 2012).

Mesmo com toda a contribuição do melhoramento genético do eucalipto para a formação de florestas altamente produtivas, ainda existem características inerentes à biologia das árvores que dificultam esse processo. Entre elas estão: longo ciclo de vida, porte, maturação tardia, polinização cruzada, alta complexidade da análise dos descendentes após cruzamentos e retrocruzamentos, dificuldade de obtenção de ganhos significativos para caracteres complexos (concentração de lignina e celulose) e necessidade de grandes áreas para plantios experimentais (Valverde et al., 2007; Campbell et al., 2003).

Assim novas tecnologias vem sendo cada vez mais empregadas com o intuito de se alcançar progressos de forma rápida, manipular e estudar caracteres até então desconhecidos ou que não podiam ser manipulados através do emprego das técnicas de melhoramento convencional. Os primeiros trabalhos sobre aplicação de técnicas de biotecnologia nas angiospermas está concentrada no gênero *Populus*, que de maneira equivalente ao *Eucalyptus* no Brasil, assume importância econômica fundamental na indústria de base florestal de vários países europeus, caracterizados pela sólida estrutura de pesquisa. O gênero *Populus* é considerado uma espécie modelo para arbóreas, principalmente por ter seu genoma sequenciado e disponível. O genoma do *Eucalyptus grandis* foi recentemente sequenciado e disponibilizado para consulta, o que projeta um futuro muito promissor para o gênero. Até então os trabalhos se baseavam

em coleções de sequências expressas (ESTs), na sua grande maioria não disponibilizados para a comunidade científica.

Dentre os trabalhos realizados com *Eucalyptus* pode-se citar a construção de transgênicos (González et al., 2002), a identificação e clonagem de genes (Poke et al., 2003; Goicoichea et al. 2005; Legay et al. 2007, 2010), otimização de protocolos de regeneração em cultura de tecidos (Dibax et al. 2005), estudos de expressão gênica por *microarrays*, *SAGE*, bibliotecas subtrativas, sequenciamento de ESTs (Paux et al. 2004, 2005; Carvalho et al. 2006; Rengel et al. 2010), análise proteômica (Celedon et al. 2007; Bedon et al. 2012) e o sequenciamento de nova geração (Novaes et al. 2008; Mizrachi et al. 2010)

3.2 Qualidade da madeira

De acordo com Shimoyama (1990), qualidade da madeira refere-se à sua adequação para um determinado uso ou à sua capacidade de preencher os requisitos à fabricação de um dado produto. Este pode ser afetado por características como densidade, rigidez, estabilidade, presença de nós, cerne, bolsas de resina, teor de lignina, teor de extrativos e outros. Assim, conhecendo-se a qualidade da matéria-prima e o processo a ser utilizado, é possível obter a otimização de ambos e do produto final.

A madeira destinada à produção de celulose e papel deve apresentar alto conteúdo de celulose, elevada proporção relativa de fibras e baixo teor de lignina e extrativos, visando diminuir o custo de produção e aumentar a qualidade do produto final (Pot et al., 2002). Para a produção de biocombustíveis as mesmas características são válidas, uma vez que a lignina impede a acessibilidade à celulose, necessitando de pré-tratamentos e diminuindo a eficiência e rendimento (Séguin et al. 2011; Mizrachi et al. 2012a, b). Entretanto, a maioria dessas características é produzida pela ação

conjunta de outros caracteres que influenciam a composição química, física e anatômica da madeira.

Celulose e hemiceluloses representam quase a totalidade de polissacarídeos que compõem a parede celular em células do xilema secundário (Higuchi 1997). Lignina é o terceiro mais abundante componente destas células. Geralmente, as árvores angiospermas apresentam de 42 a 50% de celulose, 25 a 30% de hemiceluloses, 20 a 25% de lignina e 5 a 8% de extrativos (Fengel & Wegener, 1984).

A celulose é um polissacarídeo fibrilar, formado pela união de moléculas de β -glicose através de ligações β (1,4) glucosídicas. A unidade básica do polímero é o dissacarídeo celobiose, cujas unidades de glicose apresentam um ângulo de rotação de 180° . A estrutura em forma de microfibrila surge da justaposição de, aproximadamente, 36 cadeias de celulose adjacentes e da formação de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila que se projetam para ambos os lados de cada cadeia (Delmer & Amor 1995; Somerville 2006). As hemiceluloses constituem-se de uma mistura de polissacarídeos heterogêneos. Estes polímeros estabelecem pontes de hidrogênio com as microfibrilas de celulose associando-se entre si e estabilizando assim, as paredes celulares.

A lignina é um dos componentes mais característico da parede celular secundária (FUKUDA, 1996). As ligninas são heteropolímeros de cadeias aromáticas racêmicas complexas, que provêm de três monômeros de álcool hidroxicinâmico (*p*-cumarílico, *p*-coniferílico e *p*-sinapílico) que variam de acordo com o grau de metilação (FREUDENBERG e NEISH, 1968). Quando esses monômeros são incorporados ao polímero produzem, respectivamente, unidades de *p*-hidroxifenil H, guaiacil G e siringil S de fenilpropanóides.

3.3 Regulação transcricional e formação da biomassa lignocelulósica

A formação da madeira (xilogênese), principal fonte de biomassa lignocelulósica, é a principal característica que diferencia árvores perenes de plantas herbáceas anuais e resulta do contínuo crescimento secundário do meristema cambial. Atualmente, além de sua importância econômica, a biomassa lignocelulósica é apontada como principal agente fixador de carbono, contribuindo para a redução dos excessos de CO₂ atmosférico e consequentemente o aquecimento global.

Apesar da importância econômica, existe pouco conhecimento sobre os fatores genéticos envolvidos na formação da madeira (Plomion et al. 2001; Déjardin et al. 2010), principalmente aqueles envolvidos na regulação transcricional da biossíntese dos principais constituintes da parede celular secundária (Demura & Fukuda 2007; Du & Groover 2010; Zhong et al. 2008; Grima-Pettenati et al. 2012 – ANEXO 2). O desenvolvimento do xilema secundário (Figura 1 A e B) pode ser dividido em cinco eventos sequenciais: divisão celular, alongação, biossíntese da parede celular, lignificação e morte celular programada (Chaffey 2002). Em cada fase, a expressão ordenada das famílias de genes é regulada por sinais ambientais e do desenvolvimento da planta, que influenciam a composição e a morfologia da parede celular das células do xilema, sendo assim, o fator mais importante na determinação das propriedades da biomassa lignocelulósica (Megraw 1985).

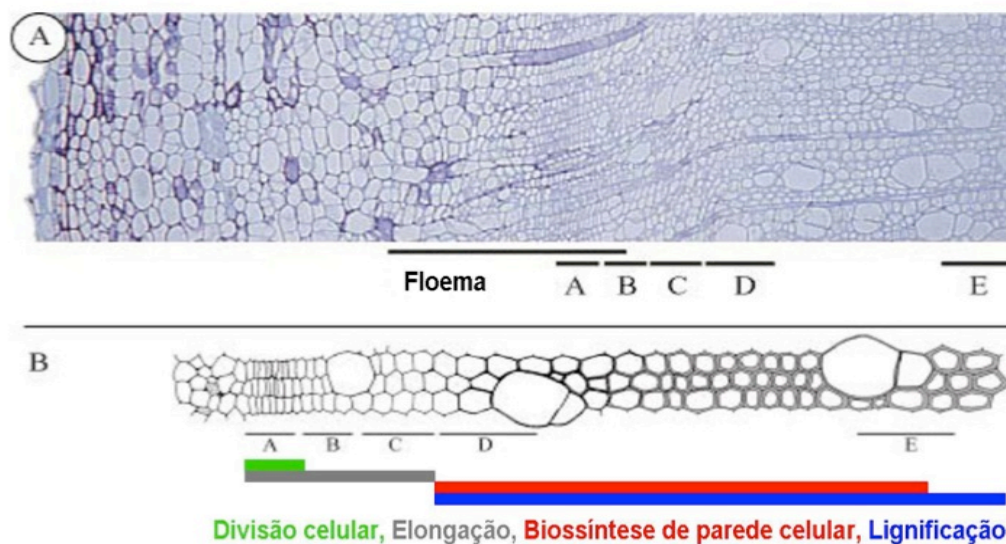


Figura 1: A - Secção transversal da madeira de *Populus sp.* evidenciando o floema e xilema (A, B, C, D e E); B - Representação esquemática dos diferentes tipos celulares e estágios durante o desenvolvimento vascular. As barras representam os diferentes estágios de desenvolvimento. Adaptado de Hertzberg *et al.* (2001).

Durante a diferenciação do xilema, as células se expandem longitudinalmente e radialmente até alcançarem seus tamanhos finais durante a formação da parede primária (Demura e Fukuda, 2007). Uma vez completa a expansão, a formação da parede secundária inicia-se, dirigida pela expressão coordenada de numerosos genes especificamente envolvidos na biossíntese de polissacarídeos (celuloses e hemiceluloses), ligninas, proteínas e compostos solúveis (flavonóides, taninos, terpenóides) e insolúveis (pectinas e proteínas da parede celular) (Higuchi, 1997). A expressão de fatores de transcrição é responsável pela coordenação da fina regulação espaço e temporal dos genes envolvidos nesse processo (Sivadon & Grima-Pettenati, 2004; Demura & Fukuda, 2007; Zhong & Ye, 2007).

Experimentos de análise do perfil transcricional de espécies modelo como *Arabidopsis* e *Populus* (Hertzberg *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2003; Schrader *et al.*, 2004; Ehrling *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005) identificaram muito fatores de transcrição

relacionados a expressão de genes envolvidos na biossíntese de celulose e lignina como membros da família MYB do tipo R2R3, bHLH, bZIP, HD-ZIP e NAC. A análise funcional de alguns desses fatores de transcrição forneceram as primeiras percepções de uma rede de regulação transcricional envolvida na biossíntese de parede celular secundária (Baucher *et al.*, 2007; Demura & Fukuda, 2007; Zhong & Ye, 2007; Zhong *et al.* 2007, 2008, 2010a, Zhang *et al.* 2011, Zhao & Dixon 2011). Atualmente, o principal modelo de regulação (Figura 2) envolve o fator de transcrição NAC denominado SND1/NST3 (*SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN 1*) e seus homólogos NST1, NST2, VND6 e VND7 (vasos-específicos) como o principal ativador da expressão de uma série de outros fatores de transcrição, como os do tipo MYB, responsáveis pela regulação da biossíntese de componentes específicos da parede celular secundária.

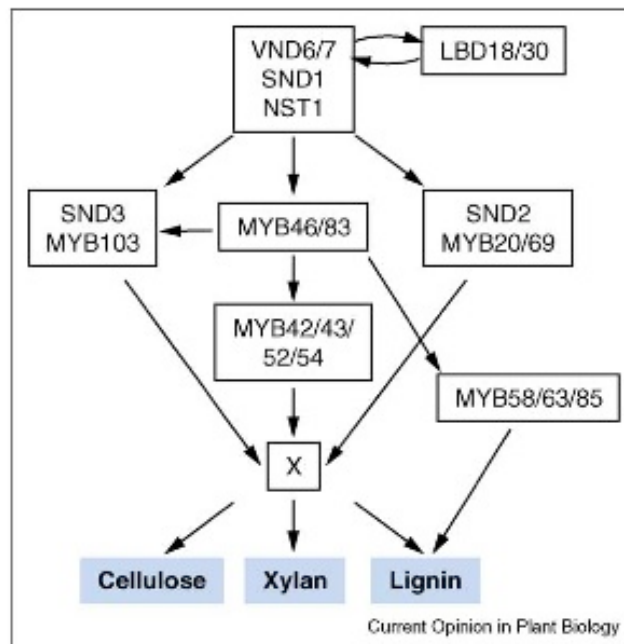


Figura 2: Diagrama esquemático do modelo de regulação transcricional de biossíntese da parede celular secundária (Demura & Ye, 2010).

Os MYB representam a maior família de fatores de transcrição de plantas (Riechmann e Ratcliffe 2000; Stracke *et al.* 2001; Wu *et al.* 2003; Yanhui *et al.* 2006;

Dubos *et al.* 2010). As funções das proteínas MYB foram investigadas utilizando-se estratégias genéticas e moleculares em inúmeras espécies vegetais como *Arabidopsis*, arroz, videira, *Populus* dentre outras. Concomitantemente, novos resultados foram obtidos nos mecanismos de controle de atividade dos fatores de transcrição MYB, além dos perfis de expressão gênica e genes-alvo terem sido determinados (Dubos *et al.* 2010). A principal classe de proteínas MYB é a do tipo R2R3, os quais estão envolvidos em inúmeras funções na planta, incluindo metabolismo primário e secundário, identidade celular, desenvolvimento e respostas a estresses. Em *Eucalyptus* dois fatores de transcrição EgMYB1 e EgMYB2 foram caracterizados (Figura 3) (Goicoechea *et al.* 2005, Legay *et al.* 2007, 2010). EgMYB2 é um ativador mestre da formação de parede celular secundária no xilema, conseqüentemente de biomassa lignocelulósica, sendo capaz de complementar o duplo mutante *atmyb46/atmyb83*, dois fatores de transcrição MYB de *A. thaliana*. Já EgMYB1 se comporta como um repressor da formação de parede secundária e ainda não possui descrito um gene ortólogo ou com função equivalente em *A. thaliana*.

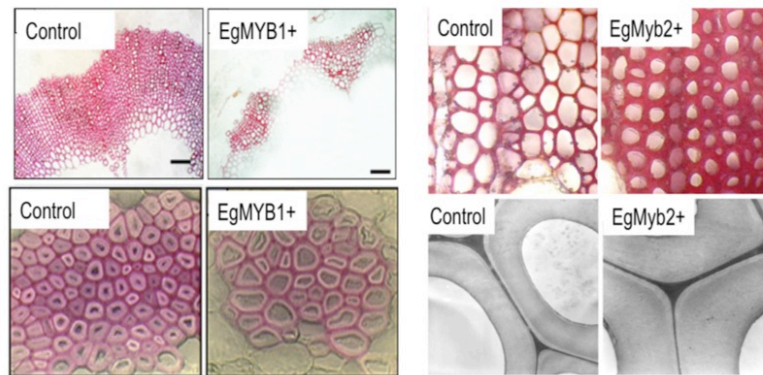


Figura 3: Caracterização de plantas de *Arabidopsis* transgênicas que superexpressam os fatores de transcrição EgMYB1 e EgMYB2. Em vermelho células lignificadas em coloração com Fluroglucinol-HCl.

3.6 Influência do nitrogênio na formação e qualidade da madeira

Técnicas de manejo com o objetivo de aumentar as taxas de crescimento e produtividade de plantações florestais têm recebido grande atenção (Heilman & Norby 1998; Macdonald & Hubert 2002). Muitos estudos já demonstraram que a utilização de fertilizantes nitrogenados, em viveiros e plantações florestais, pode proporcionar maiores taxas de crescimento e acumulação de biomassa em várias espécies, incluindo as de crescimento rápido como eucalipto (Borders et al. 2004; Brown et al. 2005; Martin & Jokela 2004; Smethurst et al. 2004; Samuelson 1998).

Segundo Silveira (2000), a maioria dos estudos mostra que a fertilização promove ganhos de produtividade, porém pouco se conhece sob seus efeitos na qualidade química, física, mecânica e anatômica da madeira de eucalipto. Em quase todos os estudos realizados o objetivo foi verificar o efeito da aplicação conjunta de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio) e fertilizantes nitrogenados, sem a preocupação de determinar os efeitos isolados ou as interações entre os nutrientes e a qualidade da madeira. Portanto não se tem uma avaliação concreta da influência dos nutrientes na formação e nas características físicas, mecânicas, anatômicas e químicas da madeira (Lima 2005).

Em solos de florestas nativas, o N é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento e seqüestro de carbono pelas árvores (Oren et al. 2001; Vitousek & Howarth 1991). A disponibilidade de N é fundamental e afeta a maior parte dos processos fisiológicos do desenvolvimento das plantas (Stitt 1999). A resposta das plantas ao nitrogênio pode ser observada desde células individuais quanto no organismo por inteiro (Paul & Foyer 2001).

A modulação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo de N foi muito investigada em *Arabidopsis thaliana* (Scheible et al. 1997, 2004; Wang et al. 2003, 2004), onde demonstrou-se que genes envolvidos no metabolismo de carbono estão

relacionados e são regulados pela disponibilidade de N (Palanchar et al. 2004). Puech et al. (2000) observaram que a fertilização com alta concentração de nitrogênio acelerou o desenvolvimento de árvores de *Populus* e sugeriram ainda que esta afetaria a maturação do xilema.

Pitre et al. (2007a) demonstraram que a disponibilidade de N afeta a formação da madeira, principalmente quanto à morfologia das fibras do xilema e a composição da parede celular. A estrutura da parede celular secundária de árvores de *Populus* expostas à alta concentração de N apresentou uma camada de espessamento interno semelhante à camada de celulose G induzida em madeira de tensão. Análises histológicas revelaram um enriquecimento de celulose e uma diminuição dos teores de lignina (Figura 4). Os mesmos autores demonstraram ainda um decréscimo acentuado na concentração de lignina, principalmente em árvores que além do excesso de N foram submetidas à formação de madeira de tensão (Pitre et al. 2007b). Posteriormente, o padrão de expressão foi analisado por microarranjos de cDNA e indicou efeitos sobrepostos entre árvores submetidas a adubação nitrogenada e indução de madeira de tensão (Pitre et al. 2010).

Novaes et al. (2009) relacionaram QTLs para composição química e produção de biomassa em *Populus* sob duas concentrações de nitrogênio, identificando regiões de controle genético em resposta às condições ambientais. Uma correlação negativa entre crescimento e quantidade de lignina foi observada em populações de híbridos de *Populus* (Novaes et al. 2009, 2010), e *Eucalyptus* (Kirst et al. 2004).

Recentemente, outros trabalhos tem abordado a influencia do N na qualidade da madeira de *Populus* (Plavcová et al. 2012; Li et al. 2012; Euring et. Al. 2012), possibilitando inclusive, a identificação de genes potencialmente envolvidos com caracteres estruturais e hidráulicos do xilema (Plavcová et al. 2012).

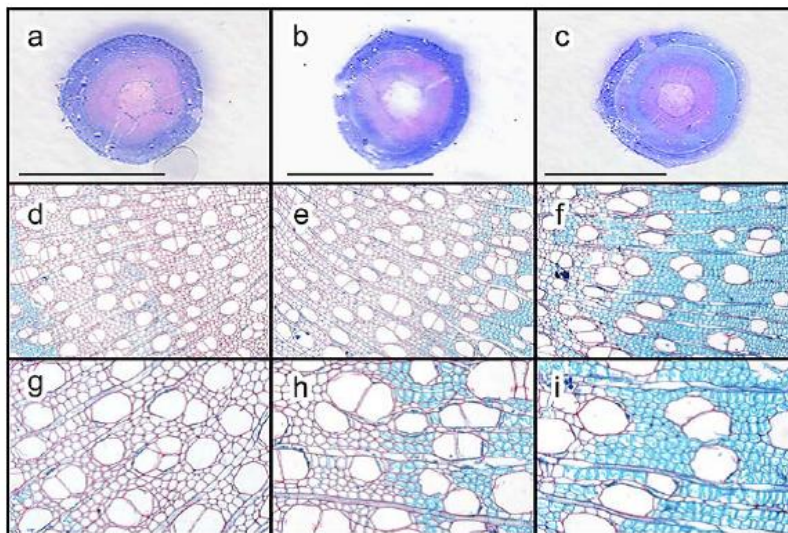


Figura 4: Corte transversal do caule de plantas de *Populus* submetidas a tratamentos de N, 0mM (a,d,g), 1mM (b,e,h) e 10mM (c,f,i). Pela coloração histológica dupla com Safranina – Azul de Astra (SREBOTNIK E MESSNER, 1994), observa-se um aumento da concentração de celulose (em azul) e uma diminuição da concentração de lignina (vermelho) (PITRE et al., 2007a).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foi plantas de um híbrido comercial de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (clone IPB2-H15), cedidas pela empresa International Paper do Brasil.

Um experimento preliminar foi realizado, no qual fertilizações contrastantes de N foram avaliadas junto a indução de madeira de tensão. Trinta plantas de seis meses de idade foram cultivadas em casa-de-vegetação e fertilizadas durante 30 dias com solução nutritiva (SARRUGE, 1975) ajustada para as concentrações finais de nitrogênio com NH_4NO_3 . Os tratamentos foram divididos em: CT (Controle), fertilizadas diariamente com solução nutritiva padrão com 15 mM de N; N- (Limitante), fertilizadas diariamente com solução nutritiva com 7,5 mM de N; N+ (Excesso), fertilizadas diariamente com soluções nutritivas com 30 mM de N. Amostras de segmentos caulinares foram retiradas ao final de 30 dias, fixadas em tampão FAA 50 (10% formaldeído, 5% ácido acético e 50% etanol) e mantidos em etanol 70% até a caracterização histológica.

Para o experimento submetido a sequenciamento de RNA, 240 plântulas com três meses de idade foram novamente cultivadas em casa de vegetação e fertilizadas durante 30 dias com as mesmas soluções nutritivas descritas anteriormente. Com o intuito de avaliar o potencial do NO_3 descrito em Fritz et al. (2006), um tratamento adicional de excesso de N foi realizado no qual plântulas foram fertilizadas diariamente com soluções nutritivas ajustadas para 30 mM de N com os sais KNO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Os caules tiveram suas cascas retiradas e para cada tratamento foram amostrados 3 *pools* contendo 20 plântulas (réplicas biológicas), congelados em

nitrogênio líquido imediatamente após coleta, e armazenados em ultra-freezer -80°C para posterior análise de sequenciamento mRNA (transcritoma). Para análises químicas 15 plântulas de cada tratamento foram armazenadas em freezer -20°C, sendo que dessas, 5 tiveram segmentos retirados, fixados em tampão FAA 50 e mantidos em etanol 70% até o momento das análises histológicas.

4.2 Análise histológica

Para o experimento preliminar, foi realizada a coloração dupla de Safranina-O e azul de Astra. Os segmentos caulinares foram desidratados e incluídos em paraplast (Sigma). Os cortes de 50 µm foram feitos como auxílio de micrótomo de deslize (MICROM HM320) e utilizados na confecção de lâminas permanentes. Após desparafinação em duas lavagens de 10 min em xilol, as lâminas contendo os cortes foram hidratadas em série decrescente de EtOH (100, 90, 80, 70, 50%) e coradas em solução alcoólica de Safranina-O por 20 min. Os cortes foram novamente hidratados em EtOH (50, 50, 50, 30%) e água destilada e corados em solução aquosa de Azul de Astra. Após a coloração, os cortes foram desidratados em série crescente de EtOH (30, 50, 70, 90, 100, absoluto%) e diafanizados em duas lavagens com xilol por 10 min. Em todas as etapas de hidratação e desidratação em EtOH os cortes foram mantidos por 1 min em cada solução. A visualização e registro das imagens foram realizados em microscópio ótico (OLYMPUS BX51) com câmera digital acoplada.

Para as análises realizadas com os segmentos caulinares do experimento submetido à RNAseq, estes foram reidratados em uma série decrescente de Água:EtOH (70, 50, 20 e 100%), sendo mantidos por pelo menos 6 hs em cada solução. Os cortes de 80 µm foram feitos como auxílio do aparelho Vibratome (LEICA VT 1000S) utilizando uma lâmina de safira.

Para a visualização das paredes celulares lignificadas, os cortes foram corados diretamente em reagente Weisner (phloroglucinol-HCL) e imediatamente submetidos à visualização e registro de imagens sob luz branca em microscópio (DM IRBE, Leica) acoplado a câmera CCD (DFC 300 FX, Leica). O tempo entre a coloração e o registro de imagens foi rigorosamente respeitado entre as diferentes amostras, uma vez que a coloração tende a enfraquecer e variar após alguns minutos. Cada corte foi individualmente corado e submetido à visualização, para que o tempo entre as análises não influenciassem na avaliação dos resultados.

Para os experimentos de microscopia eletrônica de varredura, os segmentos caulinares foram desidratados em EtOH e secos até o ponto crítico com CO₂. Os segmentos secos foram cobertos com ouro (gold-palladium 20nm) em um equipamento Jeol JFC1100 e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S450) à 15KV.

Os experimentos de microscopia do material utilizado na análise do transcrito por RNA-seq foram realizados na plataforma de microscopia e imagem (Plateforme Imagerie - Toulouse Réseau Imagerie, junto ao pesquisador Yves Martinez) durante estágio no laboratório “Plant Science Research Laboratory”, CNRS/UPS, Toulouse, France.

4.3 Análise química

Para realização das análises químicas, os 15 caules de cada tratamento foram agrupados em amostras compostas de 5 plantas, resultando em 3 repetições. Cada amostra foi liofilizada e moída em moinho de bola (Tecnal Ltda). O conteúdo de lignina (Total e Klason) foi determinado a partir de modelos preditos por infravermelho próximo (NIR) e regressão PLS (quadrados mínimos parciais). Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker-MPA equipado com esfera de integração. Os

espectros foram coletados com uma resolução de 8 cm^{-1} no intervalo de onda entre $12500 - 4000\text{ cm}^{-1}$. Cada espectro foi obtido como a média de 100 *scans* e obtiveram-se dois espectros por amostra. Os espectros das amostras foram analisados com modelos NIR-PLSR obtidos para a espécie *Eucalyptus grandis* com amostras provenientes da Argentina. Esses modelos apresentam estatísticas muito boas com RPD superior a 2,5. Para serem utilizados em programas de melhoramento, os modelos devem apresentar um RPD, razão entre o desvio padrão das amostras e o erro quadrático médio da validação externa, igual ou superior a 2.5 (Williams & Sobering 1993).

A análise de pirólise foi realizada em equipamento *CDS Pyroprobe 1000* conectado a um cromatógrafo a gás (Agilent 6890) com detector de ionização de chama a uma temperatura de 270°C . A pirólise foi realizada à 600°C por 5 s, utilizando-se 75 μg de material vegetal livre de extrativos. Todas as análises foram realizadas pelo pesquisador José Carlos Rodrigues do Centro das Florestas e Produtos Florestais, Instituto de Investigação Científica Florestal de Lisboa, Portugal; e utilizando procedimentos padrões do laboratório (Alves et al. 2006, 2011, 2012; Rodrigues et al. 1999, 2001).

4.4 Análise da expressão gênica por RNA-seq

4.4.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total do material vegetal foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Zeng & Yang (2002), seguindo algumas alterações propostas por Provost et al. (2007). As amostras de xilema mantidas em -80°C , foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de um almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 200 mg de cada amostra foram transferidos para tubos de 1.5 mL contendo o tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA, 2M de NaCl, 0,5 g/L espermidina, 2% β -mercaptoetanol adicionado no momento

do procedimento) previamente aquecido a 65°C. Após seguidas homogeneizações durante incubação a 65°C por 10 min, adicionou-se o mesmo volume da solução clorofórmio e álcool isoamílico (CIA, 24:1). Após centrifugação a 9.500g a temperatura ambiente por 10 min, repetiu-se a etapa para completa purificação. O RNA foi precipitado a partir da adição ao sobrenadante de ¼ do volume de 10M LiCl durante uma noite. No dia seguinte, após centrifugação a 9.000g a 4°C por 20 min, o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão STE (100mM de NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) e novamente purificado com uma lavagem com CIA. A precipitação final foi realizada com a adição ao sobrenadante de 100 µL 5M NaCl, 60 µL 3M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol a -20°C. Após 2 hrs a -20°C, centrifugou-se a 9.500g a 4°C por 20 min. Após secagem, o precipitado foi ressuspendido em H2O ultrapura e tratada com o reagente DEPC (dietil pirocarbonato).

O RNA total foi quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop) e a qualidade avaliada em Bioanalyser (Agilent), de acordo com as normas do fabricante. As amostras foram mantidas a -80°C e enviadas em gelo seco para o sequenciamento.

4.4.2 Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

O sequenciamento foi realizado em sequenciador *Illumina Genome Analyser IIX*, no *Center for Genome Sciences, School of Medicine, Department of Genetics, University of North Carolina*, Chapel Hill, Carolina do Norte, EUA. Para cada uma das bibliotecas (N-, CT, N+, NO₃⁻), 10 µg do RNA total foram utilizados e cada tratamento sequenciado em uma canaleta independente.

4.4.3 Construção do banco de dados de referência

O banco de dados de referência foi construído a partir de dois bancos públicos de *ESTs* (sequências expressas) de *Eucalyptus*, o *Eucatoul* (Rengel et al. 2009; Keller

et al. 2009) e o *Eucspresso* (Mizrachi et al. 2010), e uma montagem *de novo* com os *reads* de RNA produzidos. Todas as análises foram realizadas junto à equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão.

O banco *Eucatoul* contém 17,079 unigenes baseadas em sequencias relacionadas com a formação de madeira (Rengel et al. 2009) e tolerância ao frio (Keller et al. 2009). O *Eucspresso* contém 18,894 unigenes e consiste em um catálogo de genes expressos de um híbrido comercial de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (Mizrachi et al. 2010). Para eliminar possíveis sobreposições entre os dois bancos, todas as sequencias foram mapeadas junto ao genoma do *Eucalyptus grandis* disponível no site Phytozome (<http://www.phytozome.net/eucalyptus>) utilizando o programa EXONERATE (Slater & Viner 2005). As sobreposições foram descartadas utilizando o programa BEDTools (Quinlan & Hall 2010).

Para realização da montagem *de novo*, os *reads* produzidos pelo sequenciamento Illumina de todas as bibliotecas foram alinhados junto ao novo Banco de dados utilizando o programa SOAP2 (Li et al. 2009). O *reads* que não foram mapeados, foram utilizados para montagem *de novo* utilizando o programa Trinity (Grabherr et al., 2011).

Todos os unigenes foram automaticamente anotados pelo programa BLAST (Altschul et al. 1997) (e-value cutoff of 1e-5) contra Bancos de Proteínas incluindo: NCBI (NR), uniref (Suzek et al. 2000), pfam (Bateman et al. 2002) e kegg (Kanehisa & Goto 2000). Uma anotação funcional também foi realizada utilizando o programa BLAST2GO (Conesa et al. 2005).

4.4.4 Alinhamento dos reads e análise de expressão gênica

Os *reads* do RNA-Seq foram alinhados contra os unigenes gerados com o auxílio do programa SOAP2 (Li et al. 2009) configurado para permitir até 2 *mismatches*, descartar sequências com “N”s e retornar todos os alinhamentos corretos.

A expressão de cada gene foi calculada pelo valor de RPKM (*reads per kilobase of exon per million fragments mapped*) Esta medida leva em consideração não só o número de sequências alinhadas em determinado gene, como também o tamanho deste gene e o número total de sequências da amostra (Mortazavi et al. 2008).

Para o cálculo de RPKM, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{RPKM} = \frac{\text{número de sequencias alinhadas no gene}}{\frac{\text{número de sequencias mapeadas}}{(\text{em milhões})} \times \frac{\text{tamanho do gene}}{(\text{em milhares de bases})}}$$

Para determinação dos valores expressão dos genes presentes no transcrito das quatro bibliotecas, utilizou-se o programa DEG-seq (Wang et al. 2010) para normalização e análises estatísticas, considerando 99% de intervalo de confiança 99% (*cut-off of 0.01*) e fold-change $\geq 1,5$.

Após determinação dos genes diferencialmente expressos, estes tiveram seus valores de expressão transformados em $\log_2$ e submetidos à análise de agrupamento (*clustering*) no programa EXPANDER 6 (Ulitsky et al. 2010), para melhor visualização de padrões de expressão. Uma análise de componentes principais (PCA) também foi realizada com os valores de expressão transformados, permitindo uma representação gráfica da correlação entre as variáveis.

4.4.5 Validação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Para validar os resultados do sequenciamento de RNA, uma análise de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada nas triplicatas biológicas dos dois tratamentos mais

contrastantes (N- e N+). Cada amostra foi tratada com a enzima “Ambion’s Turbo DNA-free” (Ambion) para garantir que o RNA utilizado nas reações de qRT-PCR estivesse livre de contaminações com DNA. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o *kit* “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems), de acordo com as normas do fabricante. Os *primers* foram desenhados com base nas seqüências de nucleotídeos do genoma do *Eucalyptus grandis*, a partir do programa QuantPrime (<http://www.quantprime.de>) (Arvidson et al., 2008).

Os experimentos foram realizados na plataforma de genômica em Toulouse, França (<http://genomique.genotoul.fr/>) utilizando o equipamento Biomark® 9:96 Dynamic Array (Fluidigm Corporation) e analisados pelo método do CT comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Todos os procedimentos foram realizados como descrito em Cassan-Wang et al. (2012) (ANEXO 4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento Preliminar

Os primeiros resultados obtidos em *Populus* sob fertilização com alta concentração de N, demonstraram que a formação da madeira era influenciada, principalmente em relação a morfologia das fibras e a composição da parede celular secundária (Pitre et al. 2007a, b). Dentre as alterações descritas, foi observada a presença de uma camada interior a parede celular das células xilemáticas, muito semelhante à formada durante indução de madeira de tensão, na qual existe um espessamento da parede pela deposição de uma camada rica em celulose. Os autores sugeriram então que a adubação nitrogenada poderia estar relacionada a indução de mecanismos semelhantes, resultando em uma deposição homogênea de uma camada rica em celulose e conseqüentemente diminuição da quantidade de lignina.

Para avaliarmos inicialmente se os mesmos resultados poderiam ser encontrados em eucalipto, decidimos realizar um experimento preliminar avaliando o tecido xilemático de plantas de eucalipto submetidas a três diferentes concentrações de fertilização com N (limitante, controle, excesso). Além disso, foram adicionados outros três tratamentos onde plantas submetidas às mesmas diferentes concentrações de N foram induzidas a formação de madeira de tensão (limitante/tensão, controle/tensão, excesso/tensão) (Figura 5).

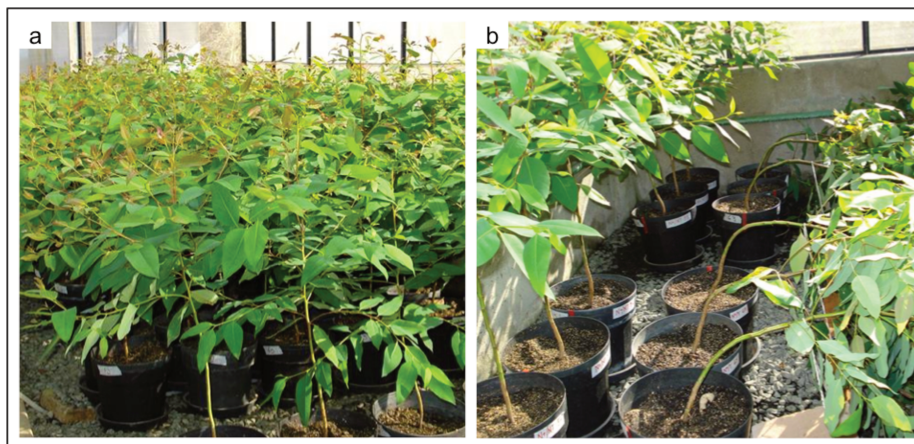


Figura 5. Plantas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* cultivadas em casa de vegetação. a) Plantas submetidas à fertilização com diferentes concentrações de nitrogênio. b) Plantas induzidas a formação de madeira de tensão.

As análises histológicas dos segmentos do caule das plantas submetidas as três diferentes concentrações de N, confirmaram os resultados obtidos em *Populus*. Pela coloração dupla de Safranina-O e Azul de Astra (Figura 6a), foi possível observar a presença de paredes mais lignificadas (coloração vermelha) nas plantas com concentrações limitantes de N (Figura 6a-i) quando comparadas com as plantas cultivadas em concentração normal (CT) e principalmente com as cultivadas em excesso de N (Figura 8a-ii e 8a-iii, respectivamente). O inverso foi observado em relação à coloração por Azul de Astra, onde as paredes não lignificadas são coradas e pode-se relacionar com a concentração de celulose. Nota-se que as plantas cultivadas sob excesso de N apresentam quase que a totalidade das células coradas em azul, com excessão às células das paredes dos vasos, que como esperado devem apresentar uma maior lignificação (Figura 6a-iii).

Em relação às plantas que receberam as diferentes concentrações de N junto a indução de formação de madeira de tensão, não foi observado nenhuma diferença significativa entres os tratamentos. Em todos os tratamentos houve a formação do tecido xilemático característico (Figura 6b), bem como a deposição de celulose cristalina do tipo G (Figura 6c-i e 6c-ii).

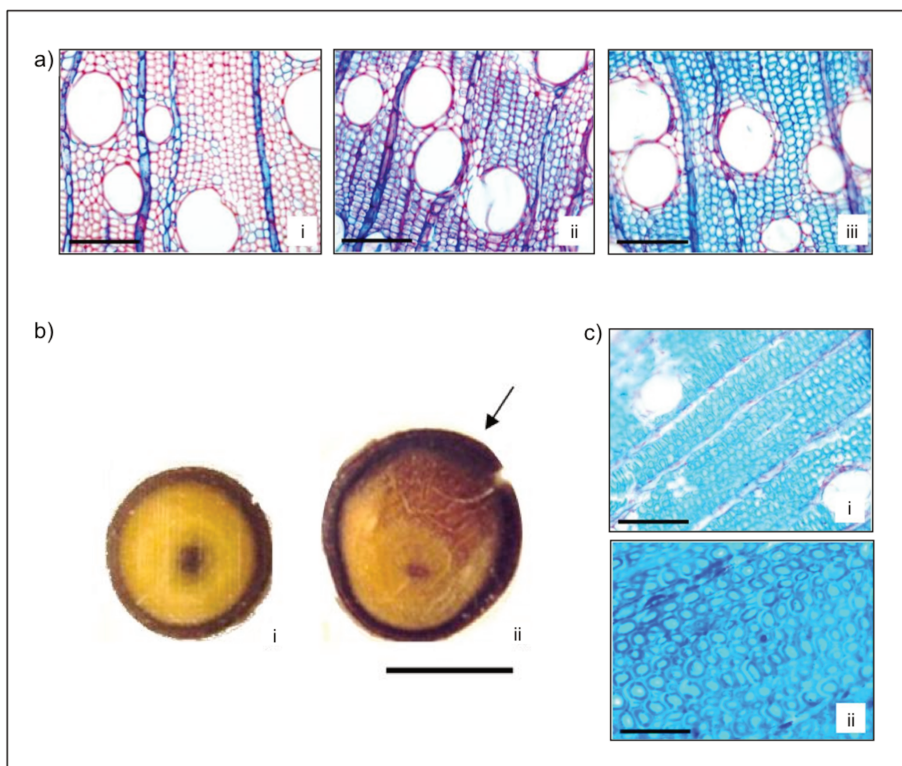


Figura 6. Análise histológica do experimento preliminar. a) Coloração dupla de Safranina-O e Azul de Astra de cortes do caule de plantas submetidas a fertilização com nitrogênio em quantidades limitantes (i), controle (ii) e excesso (iii). Barra= 100um. b) Segmentos caulinares de plantas de eucalipto com e sem indução de madeira de tensão. A seta indica a localização da madeira de tensão. Barra= 1cm. c) Coloração dupla de Safranina-O e Azul de Astra de cortes do caule de plantas submetidas a formação de madeira de tensão. (i) Barra=100um. (ii) Barra= 50um.

5.2 Experimento para análise do transcrito

5.2.1 Efeitos das fertilizações de N no crescimento e desenvolvimento.

Os efeitos da fertilização nitrogenada foram investigados em plantas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (clone IPB2-H15) submetidas a quatro tratamentos de nitrogênio (N): CT (fertilizados com solução nutritiva padrão), N- (fertilizados com solução nutritiva limitante em N), N+(fertilizados com solução nutritiva com N em excesso) e NO₃ (fertilizados com solução nutritiva com N em excesso e NO₃ como principal fonte de N). As plantas cultivadas sob os tratamentos mais contrastantes (N- e N+/NO₃) apresentaram as maiores diferenças no fenótipo (Figura 7). Na Figura 7a, é apresentada uma planta representativa de cada tratamento. As plantas cultivadas por

30 dias em solução contendo excesso de N apresentaram um aumento de 16% na altura e 20% no diâmetro quando comparadas com as cultivadas em solução limitante (Figura 7b). Os dois tratamentos de excesso de N (N⁺ e NO₃) contribuíram para o crescimento e desenvolvimento das plantas e não apresentaram diferenças significativas. Estes efeitos reafirmam as diferenças encontradas em *Populus* (Cooke et al. 2005; Pitre et al. 2007, 2010).

A coloração e dimensões foliares também foram influenciadas pela disponibilidade de N (Figura 7c). As plantas cultivadas em condições limitantes de N apresentaram folhas muito menores e mais claras quando comparadas com as cultivadas em excesso de N. Esta característica está intrinsecamente relacionada aos fenótipos provocados pela deficiência em N. A Figura 7c mostra uma imagem aproximada de folhas selecionadas e representativas dos tratamentos N⁻ e N⁺. As folhas de N⁺ apresentam uma coloração verde mais escura, indicando uma maior concentração de clorofila. A coloração avermelhada apresentada pelas folhas jovens das plantas cultivadas em condições deficientes de N corresponde ao acúmulo de antocianina, um indicador de condições de estresse. Em *Arabidopsis*, a indução da síntese de antocianina foi descrita como um mecanismo de adaptação em resposta ao estresse por N, e controlado pelo gene *NLA* (Peng et al. 2008).

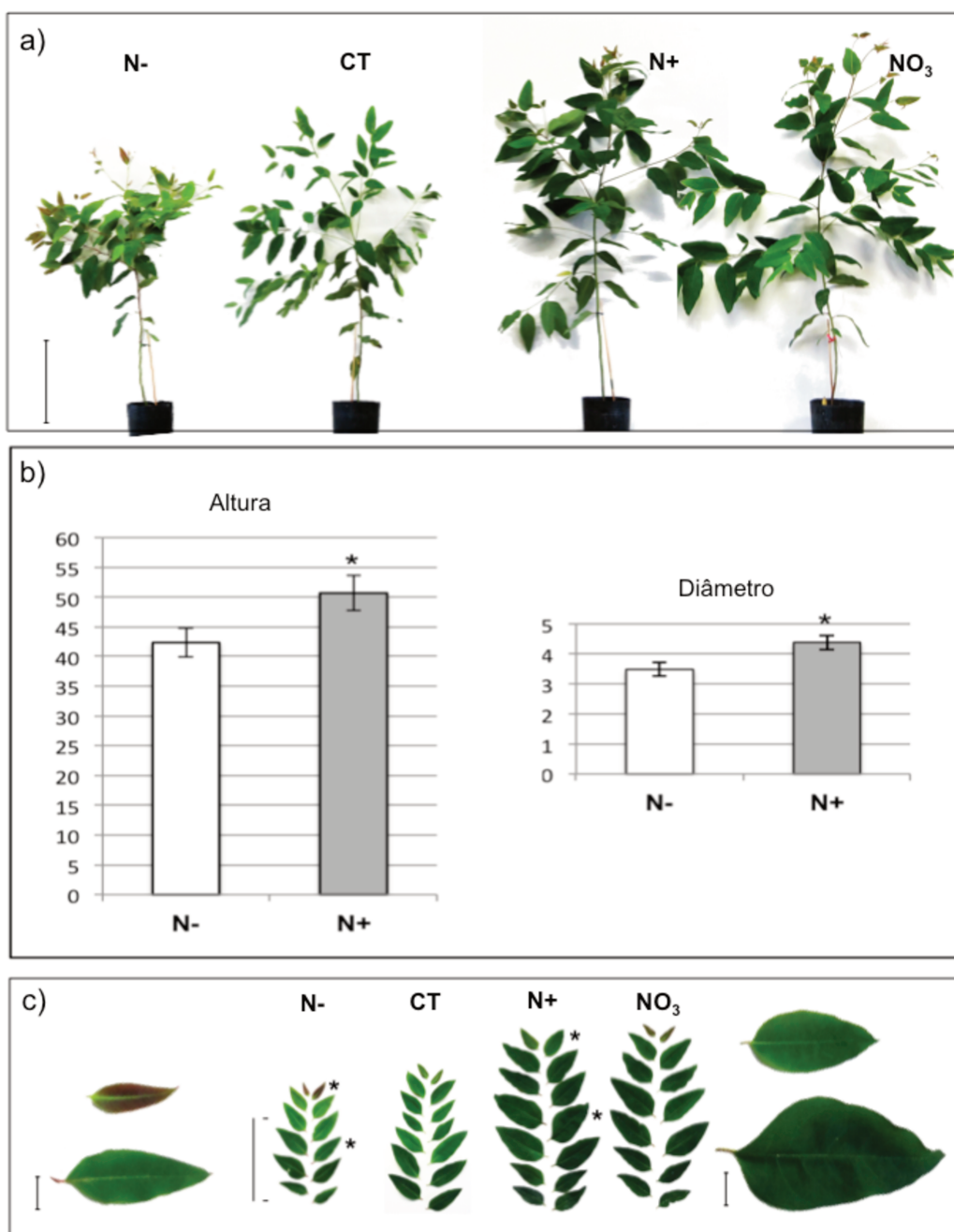


Figura 7. Efeitos de fertilizações contrastantes de nitrogênio no crescimento e desenvolvimento de plantas de eucalipto. Barra= 20 cm. a) Plantas representativas de cada tratamento. b) Gráficos referentes as medidas de altura e diâmetro de plantas de eucalipto submetidas a fertilizações com concentrações limitantes de N (N-) e em excesso (N+). c) Folhas retiradas do caule principal de plantas representativas de cada tratamento e em destaque, folhas dos tratamentos mais contrastantes (N- e N+). Barra maior= 20 cm, barra menor= 2 cm.

5.2.2 Análise histológica

O padrão de lignificação dos segmentos basais do caule de eucalipto foi avaliado a partir da coloração por reagente Weisner (phloroglucinol-HCL). A coloração com o reagente Weisner (phloroglucinol-HCL) é específica para paredes celulares lignificadas e é muito utilizada para avaliação do teor de lignificação de cortes histológicos, onde a intensidade da coloração pode ser considerada proporcional ao conteúdo de lignina.

Como evidenciado pela alta coloração vermelha, as células xilemáticas das plantas que cresceram sob condições limitantes de N (N-) apresentaram uma maior deposição de lignina (Figura 8a). Um padrão oposto foi observado nas plantas cultivadas em solução padrão e ainda mais acentuado naquelas cultivadas em condições de excesso de N (Figuras 8c,e,g; respectivamente). Nas plantas do tratamento N+/NO₃, a coloração vermelha se concentrou nas células ao redor dos vasos, enquanto as fibras do parênquima demonstraram uma baixa lignificação. Ambos os tratamentos de excesso de N (N+ e NO₃) apresentaram padrões similares, apesar de N+ a imagem evidenciar melhor o efeito observado (Figura 8e).

Células próximas a região cambial apresentam uma coloração mais fraca, ou ausência de coloração, uma vez que estas ainda estão passando por processos de formação e consequentemente não são lignificadas. Observações próximas a região cambial revelaram que as plantas do tratamento N+/NO₃ apresentavam uma região muito maior sem deposição de lignina (Figuras 8b,d,f,h), sugerindo que o excesso de N induzisse um atraso na lignificação das células xilemáticas. Esses resultados mais uma vez estão de acordo com os demonstrados em *Populus*, onde a alta fertilização com N diminui a deposição de lignina no xilema (Pitre et al. 2007b; Euring et al. 2012; Li et al. 2012).

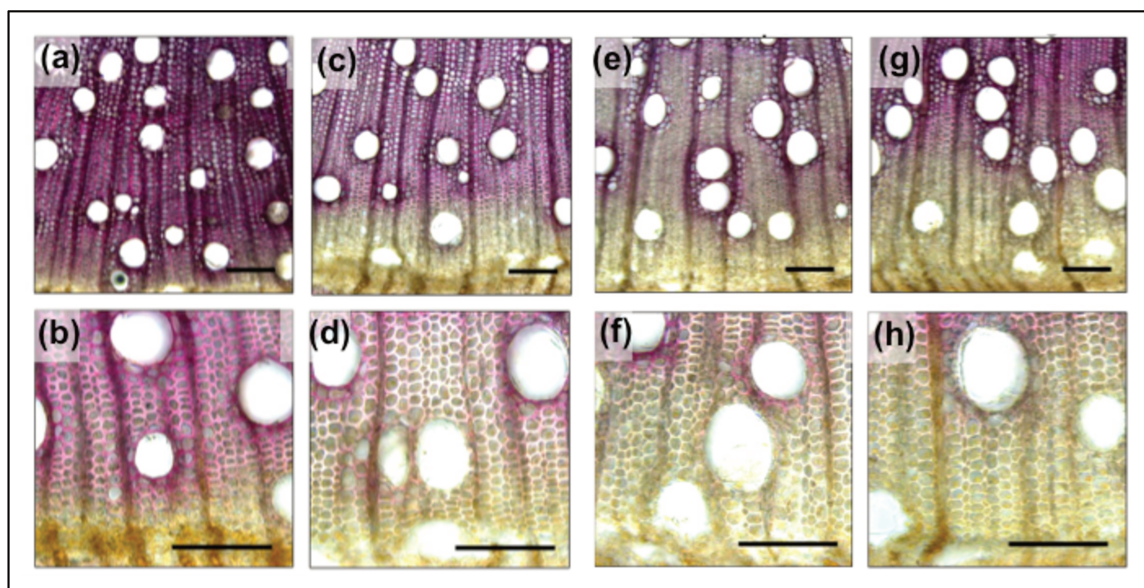


Figura 8: Coloração com floroglucinol-HCl de cortes transversais do caule de plantas de eucalipto submetidas à fertilização com nitrogênio. Tratamentos N- (a,b), CT (c,d), N+ (e,f) e NO_3 (g,h). Barra= 100 μm .

A análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 9) apresentou diferenças marcantes entre os tratamentos N- e N+. Todas as análises foram realizadas na região de xilema produzido durante o tratamento (Figura 9a). Os resultados demonstraram que as plantas sob adubação nitrogenada em excesso apresentam paredes celulares muito mais fracas (Figura 9c), evidenciado pela quantidade de células com paredes quebradas. Essa característica fica mais ainda evidente quando comparada com plantas suplementadas com N- (Figura 9b). Esse fenótipo pode ser relacionado com a menor presença de paredes lignificadas nas plantas tratadas com excesso de N, consequentemente mais fracas.

Plantas que apresentam paredes mais fracas estão mais suscetíveis a formação de madeira de tensão e, consequentemente, ao acúmulo de celulose tipo G (Plomion, Leprovost & Stokes 2001, Pilate et al. 2004a, b; Paux et al. 2005). Por se tratarem de plantas jovens de eucalipto, observamos em cortes de todos os tratamentos regiões onde células de tensão foram formadas. Nas plantas tratadas com excesso de N esse

fenótipo foi mais claro, mas em todos os casos concentrado em apenas uma região do caule. Em *Populus*, a deposição semelhante de uma camada de celulose G foi relacionada a fertilização em excesso de N, no entanto o fenótipo foi demonstrado em toda a extensão lateral dos caules das plantas tratadas (Pitre et al. 2007a). Portanto, nossos resultados demonstram que em eucalipto, a formação da madeira de tensão estaria relacionada ao estresse provocado por estímulos mecânicos, muito provavelmente em resposta ao maior crescimento das plantas do tratamento N+.

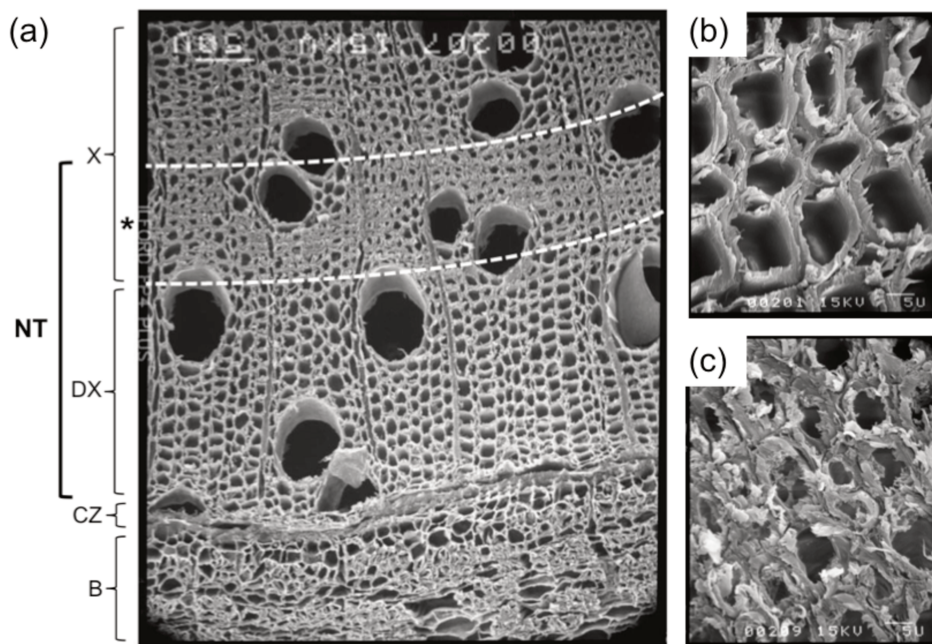


Figura 9: Análise de microscopia eletrônica de varredura. a) Corte transversal do caule de uma planta de eucalipto submetidas à fertilização com nitrogênio; X=xilema, DX=xilema em desenvolvimento, CZ=zona cambial, B=casca, NT=celulas produzidas durante o tratamento, * área avaliada. b) Células submetidas a fertilização limitante em N (N-). c) Células submetidas a fertilização com N em excesso (N+)

5.2.3 Análise química

As análises histológicas foram corroboradas pelas análises químicas do tecido xilemático das amostras referentes aos tratamentos mais contrastantes (N- e N+). A quantidade de lignina (total e Klason) foi estimada por modelos preditos em

infravermelho próximo (NIR) e regressão PLS (quadrados mínimos parciais). Os resultados são apresentados na Tabela 1. As quantidades tanto de lignina total quanto a da Klason foram significativamente reduzidas nas amostras xilêmicas das plantas fertilizadas com alta concentração de N, quando comparadas com as fertilizadas com quantidades limitantes. Interessantemente, a análise de pirólise revelou uma alteração entre a concentração dos monômeros entre os tratamentos. A razão S/G foi significativamente menor nas amostras do tratamento N+ (1,60) quando comparadas com as do tratamento N- (1,68). Esse decréscimo da relação S/G se deve principalmente a menor quantidade de unidades S, concomitantemente ao aumento das unidades G. Para indústria de papel e celulose, bem como na utilização em pré-tratamentos para produção de etanol de segunda geração, a razão S/G é considerada um importante fator, uma vez que as unidades S são mais facilmente retiradas durante o processo. Portanto, apesar de haver uma diminuição do teor total de lignina em resposta a adubação nitrogenada, esta acarreta em uma perda de qualidade de monômeros produzidas. Essa diferença entre a quantidade total de lignina e as diferenças entre os monômeros foi reportada em Pitre et al. (2007b).

Tabela 1. Análise química das plantas fertilizadas com tratamentos limitante e em excesso de N. O conteúdo da lignina total e Klason foram determinados por modelos de NIR-PLSR. A determinação dos monômeros S e G foi realizada por pirólise. Cada repetição corresponde a uma amostra composta de 5 plantas. As porcentagens foram calculadas por 20 mg de lignina/ 100 mg massa seca. Teste estatístico Anova: *, $P < 0.01$; ** $P < 0.001$

	NIR				Pirólise					
	Lignina total		Lignina Klason		N-			N+		
	N-	N+	N-	N+	S(%)	G(%)	S/G	S(%)	G(%)	S/G
R1	27.6	26.7	20.4	19.2	62.7	37.3	1.69	61.4	38.6	1.59
R2	28.0	26.4	21.0	18.8	62.3	37.7	1.65	61.7	38.3	1.61
R3	27.5	26.3	19.9	19.0	62.8	37.2	1.69	61.5	38.5	1.59
Média	27.7	26.5 **	20.4	19.0*	62.6	37.4	1.68	61.5	38.4	1.60**
Desvio	0.28	0.21	0.58	0.19	0.26	0.26	0.02	0.15	0.15	0.01

5.2.4 Análise do RNA-seq

5.2.4.1 Extração do RNA total

A qualidade das extrações de RNA foi verificada em equipamento Bioanalyser (Agilent). O *software* do equipamento analisa a integridade, pureza e ao final gera uma pontuação (RIN) para cada amostra (Figura 10). Uma nota RIN>7, atesta uma boa qualidade para o RNA, no caso das amostras submetidas ao RNA-seq, as amostras receberam as pontuações: N-= 9,0; CT= 8,8; N+= 9,0; NO₃= 8,1.

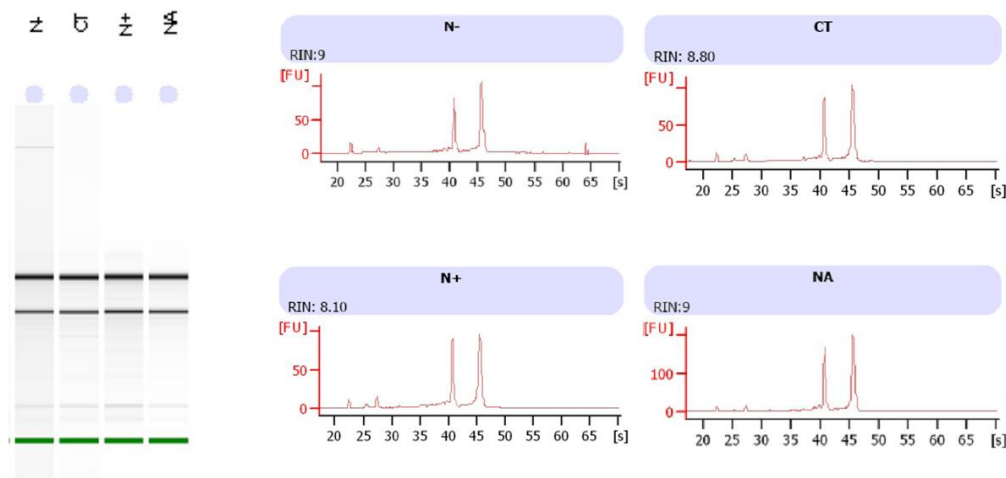


Figura 10: Resultado da análise das amostras de RNA dos tratamentos (N-, CT, N+ e NO₃) no Bioanalyser (Agilent).

5.2.4.2 Sequenciamento e construção do Banco de Dados de Eucalipto.

O sequenciamento das quatro bibliotecas referentes aos tratamentos de N resultou em mais de 123 milhões de reads de xilema de eucalipto, cada com 36pb. Após filtragem para exclusão de reads de baixa qualidade e ribossomais, 116.360.230 milhões foram utilizados nas análises.

Para realização do mapeamento dos reads um banco de dados preliminar foi construído a partir de dois bancos públicos de EST de eucalipto (Rengel et al. 2009; Keller et al. 2009; Mizrachi et al. 2010). As sobreposições entre os dois bancos foi submetida a uma filtragem, resultando em 21.582 sequencias.

Os *reads* produzidos pelo sequenciamento Illumina foram então alinhados a esse banco preliminar, resultando em um total de 92.317.189 *reads* mapeados (79,34% do total produzido pelo sequenciamento). O restante dos 24.043.041 *reads* não mapeados foram utilizados em uma montagem *de novo*, resultando em 15.199 contigs com tamanho maior que 200 pb. Quando comparados com o genoma do *E. grandis*, 14.909 contigs (98,09%) exibiram similaridade significativa (BLASTn, *e-value cutoff* de $1e-20$).

Os bancos públicos de *Eucalyptus* junto a montagem *de novo* possibilitaram a construção de um banco de referência com 36.781 *contigs* (Figura 11)

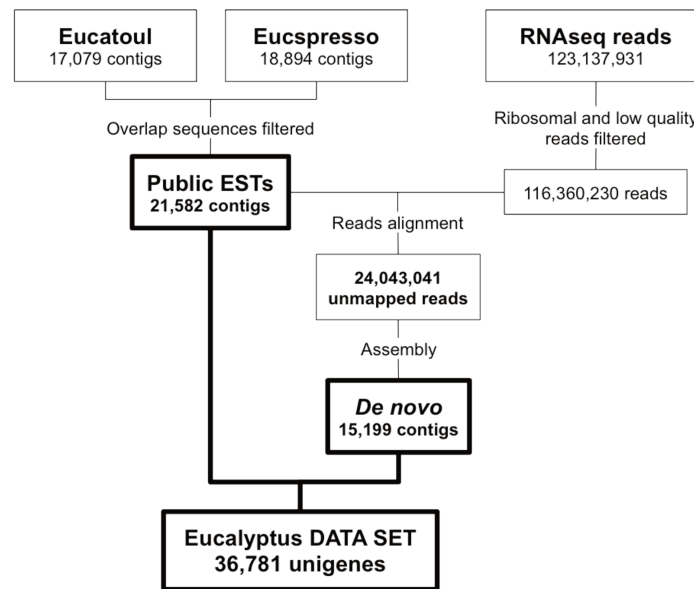


Figure 11. Construção do Banco de Dados de referência.

5.2.4.3 Determinação dos genes diferencialmente expressos.

Para determinação dos genes diferencialmente expressos, os *reads* de cada uma das bibliotecas referente a cada tratamento de N foi mapeado nos 36.781 unigenes de eucalipto. Os valores de RPKM foram calculados para cada tratamento,

considerando-se expressos aqueles que apresentaram valores ≥ 1 em pelo menos uma das bibliotecas e resultando em um transcrito composto por 34.925 genes (aproximadamente 95% do total de unigenes).

Para obter-se uma caracterização global dos genes diferencialmente expressos, comparações entre os tratamentos versus controle; e entre os tratamentos mais contrastantes (N- versus N+) foram realizadas. A última comparação resultou em um melhor padrão de expressão, onde 1.469 genes foram considerados diferencialmente expressos ($p \text{ value} \leq 0,01$; $\text{fold} \geq 1,5$).

A partir da comparação entre a distribuição dos valores de RPKM do transcrito (34.925 genes) e dos genes diferencialmente expressos entre N- vs N+ (1.469 genes), foi possível estabelecer três níveis de expressão entre os genes do xilema: genes com baixa expressão ($\text{RPKM} < 25$), expressão intermediária ($300 > \text{RPKM} \geq 25$) e alta ($\text{RPKM} \geq 300$). A distribuição dos genes diferencialmente expressos não acompanhou a mesma distribuição dos restantes dos genes do transcrito (Figura 12). A maior parte dos genes diferencialmente expressos encontra-se junto aos genes de expressão intermediária, enquanto em sua maioria os genes transcritos no xilema de eucalipto apresentam uma baixa expressão. Esse resultado sugere que as principais diferenças induzidas no xilema, estão relacionadas as genes de expressão intermediária e alta.

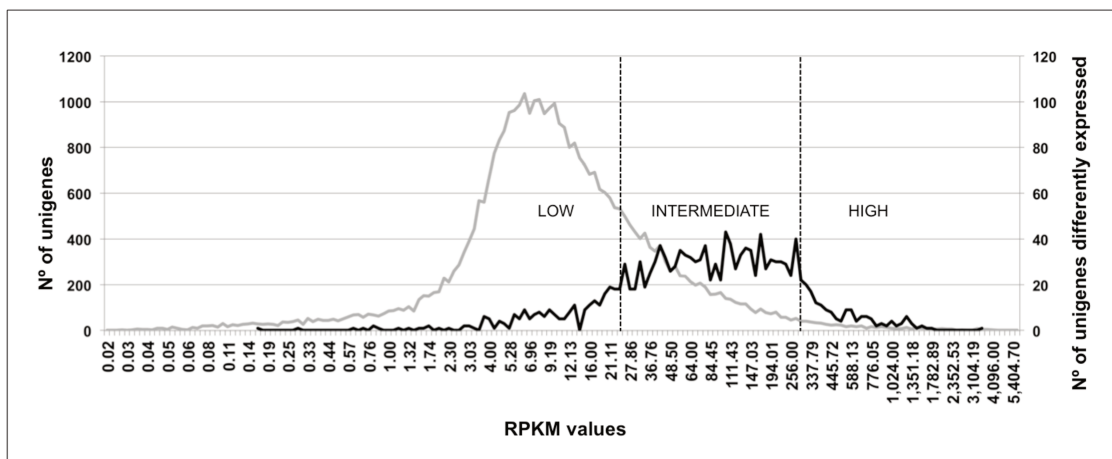


Figure 12. Distribuição de todos os unigenes expressos (cinza) e dos genes diferencialmente expressos (preto) sob os valores de RPKM.

Uma análise de componente principal (PCA) foi realizada com o intuito de se obter uma representação gráfica das principais variáveis relacionadas aos genes diferencialmente expressos (Figura 13a). Os dois tratamentos de excesso de N (N⁺ e NO₃) foram agrupados juntos e exibem uma forte correlação com o primeiro componente, explicando a 62% da variação dos dados. Em contraste, o tratamento limitante em N exibiu uma correlação negativa com o primeiro componente. Portanto, os genes diferencialmente expressos analisados exibem um padrão claro, onde os genes são induzidos em N⁺ e/ou reprimidos em N⁻; ou induzidos em N⁻ e/ou reprimidos em N⁺. A partir da análise de PCA foi possível verificar que os três tratamentos de N se diferenciam do tratamento controle, o qual exibiu uma correlação positiva com o segundo componente (25%). Este resultado sugere que apesar de diferentes e contrastantes, os tratamentos de excesso e deficiência de N causam alterações significativas quando relacionados ao controle, muito provavelmente ligadas a estresses promovidos pela salinidade e deficiência nutricional, respectivamente. Para finalizar uma análise de agrupamento hierárquico foi realizada (Figura 13b), o que demonstrou e reafirmou as duas principais tendências de expressão observada pela análise de PCA:

genes induzidos em N⁺ e/ou reprimidos em N⁻ e genes induzidos em N⁻ e/ou reprimidos em N⁺.

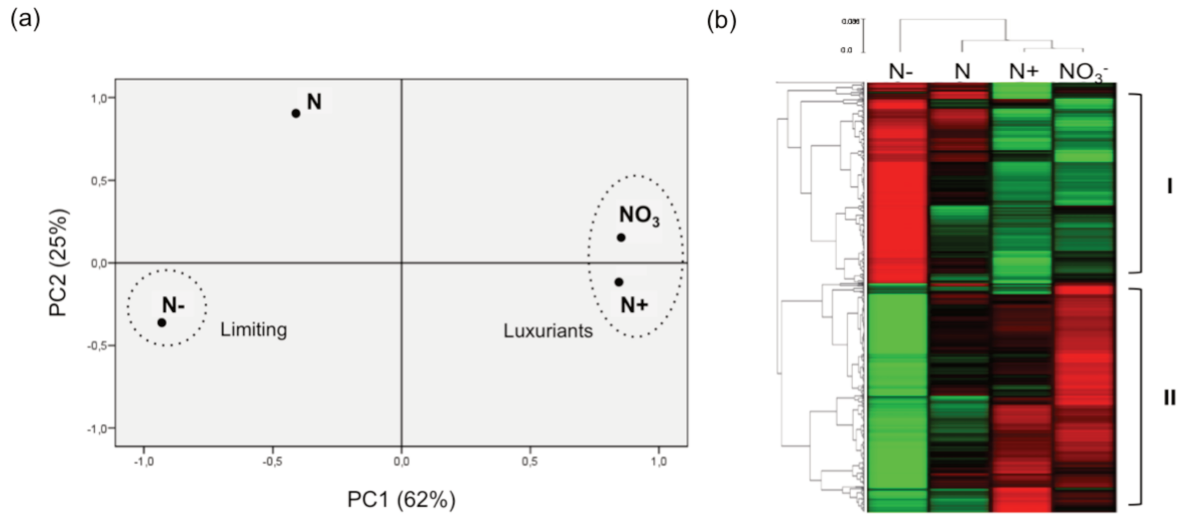


Figure 13. Análise dos genes diferencialmente expressos. a) Análise do componente principal. b) Agrupamento hierárquico de expressão: (I) genes induzidos em N⁻ e/ou reprimidos em N⁺, (II) genes reprimidos em N⁻ e/ou induzidos em N⁺.

5.2.4.4 Genes induzidos em N⁻ e/ou reprimidos em N⁺

A Tabela 2 apresenta os principais genes diferencialmente expressos dessa categoria. Em resposta ao estresse provocado pela deficiência de N no crescimento e desenvolvimento das plantas de eucalipto, proteínas de choque térmico (HSP) e relacionadas a resposta a estresses foram a classe de gene com maior representação nessa categoria de expressão (69 genes, 17,4% do total de genes diferencialmente expressos). As proteínas de choque térmico fazem parte de uma importante maquinaria de reparo e manutenção do correto dobramento de proteínas, e um importante indicador de situações de estresse (Åkerfelt et al. 2010). Esse resultado corrobora o fenótipo apresentado pelas plantas cultivadas em deficiência de N.

Como demonstrado pelas análises histológicas e químicas, nas quais a concentração de lignina aumentou sob deficiência de N, a maioria dos genes relacionados a biossíntese de lignina estavam superexpressos no tratamento N-. Dentre eles podemos identificar os genes que codificam proteínas pertencentes as etapas comum a todo metabolismo de fenilpropanóides como fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), 4-Cumarato-coenzima A ligase (4CL). Esses três genes foram respectivamente representados por 3, 4 e 1 *contigs* presentes no banco de dados, todos apresentando o mesmo padrão de expressão ao qual a menor quantidade de N oferecida induziu a maior expressão. Esse padrão de expressão foi acompanhado por genes exclusivos da via de biossíntese de lignina. Dentre eles o gene correspondente a ferulato 5-hidroxilase (F5H) que catalisa a etapa de formação do monômero S, corroborando mais uma vez os resultados das análises químicas, onde o aumento da quantidade de lignina foi acompanhado pelo aumento da razão S/G. Outros dois genes relacionados a lignificação corresponderam a lacase 17, que recentemente foi descrita em *Arabidopsis* e está envolvida na etapa de polimerização da lignina (Berthet et al. 2011). Em *Populus*, apesar de terem sido descritos fenótipos semelhantes referentes a lignificação do xilema secundário, dentre os genes relacionados a biossíntese de lignina apenas os correspondentes a lacase 17 foram identificados (Plavcová et al. 2012).

Os genes correspondentes as demais enzimas envolvidas na biossíntese de lignina p-coumarato 3-hidroxilase (C3H), hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase (HCT) , ácido cafeico O-metiltransferase (COMT), cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), Cinamoil-CoA reductase (CCR), cinamil álcool desidrogenase (CAD), apresentaram o mesmo padrão de expressão e valor de $P \leq 0,01$, mas não satisfizeram o valor de corte de expressão de 1,5 (Fold). Esse perfil de expressão de todos os genes da via de biossíntese de lignina foi validado por uma

análise de qRT-PCR (Figura 14), assim como a triplicatas dos tratamentos submetidos a sequenciamento de RNA.

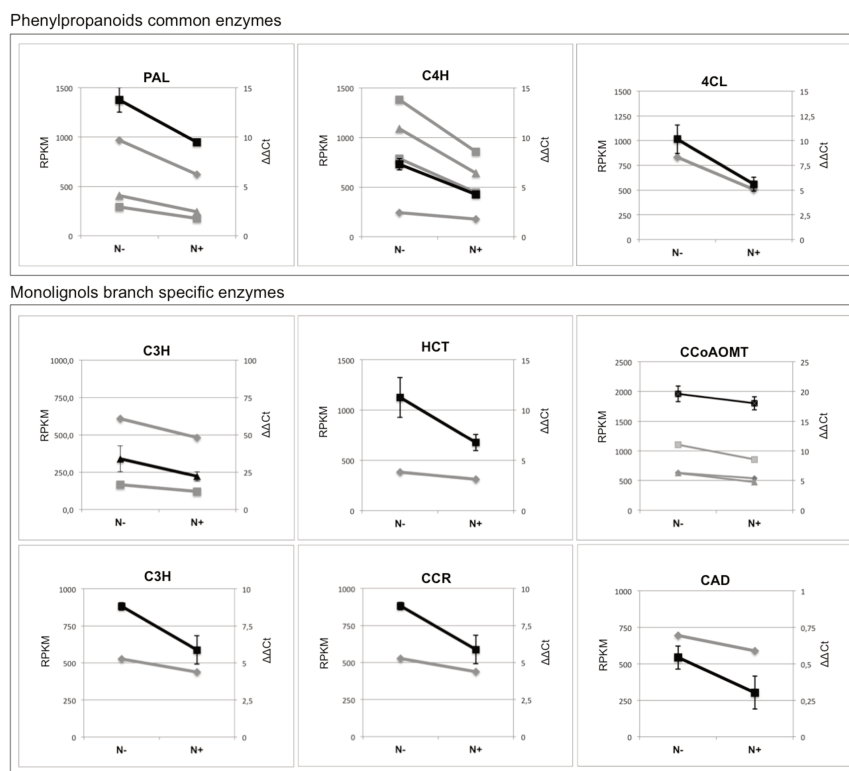


Figure 14. Expressão de genes relacionados com a biossíntese de lignina por RT-qPCR e RNAseq.

Seguindo a mesma tendência dos genes relacionados ao metabolismo de fenilpropanóides, os genes pertencentes a vias anteriores como os correspondentes a Arogenato desidratase (ADT) foram induzidos pela deficiência de N. As ADTs são capazes de modular o fluxo de carbono para biossíntese de lignina (Corea et al. 2012). Esse resultado reforça a hipótese apresentada por Cantón et al. (2005) de que em tecidos sob alta taxas de lignificação como o xilema, a amônia liberada pela desaminação da L-fenilalanina pela PAL, é destinada e incorporada novamente pelas ADTs. Este seria um mecanismo de preservação da amônia liberada para reutilização na síntese de L-fenilalanina. De acordo com os autores, este processo é

compartimentalizado e necessário para manter as altas taxas de lignificação de tecidos como o xilema.

Outros quatro genes correspondentes a serino hidroximetiltransferase (SHMT) foram induzidos em N-. A SHMT faz parte do metabolismo 1C. Este metabolismo é especialmente ativo em tecidos onde existe a produção e deposição de compostos metilados como a lignina, e esta intimamente relacionado a biossíntese deste polímero pelas enzimas COMT e CCoAOMT (Hanson & Roje 2001; Cantón et al. 2005; van den Broeck et al. 2008). Os altos índices de lignificação parecem estar conectados a um aumento na regeneração de radicais metil. S-adenosil metionina deve ser regenerada a partir da S-adenosilhomocisteinase (SAH) associado aos 5,6,7,8 tetrahidrofolatos, e necessita do formato ou serina/glicina como doador de carbono. Em nossos resultados, a serina parece ser o principal doador sob deficiência de N. Além disso, o amônio liberado pela reciclagem da glicina em serina, poderia ser reassimilado e utilizado na produção de L-fenilalanina (Cantón et al. 2005).

Como esperado em uma análise de transcrito de xilema, a formação das parede celulares secundárias são principalmente reguladas por fatores de transcrição (Demura & Fukuda 2007; Du & Grover 2010; Déjardin et al. 2010; Grima-Pettenati et al. 2012). Muitos fatores de transcrição foram induzidos pela deficiência de N, dentre as famílias estão os MYBs, bHLHs, WRKYs e WD40, todas com membros já descritos por influenciarem a formação e qualidade de paredes celulares secundárias (Goicoichea et al. 2005; Legay et al. 2007, 2010; Wang et al. 2010, Demura & Fukuda 2007). Dentre todos podemos destacar um ortólogo potencial do fator de transcrição MYB85 de *Arabidopsis*, descrito por controlar especificamente a biossíntese de lignina (Zhong et al. 2008) e induzido pela deficiência de N.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos induzidos em N- e/ou reprimidos em N+.

Identificação gene/Eucalipto	TAIR	Descrição	RPKM				N+/N-	
			N-	CT	N+	NO3	Fold	P-value
Metabolismo de Nitrogênio/aminoácidos								
CD668569.1	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	1852	1369	996	948	-1,86	6,3E-11
contig_23319	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	1586	1283	987	961	-1,61	3,9E-03
Contig7054	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	1621	1215	875	826	-1,85	6,9E-03
de_novo_15907	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	491	401	289	297	-1,70	1,0E-16
de_novo_12308	AT4G13940.4	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1578	1299	928	933	-1,70	6,7E-03
contig_8461	AT2G27820.1	Prephenate dehydratase 1/ Arogenate dehydratase3	448	268	198	184	-2,26	1,5E-09
contig_15070	AT2G27820.1	Prephenate dehydratase 1/ Arogenate dehydratase3	285	166	116	115	-2,46	3,3E-03
contig_10858	AT1G08250.1	Arogenate dehydratase 6	354	223	162	166	-2,19	4,2E-06
de_novo_11386	AT1G08250.1	Arogenate dehydratase 6	267	144	98	111	-2,71	3,5E-05
de_novo_11507	AT3G44720.1	Arogenate dehydratase 4	177	106	76	79	-2,33	8,9E-51
contig_10937	AT5G18170.1	Glutamate dehydrogenase 1	140	69	34	42	-4,14	2,4E-03
de_novo_11901	AT1G12940.1	Nitrate transporter 2.5	185	44	28	35	-6,57	3,2E-12
de_novo_12290	AT1G47670.1	Transmembrane amino acid transporter family protein	44	39	12	40	-3,58	7,6E-02
contig_6209	AT2G39890.2	Proline transporter 1	49	30	12	18	-4,11	9,9E-02
de_novo_12257	AT2G23970.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	91	60	26	37	-3,52	9,6E-03
de_novo_11475	AT1G73220.1	Organic cation/carnitine transporter1	163	54	49	47	-3,30	9,6E-03
de_novo_11829	AT1G77380.1	Amino acid permease 3	322	153	131	107	-2,46	7,4E-09
contig_40282	AT2G38120.1	Transmembrane amino acid transporter family protein	134	87	79	60	-1,69	3,0E-42
contig_96254	AT5G40780.2	Lysine histidine transporter 1	21	25	3	7	-6,46	1,0E-07
contig_66462	AT2G23970.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	27	7	5	8	-5,76	1,5E-08
Metabolismo de fenilpropanóides/biossíntese de lignina								
contig_10482	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	971	815	620	678	-1,56	1,4E-02
contig_21173	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	409	296	243	249	-1,68	2,4E-04
contig_16352	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	290	229	176	192	-1,65	1,8E-01
contig_3622	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	1382	1066	857	855	-1,61	3,7E-02
Contig7339	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	1088	854	639	698	-1,70	2,1E-02
BD224437.1	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	787	562	446	428	-1,76	8,1E-04
contig_6919	AT1G51680.1	4-coumarate:CoA ligase 1	834	615	506	506	-1,65	3,4E-02
contig_390	AT4G36220.1	Ferulic acid 5-hydroxylase 1	1416	1129	905	1008	-1,56	7,5E-02
de_novo_24790	AT5G54160.1	Caffeic O-methyltransferase1	189	167	123	131	-1,53	9,5E-32
contig_3127	AT5G60020.1	Laccase 17	569	436	364	338	-1,56	5,6E-04
contig_23816	AT5G60020.1	Laccase 17	200	167	133	114	-1,50	1,7E-03
contig_31786	AT4G33420.1	Peroxidase superfamily protein	91	108	47	75	-1,92	8,6E-05
contig_72476	AT2G40890.1	Cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 3 (C3H)	21	21	6	14	-3,48	8,3E-03

Tabela 2. (continuação)

Fatores de Transcrição							
de_novo_11738	AT1G75250.2	RAD-like 6	83	40	15	18	-5,44 1,9E-04
contig_18752	AT2G27580.2	A20/AN1-like zinc finger family protein	274	207	128	224	-2,14 7,4E-02
BD377759.1	AT2G23290.1	Myb domain protein 70	73	58	34	48	-2,14 8,5E-03
contig_33673	AT4G11660.1	Winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	39	34	18	20	-2,11 3,1E-03
Contig3627	AT3G49930.1	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	133	46	64	74	-2,08 8,9E-04
contig_8449	AT1G14920.1	GRAS family transcription factor family protein	81	54	41	41	-1,98 9,4E-07
contig_4005	AT1G78070.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	47	30	25	26	-1,91 6,5E-03
de_novo_11342	AT3G20640.1	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	87	101	48	65	-1,82 7,3E-03
contig_6574	AT3G54810.1	Plant-specific GATA-type zinc finger transcription factor family protein	211	140	119	115	-1,78 1,6E-126
contig_17263	AT1G24530.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	52	57	31	55	-1,68 6,0E-02
contig_3124	AT4G22680.1	Myb domain protein 85	100	96	64	68	-1,57 4,6E-03
contig_16146	AT2G44745.1	WRKY family transcription factor	88	64	56	73	-1,55 8,3E-04
contig_7306	AT1G32640.1	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein	227	145	147	153	-1,54 7,5E-02
contig_8615	AT1G78080.1	Related to AP2 4	387	278	253	253	-1,53 5,7E-07
contig_41808	AT2G27580.2	A20/AN1-like zinc finger family protein	154	127	101	132	-1,53 6,2E-03
contig_3905	AT1G14920.1	GRAS family transcription factor family protein	95	77	62	67	-1,53 5,7E-03
Outros processos							
contig_26546	AT3G24500.1	Multiprotein bridging factor 1C	79	28	7	15	-11,62 7,2E-03
contig_4006	AT3G25230.1	Rotamase FKBP 1	71	27	7	7	-10,62 4,3E-152
de_novo_11700	AT2G38600.1	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	184	62	18	17	-10,24 9,1E-03
de_novo_11412	AT1G62710.1	Beta vacuolar processing enzyme	188	166	45	73	-4,19 3,3E-15
de_novo_11440	AT4G33040.1	Thioredoxin superfamily protein	88	35	21	22	-4,15 3,1E-03
de_novo_11477	AT3G28345.1	ABC transporter family protein	107	41	32	32	-3,33 3,4E-02

5.2.4.5 Genes induzidos em N+ e/ou reprimidos em N-

A Tabela 3 apresenta os principais genes diferencialmente expressos dessa categoria. Genes correspondendo a proteínas ribossomais foram os mais representados nessa categoria (135 genes, 55,4% do total de genes diferencialmente expressos). As proteínas ribossomais estão diretamente correlacionadas com a síntese de proteínas, principal dreno do N incorporado. Muitos outros genes relacionados ao metabolismo e transporte de aminoácidos foram induzidos pela alta fertilização nitrogenada. Dentre

eles destacam-se genes que codificam Glutamina dumper 3, responsável pela exportação de aminoácidos, altamente expresso em tecido vascular de *Arabidopsis* (Pratelli et al. 2010) e recentemente descrito por ser induzido por alta fertilização nitrogenada em *Populus* (Plavcová et al. 2012).

Um dos genes mais induzidos correspondeu a uma Formato desidrogenase (FDH). A FDH foi representada por 5 genes, todos com expressão muito baixa nas plantas sob o tratamento N-, e altamente induzidos nos dois tratamentos com excesso de N. Esta enzima também faz parte do metabolismo 1C e descrita por ser induzida em resposta a diversos estresses (Alekseeva et al. 2011), apesar de sua indução por excesso de N nunca ter sido descrita. Um possível papel desempenhado por essa enzima seria controlar o suprimento de intermediários para o metabolismo de 1C, uma vez que esta oxida formato em NADH e CO₂.

Outro gene altamente induzido pelo excesso de N foi o da *hemoglobina1* (*HB1*). A expressão de uma *HB* já foi descrita por estar relacionada com a expressão de uma nitrato redutase em raízes de milho (Trevisan et al. 2011). Além disso, muitas hemoglobinas não simbióticas são descritas por sequestrar NO (Perazzoli et al. 2004), possivelmente o papel empregado sob alta concentração de N, e liberação de NO pela Nitrato redutase.

Foram identificados ainda genes diretamente relacionados ao metabolismo de N. Dois transportadores de baixa afinidade NTR1, possíveis ortólogos de *Arabidopsis*, foram induzidos sob alta concentração de N. O mesmo padrão de expressão foi identificado em genes relacionados a redução do nitrato dentre eles, uma Nitrato redutase 1 (NR1), duas Nitrato redutase 2 (NR2) e seis Nitrito redutases (NiR). Um gene correspondendo a uroporfirina metilase 1 (UPM1), que catalisa a biossíntese de um co-fator para NiR (Wang et al. 2000), também foi induzido. Duas Glutamina sintase (GS), envolvidas na assimilação do amônio também foram induzidas pela alta fertilização com

N. Nenhum gene do metabolismo de N apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos de excesso N, apresentando o mesmo padrão de expressão.

Assim como nos tratamento limitantes em N, muitos fatores de transcrição foram também induzidos pelo excesso de N. Dentre eles o que apresentou a maior diferença de expressão correspondeu a um ortólogo de *Arabidopsis Lateral Organ Boundary Domain* (LBD38). Este fator de transcrição assim como outros membros da família (AtLBD37 e AtLBD39) são induzidos por nitrato em *Arabidopsis* (Rubin et al. 2009) e recentemente descritos por serem superexpressos em *Populus* em resposta a alta fertilização nitrogenada (Pitre et al. 2010; Plavcová et al. 2012). Alguns membros dessa família de fatores de transcrição estão envolvidos com a regulação transcricional da formação da madeira em *Populus* (Yordanov et al. 2010).

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos induzidos em N+ e/ou reprimidos em N-

Identificação gene/Eucalipto	TAIR	Descrição	RPKM				N+/N-	
			N-	CT	N+	NO3	Fold	P-value
High RPKM values								
Metabolismo de nitrogênio /aminoácido								
contig_4860	AT3G30390.2	Transmembrane amino acid transporter family protein	308	501	828	703	2,69	8,3E-02
contig_39303	AT3G02468.1	S-adenosyl-l-methionine decarboxylase	467	597	1013	805	2,17	4,1E-13
contig_89005	AT5G15950.2	Adenosylmethionine decarboxylase family protein	403	520	897	745	2,22	1,5E-05
de_novo_11480	AT1G32450.1	Nitrate transporter 1.5	86	163	200	194	2,32	2,9E-04
de_novo_11781	AT1G32450.1	Nitrate transporter 1.5	93	161	209	170	2,25	5,5E-03
contig_94502	AT1G37130.1	Nitrate reductase 2	16	34	59	52	3,63	6,3E-03
de_novo_11688	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	51	158	390	387	7,57	8,4E-03
CU396904	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	50	143	323	331	6,53	6,6E-02
CU395994	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	42	139	330	330	7,79	7,6E-19
de_novo_11644	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	48	134	321	316	6,65	1,7E-09
CD670065	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	27	87	187	186	6,81	1,4E-04
CD669078	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	27	78	184	168	6,70	4,3E-03
contig_20989	AT5G35630.3	Glutamine synthetase 2	51	88	123	128	2,43	2,7E-04
CD668172	AT5G35630.3	Glutamine synthetase 2	30	53	76	83	2,53	7,5E-10
contig_12167	AT1G48600.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	26	42	51	52	1,96	8,3E-03

Tabela 3. (continuação)

contig_27152	AT1G48600.2	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	48	74	89	94	1,86	6,8E-07
de_novo_11646	AT5G19530.2	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	48	70	82	80	1,73	3,7E-02
de_novo_11536	AT5G57685.1	Glutamine dumper 3	30	53	55	62	1,84	1,8E-05
de_novo_11573	AT5G57685.1	Glutamine dumper 3	6	34	28	29	4,38	8,1E-02
contig_54971	AT5G11520.1	Aspartate aminotransferase 3	111	151	167	180	1,51	2,5E-05
contig_6566	AT4G31990.2	Aspartate aminotransferase 5	43	66	79	93	1,82	7,8E-03
contig_10096	AT2G39800.3	Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1	42	54	70	65	1,67	6,5E-07
de_novo_19746	AT1G77760.1	Nitrate reductase 1	8	19	34	37	4,46	1,2E-08
de_novo_11752	AT1G37130.1	Nitrate reductase 2	11	21	35	29	3,30	3,7E-24
de_novo_11746	AT5G40850.1	Urophorphyrin methylase III	6	21	65	61	11,16	6,4E-07
Fatores de Transcrição								
contig_4484	AT1G10200.1	GATA type zinc finger transcription 52amil 52amily protein	35	60	86	83	2,41	4,9E-03
contig_89946	AT1G80840.1	WRKY DNA-binding protein 40	22	47	37	50	1,65	4,1E-02
CU401821	AT1G80840.1	WRKY DNA-binding protein 40	14	34	33	46	2,38	4,9E-11
contig_64900	AT2G38470.1	WRKY DNA-binding protein 33	19	15	34	40	1,79	1,5E-01
de_novo_11651	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	110	142	231	216	2,10	2,8E-03
de_novo_12111	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	110	129	197	158	1,79	1,4E-09
CD668471.1	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	82	107	165	141	2,00	7,2E-12
contig_30879	AT3G13040.2	Myb-like HTH transcriptional regulator family protein	92	106	141	140	1,54	7,8E-03
contig_431	AT3G48930.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	137	207	216	240	1,58	2,4E-04
contig_6895	AT3G48930.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	81	112	126	137	1,55	2,9E-01
Contig5032	AT3G49470.1	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 2	53	75	81	85	1,54	2,9E-07
de_novo_11383	AT3G49940.1	LOB domain-containing protein 38	8	26	57	50	6,75	2,8E-43
contig_74960	AT4G31800.2	WRKY DNA-binding protein 18	19	41	33	46	1,73	1,4E-02
contig_74953	AT5G08790.1	NAC domain transcriptional regulator superfamily protein, ATAF2	19	29	38	41	1,95	1,7E-06
de_novo_11667	AT5G39660.2	Cycling DOF factor 2	39	41	76	66	1,94	3,5E-05
contig_12125	AT5G39660.2	Cycling DOF factor 2	39	40	66	59	1,71	1,7E-03
contig_7333	AT1G76010.1	Alba DNA/RNA-binding protein	64	80	98	110	1,54	7,1E-01
de_novo_12164	AT5G43700.1	AUX/IAA transcriptional regulator family protein	33	54	66	54	1,99	2,3E-02
Other process								
de_novo_11604	AT2G16060.1	Hemoglobin 1	1	39	95	126	87,88	1,9E-01
CU401963	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	1	55	145	194	99,23	6,5E-15
Contig5452	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	1	33	75	97	69,36	1,7E-05
contig_92267	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	3	64	169	201	57,00	1,1E-06
contig_94429	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	2	30	75	98	42,23	4,5E-02
CU396775	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	3	36	94	125	27,80	3,8E-03

5.2.4.6 A altas taxas de lignificação em condições deficientes de N são mantidas por um fluxo de NH_4^+ reciclado

Para responder a questão relacionada a manutenção das altas taxa de lignificação observada nas células xilemáticas de eucalipto sob condições deficientes de N, aproveitamos de todo o resultado obtido pelo sequenciamento de RNA, inclusive dos genes diferencialmente expressos ($P\text{-value} \leq 0.01$) relacionados aos metabolismos envolvidos mas que não satisfizeram os parâmetros iniciais de expressão diferencial de 1,5 (*fold*).

Nas plantas, o nitrogênio é assimilado nas formas inorgânicas NO_3^- e NH_4^+ , e incorporados em aminoácidos. O nitrato é assimilado e transportado por proteínas específicas (NTRs), convertidos em nitrito (NO_2^-) pela nitrato redutase e reduzidos a NH_4^+ pela glutamina sintase (GS2) presente nos plastídios. Como mostrado anteriormente, todos esses genes foram induzidos pela fertilização com alta concentração de N. A única exceção dentre os *NTRs*, foi um transportador de alta-afinidade ortólogo ao *NTR2.5* de *Arabidopsis* que, como esperado, foi induzido no tratamento com quantidade limitante de N.

A partir da análise dos genes antes não considerados diferencialmente expressos, foram identificados duas glutaminas citosólicas (GS1) induzidas pela condição deficiente em N (1,4 *fold*). A isoforma citosólica da GS esta envolvida na assimilação e reassimilação de N (Bernard & Habash 2009). A GS1 tem a capacidade de reassimilar o N liberado pela proteólise e pela desaminação da L-fenilalanina (Bernard & Habash 2009), e sua co-expressão junto a enzima PAL foi demonstrada em células xilemáticas de coníferas (Suárez et al. 2002; Cantón et al. 2005; Cánovas et al. 2007). De acordo com a expressão da GS1, os genes correspondentes a PAL, bem como os demais relacionados a biossíntese de lignina descritos anteriormente, foram induzidos no tratamento N-.

Esses resultados sugerem que um eficiente mecanismo de reciclagem de N é induzido em condições deficientes, similar ao proposto por Cantón et al. (2005). O NH_4^+ liberado pela atividade da PAL é incorporado pela GS1 no citosol. Em seguida, o NH_4^+ é reciclado a L-fenilalanina via arogenato, hipótese fortalecida pela alta indução de 5 genes correspondendo a Arogenato desidratase AGT. A única enzima que não pode ser encontrada foi a prefenato aminotransferase, enzima identificada em plantas apenas recentemente (Graindorge et al. 2010). O modelo proposto esta apresentado na Figura 15.

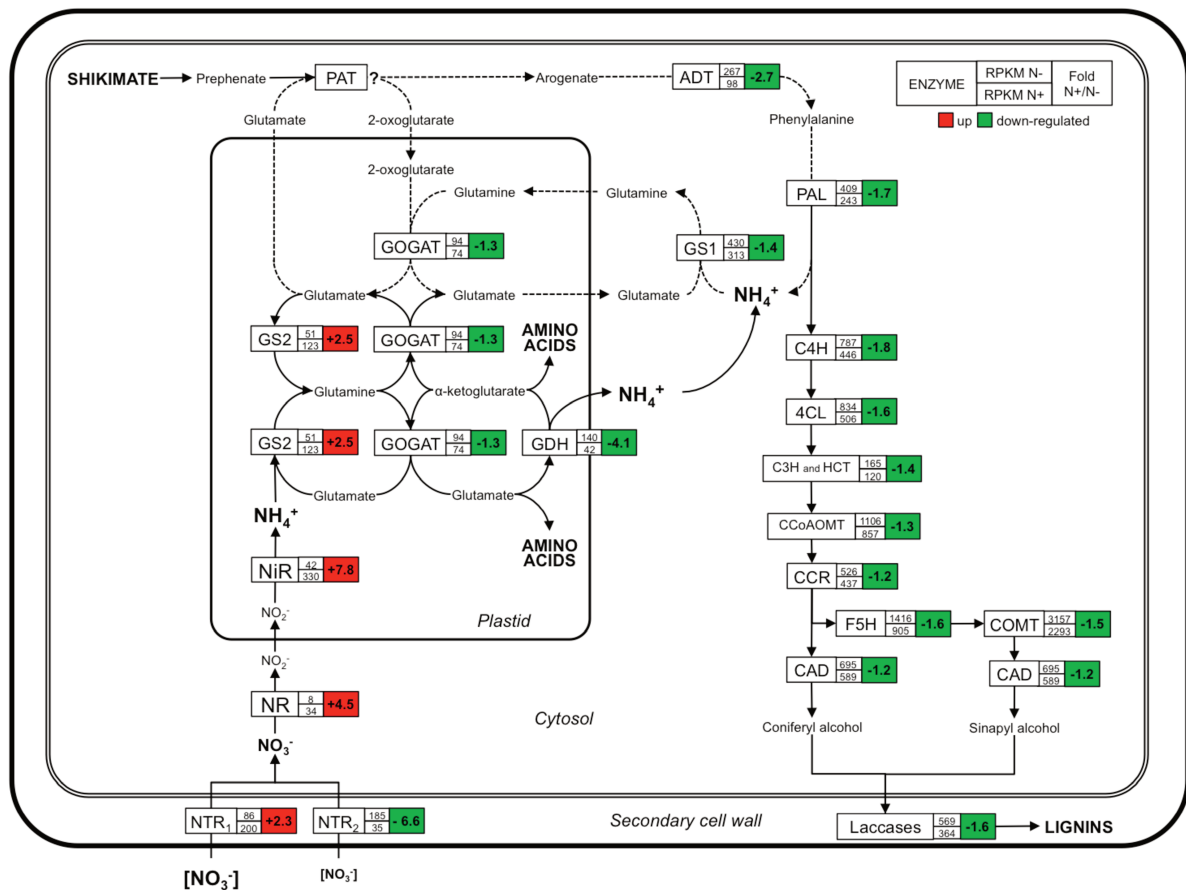


Figure 15. Modelo proposto para manutenção das altas taxas de lignificação sob deficiência de N.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados histológicos, químicos e de expressão foi demonstrado que o nitrogênio afeta a formação e qualidade da madeira de eucalipto. Dentre os constituintes das paredes celulares secundárias xilemáticas, a lignina parece ser o principal polímero afetado. A adubação em excesso de N diminuiu a deposição de lignina e consequentemente, enfraquecendo as paredes celulares. Esse enfraquecimento parece ser o principal fator relacionado a uma maior formação de madeira de tensão, acompanhado do acúmulo de celulose como descrito em *Populus*.

Dentre os trabalhos publicados sob assunto, a técnica de sequenciamento de RNA possibilitou a identificação de um maior número de genes, principalmente relacionados a biossíntese de lignina. Apesar de terem obtidos respostas fenotípicas semelhantes, a técnica de microarranjos utilizada no caso dos trabalhos com *Populus* não foi suficiente para determinação de expressão diferencial desses genes em resposta a disponibilidade de N. A grande maioria dos genes apresentaram um padrão de expressão N-dependente, validando as condições experimentais propostas.

Dentre os genes diferencialmente expressos, um grande número de fatores de transcrição foram identificados. Muitos são candidatos potenciais para o estudo da xilogenese em respostas a variações ambientais, e futuros trabalhos de transgenia para obtenção de plantas mais adaptadas e apresentando uma melhor qualidade de biomassa.

Foi possível estabelecer um modelo no qual árvores de *Eucalyptus* sob deficiência de N, induzem um mecanismo de reciclagem do amônio liberado pela PAL via arogenato, justificando assim o alto conteúdo de lignina observado.

Finalmente, foi demonstrado que a fertilização nitrogenada, dentre as práticas de manejo mais utilizadas em florestas plantadas, tem um potencial de ser utilizada não

somente para aumentar a quantidade de biomassa, como também a qualidade da madeira produzida. Este resultado torna-se ainda mais promissor no momento atual, onde a biomassa lignocelulósica tem sido apontada como a grande aposta para produção de biocombustíveis, e dentre as limitações a presença da lignina permanece como um obstáculo a ser vencido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Åkerfelt M., Morimoto R.I. & Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 545-555.
- Alekseeva A.A., Savin S.S. & Tishkov V.I. (2011) NAD(+)-dependent Formate Dehydrogenase from Plants. *Acta Naturae* **3** (4), 38-54.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25** (17), 3389–3402.
- Alves A., Schwanninger M., Pereira H. & Rodrigues, J. (2006) Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood - Part 1: Comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **76** (1-2), 209–213.
- Alves A., Simões R., Santos C., Potts B., Rodrigues J. & Schwanninger M. (2012) Determination of Eucalyptus globulus wood extractives content by NIR-based PLS-R models: Comparison between extraction procedures. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **20**, 275-285.
- Alves A., Simões R., Stackpole D. J., Vaillancourt R. E., Potts B. M., Schwanninger M. & Rodrigues, J. (2011) Determination of the syringyl/guaiacyl ratio of Eucalyptus globulus wood lignin by near infrared-based partial least squares regression models using analytical pyrolysis as the reference method. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **19** (5), 343-348.
- Arvidsson S., Kwasniewski M., Riaño-Pachón D.M. & Mueller-Roeber B. (2008) QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**:465.
- Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Eweller L., Griffiths-Jones S., Howe K.L., Marshall M. & Sonnhammer E.L.L. (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* **30** (1), 276-280.
- Baucher M., Halpin C., Petit-Conil M. & Boerjan W. (2003) Lignin: Genetic Engineering and Impact on Pulping. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 305–350.
- Bernard S.M. & Habash D.Z. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* **182**, 608–620.
- Berthet S., Demont-Caulet N., Pollet B. et al. (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of Arabidopsis thaliana stems. *Plant Cell* **23** (3), 1124-1137.
- Borders, B.E.; Will, R.E.; Markewitz, D.; Clark, A.; Hendrick, R.; Teskey, R.O.; Zhang, Y. Effect of complete competition control and annual fertilization on stem growth and canopy relations for a chronosequence of loblolly pine plantations in the lower coastal plain of Georgia. **Forestry Ecology and Management**, v.192, p. 21–37, 2004.

Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J. & Goffner D. (2003) Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* **12**, 576-581.

Brown, K.R.; Van Den Driessche, R. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the growth and nutrition of hybrid poplars on Vancouver Island. *New Forests*, v. 29, p. 89–104, 2005.

Canam, T. and Campbell, M. M. (2009) Genes and nitrogen fuel wood formation. *New Phytologist* **182**, 783–785.

Cánovas F.M., Avila C., Cantón F.R., Cañas R.A. & de la Torre F. (2007) Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* **58** (9), 2307–2318.

Cantón F.R., Suárez M.F. & Cánovas F.M. (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* **83**, 265–278.

Carpita N.C. (2011) Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for improving biomass for bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 1–8.

Cassan-Wang H., Soler M, Yu H., Camargo E.L.O., Carocha V., Ladouce N., Savelli B., Paiva J.A.P., Leplé JC. & Grima-Pettenati J. (2012) Reference Genes for High-Throughput Quantitative RT-PCR Analysis of Gene Expression in Organs and Tissues of Eucalyptus Grown in Various Environmental Conditions. *Plant and Cell Physiology* **53** (12), 2101-2116.

Conesa A., Gotz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21** (18), 3674-3676.

Cooke J.E.K., Martin T.A. & Davis J.M. (2005) Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist* **167**, 41–52.

Corea O.R.A., Bedgar D.L., Davin, L.B. & Lewis, N.G. (2012) The arogenate dehydratase gene family: Towards understanding differential regulation of carbon flux through phenylalanine into primary versus secondary metabolic pathways. *Phytochemistry* **82**, 22–37.

Déjardin A., Laurans F., Arnaud D., Breton C., Pilate G., Leplé JC. (2010) Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 325–334.

Demura T. & Ye ZH. (2010) Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 299–304.

Demura T. & Fukuda H. (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *TRENDS in Plant Science* **12** (2), 64–70.

Du J. & Groover A. (2010) Transcriptional Regulation of Secondary Growth and Wood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52** (1), 17–27

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weissshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. Vol.15 No.10 2010.

Eldridge K., Davidson J., Harwood C. & Van Wyk G. (1993). Eucalypt domestication and breeding. *Oxford, UK: Clarendon Press*.

Euring D., Löffke C., Teichmann T. & Polle A. (2012) Nitrogen fertilization has differential effects on N allocation and lignin in two *Populus* species with contrasting ecology. *Trees* **26**, 1933–1942.

Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R. & Stitt M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* **46**, 533–548.

Goicoechea M., Lacombe E., Legay S. et al. (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant Journal* **43**, 553–567.

Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M. et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* **29**, 644–652.

Graindorge M., Giustini C., Jacomin A.C., Kraut A., Curien G. & Matringe M. (2010) Identification of a plant gene encoding glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase: The last homeless enzyme of aromatic amino acids biosynthesis. *FEBS Letters* **584**, 4357–4360

Grattapaglia D. & Kirst M. (2008) Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* **179**, 911–929.

Grima-Pettenati J., Soler M., Camargo E.L.O. & Wang H. (2012) Transcriptional Regulation of the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights. In *Advances in Botanical Research* **61** (eds L. Jouanin & C. Lapierre), pp. 173-218. Academic Press, Burlington

Hanson A.D. & Roje S. (2001) One-Carbon Metabolism in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 119-137.

Heilman, P. & Norby, R.J. Nutrient cycling and fertility management in temperate short rotation forest systems. **Biomass Bioenergy**, v.14, p.361-370, 1998.

Kanehisa M. & Goto S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* **28** (1), 27-30.

Keller G., Marchal T., San Clemente H., Navarro M., Ladouce N., Wincker P., Coloux A., Teulière C. & Marque C. (2009) Development and functional annotation of an 11,303-

EST collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes* **5**, 317-327.

Kirst M., Myburg A.A., De Leon J.P.G., Kirst M.E., Scott J. & Sederoff R. (2004) Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. *Plant Physiology* **135**, 2368–2378.

Koski L.B., Gray L.W., Lang B.F. & Burger G. (2005) AutoFACT: An Automatic Functional Annotation and Classification Tool. *BMC Bioinformatics* **6**:151.

Legay S., Lacombe E., Goicoechea M., Brière C., Séguin A., Mackay J. & Grima-Pettenati J. (2007) Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Science* **173**, 542–549.

Legay S., Sivadon P., Blervacq AS. et al. (2010) EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar. *New Phytologist* **188**, 774–786.

Le Provost G., Herrera R., Paiva J.A.P., Chaumeil P., Salin F. & Plomion C. (2007) A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research* **40**, 291-297.

Li H., Li M., Luo J. et al. (2012) N-fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fast-growing *Populus* species. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6173-6185.

Li R., Yu C., Li Y., Lam TW., Yiu SM., Kristiansen K. & Wang J. (2009) SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25** (15), 1966-1967.

Lima, I.L. Influência do desbaste e da adubação na madeira serrada de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden 2005.137 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

Macdonald, E. & Hubert, J. A review of the effects of silviculture on timber quality of Sitka spruce. **Forestry**, v.75, p. 107-138, 2002.

Mansfield S.D., Kang KY. & Chapple C. (2012a) Designed for deconstruction – poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production. *New Phytologist* **194**, 91–101.

Martin, T.A. & Jokela, E.J. Stand development and production dynamics of loblolly pine under a range of cultural treatments in north-central Florida USA. **Forestry Ecology and Management**, v.192, p.39-58, 2004.

Mizrachi E., Hefer C.A., Ranik M., Joubert F. & Myburg A.A. (2010) *De novo* assembled expressed gene catalog of a fast-growing *Eucalyptus* tree produced by Illumina mRNA-Seq. *BMC Genomics* **11**:681

Mizrachi E., Mansfield S.D. & Myburg A.A. (2012b) Cellulose factories: advancing bioenergy production from forest trees. *New Phytologist* **194**, 54–62.

Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L. & Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**, 621–628.

Novaes E., Kirst M., Chiang V., Winter-Sederoff H. & Sederoff R. (2010) Lignin and Biomass: A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. *Plant Physiology* **154**, 555–561.

Novaes E., Osorio L., Drost D.R. et al. (2009) Quantitative genetic analysis of biomass and wood chemistry of *Populus* under different nitrogen levels. *New Phytologist* **182**, 878–890.

Oren, R.; Ellsworth, D.S.; Johnsen, K.H.; Philipps, N.; Ewers, B.E.; Maier, C.; Schafer, K.V.R.; McCarthy, H.; Hendrey, G.; McNulty, S.G.; Katul, G.G. Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. *Nature*, v. 411, p. 469–472, 2001.

Palanchar, P.M.; Kouranov, A.; Lejay, L.V.; Coruzzi, G.M. Genomewide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology*, v.5, p.R91, 2004

Paul, M.J.; Foyer, C.H. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, v.52, p.1383–1400, 2001.

Paux E, Tamasloukht M, Ladouce N, Sivadon P, Grima-Pettenati J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. *Plant Molecular Biology* **55**: 263–280, 2004.

Paux E., Carocha V., Marques C., Mendes de Sousa A., Borralho N., Sivadon P. & Grima-Pettenati J. (2005) Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytologist* **167**, 89–100.

Peng M., Hudson D., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H., Bi Y.M. & Rothstein S.J. (2008) Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany* **59** (11), 2933–2944.

Perazzoli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C., Zago E., Zeier A., Sonoda M., Lamb C. & Delledonne M. (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**, 2785–2794.

Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** (900), 2002 – 2007.

Pilate G., Déjardin A., Laurans F. & Leplé J.C. (2004a) Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytologist* **164**, 63–72.

Pilate G., Chabbert B., Cathala B., Yoshinaga A., Leplé J.C., Laurans F., Lapierre C. &

Ruel K. (2004b) Lignification and tension wood. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 889–901

Pitre F.E., Cooke J.E.K. & Mackay J.J. (2007a) Short-term effects of nitrogen availability on wood formation and fibre properties in hybrid poplar. *Trees* **21**, 249–259.

Pitre F.E., Pollet B., Lafarguette F., Cooke J.E.K., Mackay J.J. & Lapierre C. (2007b) Effects of Increased Nitrogen Supply on the Lignification of Poplar Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 10306–10314.

Pitre F.E., Lafarguette F., Boyle B., Pavy N., Caron S., Dallaire N., Poulin P.L., Ouellet M., Morency M.J., Wiebe N., Lim E.L., Urbain A., Mouille G., Cooke J.E.K. & Mackay J.J. (2010) High nitrogen fertilization and stem leaning have overlapping effects on wood formation in poplar but invoke largely distinct molecular pathways. *Tree Physiology* **30**, 1273–1289.

Plavcová, L., Hacke, U. G., Almeida-Rodriguez, A. M., Li, E. & Douglas, C. J. (2012) Gene expression patterns underlying changes in xylem structure and function in response to increased nitrogen availability in hybrid poplar. *Plant, Cell & Environment* **36**, 186–199

Plomion C., Leprovost G. & Stokes A. (2001) Wood Formation in Trees. *Plant Physiology* **127** (4), 1513–1523.

Poke, F.S.; Vaillancourt, R.E.; Elliott, R.C.; Reid, J.B. Sequence variation in two lignin biosynthesis genes, cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD2). **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.12, n.2, p.107-118, SEP, 2003.

Pot, D.; Chantre, G.; Rozenberg, P.; Rodrigues, J.C.; Jones, S.G.L.; Pereira, H.; Haninrup, B.; Cahalan, C.; Plomion, C. Genetic control of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Annals of Forest Science**, Paris, v. 59, n. 5/6, p. 563-575, 2002.

Potts B.M. (2004) Genetic improvement of eucalypts, *In: Encyclopedia of forest science* (eds. Burley J., Evans J., Youngquist J.A.), pp. 1480–1490. Oxford, UK: Elsevier Science.

Pratelli R., Voll L.M., Horst R.J., Frommer W.B. & Pilot G. (2010) Stimulation of Nonselective Amino Acid Export by Glutamine Dumper Proteins. *Plant Physiology* **152** (2), 762–773.

Puech, L.; T'Urck, S.; Hodson, J.; Fink, S. Wood formation in hybrid aspen (*Populus tremula* L. X *Populus tremuloides* Michx.). In: Savidge R, Barnett J, Napier R (eds) **Cell & molecular biology of wood formation**. BIOS Scientific, Oxford, 2000.

Quail M.A., Kozarewa I., Smith F., Scally A., Stephens P.J., Durbin R., Swerdlow H. & Turner D.J. (2008) A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods* **5**, 1005–1010.

Rengel D., San Clemente H., Servant F., Ladouce N., Paux E., Wincker P., Couloux A.,

Pierre Sivadon P. & Grima-Pettenati J. (2009) A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* **9**:36.

Rennenberg H. & Schmidt S. (2010) Perennial lifestyle - an adaptation to nutrient limitation? *Tree Physiology* **30**, 1047–1049.

J. L. Riechmann*, J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. -Z. , Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman and G. -L. Yu. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* **290** (5499): 2105-2110

Rodrigues J., Meier D., Faix O. & Pereira H. (1999) Determination of tree to tree variation in syringyl/guaiacyl ratio of *Eucalyptus globulus* wood lignin by analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **48** (2), 121–128.

Rodrigues J., Graça J. & Pereira H. (2001) Influence of tree eccentric growth on syringyl/guaiacyl ratio in *Eucalyptus globulus* wood lignin assessed by analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **58-59**, 481-489.

Rubin G., Tohge T., Matsuda F., Saito K. & Scheible WR. (2009) Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **21** (11), 3567-3584.

Samuelson, L.J. Influence of intensive culture on leaf net photosynthesis and growth of sweetgum and loblolly pine seedlings. *Forestry Science*, v.44, p.308–316, 1998.

Sarruge, J.R., 1970. Práticas de Nutrição Mineral de Plantas. Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. Piracicaba , ESALQ/USP. 5p, 1970.

Séguin A. (2011) How could forest trees play an important role as feedstock for bioenergy production? *Current Opinion in Environmental Sustainability* **3**, 90–94.

Scheible W-R., Gonzalez-Fontes A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M., Stitt M. (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **9**:783–798

Scheible W-R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelash D., Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol* **136**:2483–2499

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

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

Silveira, R.L.V.De A. Efeito do potássio no crescimento, nas concentrações dos nutrientes e nas características da madeira juvenil de progênies de *Eucalyptus grandis* w. hill ex maiden cultivadas em solução nutritiva. Piracicaba, 2000. 169p. Tese (Doutorado) – ESALQ, Universidade de São Paulo.

Smethurst, P.; Holz, G.; Moroni, M.; Baillie, C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. *Forestry Ecology Management* 193:63–80, 2004.

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

Srebotnik, E.; Messner, K. (1994) A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.1383–1386.

Stitt, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Curr Opin Plant Biology**, v.2, p.178–186, 1999.

Stracke, R. et al. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 447–456

Suárez M.F., Avila C., Gallardo F., Cantón F.R., García-Gutiérrez A., Claros M.G. and Cánovas F.M. (2002) Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 891–904

Suzek B.E., Huang H., McGarvey P., Mazumber R. & Wu C.H. (2007) Uniref: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* **23** (10), 1282-1288.

Trevisan S., Manoli A., Begheldo M., Nonis A., Enna M., Vaccaro S., Caporale G., Ruperti B. & Quaggiotti S. (2011) Transcriptome analysis reveals coordinated spatiotemporal regulation of hemoglobin and nitrate reductase in response to nitrate in maize roots. *New Phytologist* **192**, 338–352.

Ulitsky I., Maron-Katz A., Shavit S., Sagir D., Linhart C., Elkon R., Tanay A., Sharan R., Shiloh Y. & Shamir R. (2010) Expander: from expression microarrays to networks and functions. *Nature Protocols* **5** (2), 303-322.

Valverde, R.S.; Neiva, S.A.; Soares, N.S. Biotecnologia e competitividade das plantações florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, cap.17, p. 363-374.

van den Broeck H.C., Maliepaard C., Ebskamp M.J.M., Toonen M.A.J. & Koops A.J. (2008) Differential expression of genes involved in C1 metabolism and lignin biosynthesis in wooden core and bast tissues of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Science* **174**, 205–220.

Vanholme R., Brecht Demedts B., Morreel K., Ralph J. & Boerjan W. (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153** (3), 895-905.

Vitousek, P.M.; Howarth, R.W. (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochem* 13:87–115

Wang R., Guegler K., LaBrie S.T. & Crawford N.M. (2000) Genomic Analysis of a Nutrient Response in *Arabidopsis* Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. *The Plant Cell* **12**, 1491–1509.

Wang H., Avci U., Nakashima J., Hahn M.G., Chen F. & Dixon R.A. (2010) Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *PNAS* **107** (51), 22338–22343.

Wang, R.C.; Okamoto, M.; Xing, X.J.; Crawford, N.M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulphate metabolism. *Plant Physiology*, v.132, p.556–567, 2003.

Wang, R.C.; Tischner, R.; Gutierrez, R.A.; Hoffman, M.; Xing, X.J.; Chen, M.S.; Coruzzi, G.; Crawford, N.M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.136, p.2512–2522, 2004.

Xu G., Fan X. & Miller A.J. (2012) Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 153-182.

Yanhui, C. et al. (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol. Bio.* 60, 107–124

Yordanov Y., Regan S. & Busov V. (2010) Members of the Lateral Organ Boundaries Domain (LBD) transcription factors family are involved in regulation of secondary growth in *Populus*. *Plant Cell* **22**, 3662–3677.

Zhang J, Elo A, Helariutta Y (2011) *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol.* 22:293-299.

Zhao Q, Dixon RA (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant Sci* 16:227-233.

Zhong R, Lee C, Ye ZH (2010a) Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. *Trends Plant Sci* 15:625-632.

Zhong R, Lee C, Ye ZH (2010b) Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. *Plant Physiol* 152:1044-1055.

Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH (2008) A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:248-266.

Zhong R, Richardson, E.A., and Ye, Z.-H. (2007) The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2776-2792.

Zhong R, Ye ZH (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 10: 564-572.

Zhong R., Lee C., Zhou J., McCarthy R.L. & Ye ZH. (2008) A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 2763–2782.

Zhong R. & Ye ZH. (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior* **4** (11), 1028-1034.

ANEXOS

ANEXO 1

Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*

Running title: N fertilization impacts *Eucalyptus* xylem

Eduardo Leal Oliveira Camargo^{1,2}, Leandro Costa Nascimento¹, Marçal Soler², Marcela Mendes Salazar¹, Jorge Lepikson-Neto¹, Wesley Leoricy Marques¹, Ana Alves^{3,4}, Paulo José Pereira Lima Teixeira¹, Piotr Mieczkowski⁵, Marcelo Falsarella Carazzolle¹, Yves Martinez⁶, Ana Carolina Deckmann¹, José Carlos Rodrigues^{3,4}, Jacqueline Grima-Pettenati², Gonçalo Amarante Guimarães Pereira¹

¹Universidade Estadual de Campinas; UNICAMP; Instituto de Biologia; Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes; Laboratório de Genômica e Expressão

²Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546: CNRS - Université de Toulouse III (UPS), Auzeville, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

³Tropical Research Institute of Portugal (IICT), Forestry and Forest Products Group, Tapada da Ajuda, Lisboa, Portugal

⁴Centro de Estudos Florestais, Tapada da Ajuda, Lisboa, Portugal

⁵University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC

⁶Fédération de Recherche “Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité” - 24 Chemin de borde rouge - BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan – France

1 **Co-authors for correspondence:**

2 G. A. G. Pereira

3 Universidade Estadual de Campinas; UNICAMP ; Instituto de Biologia ; Departamento de
4 Genética, Evolução e Bioagentes ; Laboratório de Genômica e Expressão

5 Tel: +55 19 35216237

6 email: goncalo@unicamp.br

7

8 J. Grima-Pettenati

9 Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546: CNRS - Université de Toulouse III
10 (UPS), Auzeville, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France

11 Tel :+33 5 34 32 38 13

12 email: grima@lrsv.ups-tlse.fr

13

Abstract

Nitrogen is the main nutrient required for tree growth and biomass accumulation. In this study, we analyzed the effects of contrasting nitrogen fertilization treatments on the phenotypes of fast growing *Eucalyptus* hybrids (*E. urophylla* x *E. grandis*) with a special focus on xylem secondary cell walls and global gene expression patterns. Histological observations of the xylem secondary cell walls further confirmed by chemical analyses showed that lignin was reduced by luxuriant fertilization, whereas a consistent lignin deposition was observed in trees grown in N-limiting conditions. Comparative RNAseq analyses showed that 1,469 genes were differentially expressed and exhibited consistent N-dependent expression patterns. Notably, they include genes of the nitrogen, phenylpropanoid and C1 metabolisms. The down-regulation of the lignin biosynthetic genes in response to high N availability was confirmed RT-qPCR and is in agreement with the reduced amount of lignin in xylem secondary cell walls. This work enabled us to identify at the whole genome level xylem genes differentially regulated by N status, some being involved in the environmental control of xylogenesis. It further illustrates that N fertilization can be used to alter the quantity and quality of lignocellulosic biomass in *Eucalyptus* offering exiting prospects for the use of short coppices plantations to produce second generation biofuels.

KEYWORD INDEX

Nitrogen fertilization, *Eucalyptus*, lignocellulosic biomass, lignin, wood, RNA sequencing

INTRODUCTION

Plants have the capability to produce biomass from carbon dioxide, light energy, water and nutrients, the last two been important limiting factors to growth and development

(Rennenberg & Schmidt 2010). With the current global demand for energy, plant biomass has become the main gamble as a renewable and environmentally cost-effective new feedstock to chemicals and biofuel production (Carpita 2011; Séguin 2011; Mansfield, Kang & Chapple 2012a; Mizrachi, Mansfield & Myburg 2012b).

This bioenergy potential now converge the interests to understand the molecular mechanisms that control the plant biomass production and improve plant biomass yield (Demura & Ye, 2010). Plant biomass yield is determined by a number of environmental factors, such as the efficiencies of the capture and conversion of solar energy, water and nutrients. Among nutrients, Nitrogen (N) is considered as the main limiting factor for plant growth and development (Xu, Fan & Miller 2012) and the productivity of agricultural crops and commercial forests is dependent on the application of large quantities of costly N fertilizers. The effects of nitrogen fertilizers on high-yielding trees productivity are well documented, whereas only a few studies have addressed the effects of nitrogen fertilization on the properties of wood (Pitre, Cooke & Mackay 2007a; Pitre et al. 2007b; Pitre et al. 2010; Euring et al. 2012; Li et al. 2012; Plavcová et al. 2012).

This question is important and timely because wood, which represents the main source for terrestrial biomass production, is the major feedstock for pulp and paper production and will be increasingly exploited for the production of chemicals and bioenergy within the context of sustainable development (Boudet et al. 2003). Because of their fast growth, valuable wood properties, wide adaptability to soils and climates, and ease of management through coppicing, *Eucalyptus* and their hybrids are the most widely planted hardwood in the world (Eldridge et al. 1993; Potts 2004). These world's leading sources of lignocellulose biomass supply high quality raw material for pulp, paper, timber and energy (Grattapalia & Kirst 2008) and could also provide sustainable and cost-efficient production of lignocellulosic second-generation biofuels (Mizrachi

et al. 2012a, b). The main limitation to this objective is wood recalcitrance to degradation, which is dependent on the structure and composition of lignified secondary cell walls (Séguin 2011; Mizrachi et al. 2012a, b).

The secondary cell walls are mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin. Lignin is the second most abundant plant biopolymer deposited predominantly in the secondary walls of tracheary elements and fibers in wood (Zhong & Ye 2009). It is produced by the dehydrogenative polymerization of essentially three different hydroxycinnamyl alcohols (*p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohol) that differ in the degree of methoxylation at the C₃ and C₅ positions of the aromatic ring (Baucher et al. 2003). The deposition of this polymer confers rigidity and also protects the cell wall polysaccharides from pathogens and microbial degradation (Vanholme et al. 2010). This high resistance to degradation is also one of the most important industrial limitations, where lignin impairs the accessibility of cellulose during kraft pulping as well as during saccharification, a key step in the process of bioethanol production. The lignin biosynthesis requires a fine temporal and spatial transcriptional regulation, which can be influenced by environmental conditions (Grima-Pettenati et al. 2012).

Increasing evidences support that not only the quantity but also the quality of lignocellulosic material can be substantially altered by manipulating the environment in which feedstock species are grown (Canam & Campbell 2009 and ref therein). In poplar, nitrogen availability has been described to influence growth and development as well as xylogenesis. Fiber morphology, secondary cell wall structure and composition were modified in response to high N supply (Pitre et al. 2007a; Plavcová et al. 2012; Li et al. 2012), including lignification pattern (Pitre et al. 2007b; Euring et al. 2012; Li et al. 2012). Further mRNA profiles analysis showed that nitrogen fertilization has overlapping effects with tension wood formation (Pitre et al. 2010) and also pointed some candidate genes potentially related to xylem hydraulic and

1 structural traits (Plavcová et al. 2012). Moreover, using pedigree of pseudo-backcrossed hybrid
2 poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*), Novaes et al. have shown N fertilization
3 significantly increased all growth traits as well as the amount of cellulose and hemicelluloses in
4 the wood which was concomitant to a decrease in lignin content. This negative genetic
5 correlation between cellulose and lignin observed by Novaes et al. (2009, 2010) in populations of
6 poplar hybrids was also found in *Eucalyptus* (Kirst et al. 2004). Among the diverse managements
7 procedures displaying effects on wood quality, manipulating nitrogen availability, one of the
8 most limiting nutrients for tree growth and carbon sequestration, appears as a promising strategy
9 (Canam & Campbell, 2009).

10 In order to investigate the impact of nitrogen availability on growth, wood formation and
11 quality in *Eucalyptus*, we subjected commercial high yielding and fast-growing eucalypt hybrids
12 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) to four distinct N fertilization treatments. Phenotypic
13 observations were further completed by histological and chemical analyses of xylem cell walls. A
14 comparative xylem transcriptome analysis was performed between trees supplemented with
15 limiting and luxuriant N fertilization, respectively using next generation sequencing. This work
16 provides a global picture of the transcriptome of eucalyptus xylem in response to nitrogen
17 management and illustrates the phenotypic plasticity of the secondary cell wall structure and
18 composition

20 MATERIAL AND METHODS

21 Plant material and nitrogen treatments

22 Three month-old rooted cuttings of a commercial *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*
23 hybrid (clone IPB2-H15, kindly provided by International Paper do Brasil) were grown in
24 greenhouse conditions, in pots containing inactive substrate. Three hundred trees exhibiting

homogeneous size and developmental stage were selected and 75 plants were randomly attributed to each of the four nitrogen treatments.

The young trees were fertilized daily during 30 days with complete nutrient solution (Sarruge 1975) where the level of N was adjusted with NH_4NO_3 to final concentrations of 7.5 mM for limiting N (N^-), 15mM for regular N (N) and 30 mM for luxuriant N (N^+). In order to evaluate the potential impact of NO_3 on monolignols biosynthesis, which has been described in Fritz et al. (2006), a second luxuriant N treatment (NO_3) was added where the final concentration of 30 mM of N was adjusted with KNO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Histological analysis

Short stems segments (20 mm) were sampled at 5 cm of the basis of the stem of 5 plants per N treatment. The fragments were fixed at FAA 50 buffer (Formaldehyde, Acetic Acid, Ethanol 50% - 1:1:18 v/v) for 48h and transferred to ethanol 70% until use. Stem transverse sections (80 μm thick) were obtained with a Sapphire knife on an automatic vibrating blade microtome (Leica VT 1000S). Sections were stained with the Weisner reagent (phloroglucinol-HCl) and immediately observed under bright-field microscopy (DM IRBE, Leica) coupled with a CCD camera (DFC 300 FX, Leica).

For scanning electron microscopy (SEM), samples were dehydrated in an ethanol series and submitted to a critical-point dry with CO_2 as a transitional fluid. The dried tissues were coated with gold-palladium (20nm) in a Jeol JFC1100 and analyzed using a scanning electron microscope (Hitachi S450) at 15KV.

Chemical analysis

The *Eucalyptus* stems were sampled in 3 pools of 5 stems for each N treatment. After removing the bark, the differentiating xylem tissue was scrapped, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and ground to a powder in a ball mill (Tecnal Ltda). The lignin content (both total and Klason) was predicted using NIR-PLSR models. NIR spectra were collected in a Bruker-MPA spectrometer equipped with an integration sphere. The spectra were collected with a resolution of 8 cm⁻¹ over the wave number range (12500 – 4000 cm⁻¹) and for each spectrum 100 scans were taken. Analytical pyrolysis was performed using a CDS Pyroprobe 1000 with a coil filament probe connected to a GC (Agilent 6890) with flame ionization via a heated interface (270 °C). The pyrolysis was carried out at 600 °C for 5 s, using 75 µg of the extractive-free milled samples. Details of the conditions and quantification procedures have been published elsewhere (Alves et al. 2006, 2011, 2012; Rodrigues et al. 1999, 2001).

RNA extraction

For RNA extraction, the stems of the *Eucalyptus* plants were harvested and after removing the bark, the xylem tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For each N treatment, 60 eucalypts plants were sampled and pooled into three biological replicates (n=20). The total RNA was extracted according to Le Provost *et al.* (2007). RNA quantity and quality was checked with a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo) and 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Illumina sequencing

The mRNA-seq libraries were prepared at the High Throughput Sequencing Facility at Center of Genome, University of North Carolina, USA, using 10 µg of total RNA according to the Illumina's protocol instructions, following a room temperature gel extraction step to avoid

under-representation of AT-rich sequences (Quail et al. 2008). The quality and quantity of each library were verified by Bioanalyzer Chip DNA 1000 series II (Agilent). For each library, one lane of an Illumina Genome Analyser IIX was used to produce the 36 bp single-end sequences.

Eucalyptus data set construction

The data set used in the analysis was constructed based on two public eucalyptus ESTs (Expressed Sequence Tags) database and a *de novo* assembly from our RNA sequencing reads. The Eucatoul (<http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/eucatoul>) contains 17,079 unigenes (7,921 contigs and 9,158 singlets) based on wood-related (Rengel et al. 2009) and cold-tolerant (Keller et al. 2009) libraries. The Eucspresso (<http://eucgenie.org>) consists in an expressed gene catalog from a commercial clone of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* containing 18,894 contigs greater than 200 bp (18,606 with significant similarity with the *E. grandis* genome) (Mizrachi et al. 2010).

To perform the *de novo* assembly, the reads produced by Illumina sequencing from all the four libraries were aligned against the filtered public data set using SOAP2 aligner (Li et al. 2009). The reads that did not map were then assembled using the Trinity program (Grabherr et al. 2011) configured to allow contigs with at least 200 bp and turning on the parameter “--run_butterfly”.

An automatic annotation of all contigs was performed using the Autofact program (Koski et al. 2005); capable to resume the annotation based on sequence similarity searches in several databases. For this, the BLASTx (Altschul et al. 1997) (e-value cutoff of 1e-5) was used to align the contigs against some public databases, including: non-redundant (NR) database of *NCBI*, Uniref90 and Uniref100 – databases containing clustered sets of proteins from Uniprot (Suzek et al. 2007), Pfam – database of proteins families (Bateman et al. 2002), KEGG – database of

1 metabolic pathways (Kanehisa & Goto 2000) and TAIR (version 10) – database of *Arabidopsis*
2 proteins. Functional annotation (GO) was performed using BLAST2GO (Conesa et al. 2005) with
3 default parameters.

4 5 **Reads alignment and gene expression statistical analysis**

6 The Illumina reads were aligned against the data set (public and *de novo*) using the
7 program SOAP2 (Li et al. 2009), configured to allow up to two mismatches (SNPs can generate
8 mismatches in the alignment, especially in our cases where the sequences originate from an
9 hybrid), discard sequences with “N”s and return all optimal alignments.

10 The expression level for each contig was estimated using the “reads per kilobase of exon per
11 million fragments mapped” (RPKM) value (Mortazavi et al. 2008). Pairwise comparisons were
12 performed between the RPKM values from each library, using a T test at 99% of confidence rate
13 (cut off of 0.01). Expression data of the differentially expressed genes (DEG) were log₂
14 transformed and further standardized using the EXPANDER 6 software (Ulitsky et al. 2010),
15 which recalculates all gene RPKM values by giving a mean of 0 and a variance of 1 for each gene
16 and taking into account the four treatments. This function is important to better distinguish gene
17 expression differences between treatments. Standardized log₂ RPKM of the DEG for each of the
18 four N treatments were subjected to principal component analysis (PCA) enabling a graphical
19 representation of the correlation between variables (DEG in each treatment).

20 21 **Data validation by RT-qPCR**

22 RNA from each of the three biological replicates corresponding N⁺ and N⁻ *Eucalyptus*
23 xylem were DNase treated and subjected to cDNA synthesis as explained in Cassan-Wang et al.
24 (2012). PCR primers were described in Carocha et al. (2013). The high-throughput microfluidic

qPCR assays were performed at the Genotoul Platform (<http://genomique.genotoul.fr/>) using the BioMark® 96:96 Dynamic Array (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA), as described in Cassan-Wang et al. (2012). The efficiency of each pair of primers was determined by plotting the Ct values obtained for serial dilutions of a mixture of all cDNAs and the equation $\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. The relative transcript abundance for each gene was calculated as described by Pfaffl (2001), $[(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-sample)}} / (E_{\text{reference}})^{\Delta\text{Ct reference (control-sample)}}]$. The geometric mean of the ΔCts of five validated housekeeping genes [*SAND* (Eucgr.B02502), *PP2A1* (Eucgr.B03386), *EF1 α* (Eucgr.B02473), *IDH* (Eucgr.F02901) and *PP2A3* (Eucgr.B03031)] was used as the reference (Cassan-Wang et al. 2012). Each transcript abundance was standardized using the geometric mean of the corresponding N+ and N- replicates as a control.

RESULTS AND DISCUSSION

Nitrogen availability affects *Eucalyptus* growth and development

The effects of nitrogen (N) fertilization were investigated on young trees of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (clone IPB2-H15) subjected to four nitrogen (N) treatments, designed as limiting (N-), regular (N) and luxuriant (N+ and NO₃). The availability of N resulted in marked differences in plants growth and development. The limiting (N-) and luxuriant (N+) treatments generated the most contrasting phenotypes (Figure 1). On Figure 1a, representative plants grown in N- and N+, respectively are presented. The plants subjected during 30 days to luxuriant nitrogen fertilization (N+) displayed an increase in plant height (16%) and stem diameter (20%) as compared to plants supplemented with restricted N (N-) (Figure 1b, c). Both luxuriant treatments (N+ and NO₃+) similarly contributed to enhance tree growth. Such an effect has already been reported for others tree species (Cooke, Martin & Davis 2005; Pitre et al. 2007a;

Pitre et al. 2010). Leaves dimensions and color were also influenced by N availability. Plants grown under N⁻ presented dramatically smaller and lighter green-colored leaves as compared with those from plants grown under regular and especially luxuriant N. The Figure 1d shows a closer up of representative leaves from the most contrasting treatments (N⁻ and N⁺). The leaves from N⁺ plants exhibited a dark green color indicating higher chlorophyll content than those from limiting N and even from regular N supply. The purple color of the young leaves developed under N limitation corresponds to anthocyanin accumulation, a common indicator of biotic and abiotic stresses. In *Arabidopsis*, induction of anthocyanin synthesis has been described as an adaptation mechanism in response to N stress, which is controlled by the *NLA* gene (Peng et al. 2008).

Nitrogen fertilization impacts *Eucalyptus* secondary cell walls composition and structure

The lignification patterns of xylem secondary cell walls from the basal part of the main stems of *Eucalyptus* trees were evaluated by staining stem sections with phloroglucinol-HCl (Figure 2a). The intensity of the staining with phloroglucinol is usually considered as being proportional to the lignin content.

As evidenced by the strong red staining, the xylem cell walls of plants grown in limiting nitrogen conditions (N⁻) appeared to contain more lignins (Figure 2a-i) than those of trees supplied with regular N (N) (Figure 2a-ii). An opposite and clear trend was observed in the xylem cell walls of N⁺ trees (Figure 2a-iii). The red coloration in the latter (Figure 2a-iii) was mostly concentrated in cells surrounding the vessels, whereas the parenchyma fibres showed a lower degree of lignification as indicated by a very faint staining. Both luxuriant (N⁺ and NO₃⁻) treatments presented similar patterns of lignification (data not shown). Closer observations of

1 xylem cells located close to the cambium zone revealed a faint staining in N⁺ plants especially as
2 compared to N⁻ (Figure 2a-iv,v,vi) suggesting that an excess of N also delays cells lignin
3 deposition. These observations are in agreement with those previously made on poplar trees,
4 where high nitrogen fertilization was described to decrease lignification deposition pattern in
5 xylem (Pitre et al. 2007b; Euring et al. 2012; Li et al. 2012).

6 We further analysed the secondary cell walls of Eucalyptus xylem using scanning
7 electron microscopy (Figure 2b). The comparison between N⁺ and N⁻ treated plants revealed
8 dramatic differences: N⁺ treated plants presented much weaker cell walls evidenced by squashed
9 xylem cells, in contrast to N⁻ treated plants where the cells shape remained almost intact. The
10 mechanical properties of the walls of trees grown under an excess of N were considerably
11 affected, probably as consequence of reduced lignin content. The stems harboring these weaker
12 cell walls are likely more flexible and could be more susceptible to tension wood formation.
13 Indeed, in some N⁺ samples, we noticed the presence of cellulose gelatinous layers also called G-
14 layers in the lumen of fibres. The G-layers are formed in tension wood in response to mechanical
15 or gravitational stimuli (Plomion, Leprovost & Stokes 2001, Pilate et al. 2004a, b; Paux et al.
16 2005). In poplar, G-like layers were shown to be a direct consequence of an excess of N since
17 they were distributed all over the xylem and not restricted to one side of the stem as it is the case
18 for tension wood (Pitre et al. 2007a). In our samples, the G-like layers were found only on one
19 side of the stems indicating most probably the formation of tension wood as a stress response to
20 external stimuli and/or to growth physical constraints, than a direct consequence of high N
21 supply.

22 The histological observations were further confirmed by chemical analyses of the xylem
23 cell walls of limiting and luxuriant N fertilized samples. The lignin amounts (total and Klason)
24 were estimated using near-infrared (NIR) spectroscopy (Table I). Both the total amounts of lignin

as well as the Klason lignin were significantly reduced in xylem samples of trees grown under high nitrogen fertilization as compared to those grown under N limiting conditions. In addition, the pyrolysis analysis revealed that the monomeric composition of lignin was also affected by the nitrogen status. The S/G ratio was significantly lower in high nitrogen fertilized samples (1.60) as compared to low nitrogen ones (1.68). This decreased S/G ratio was the consequence of a lower quantity of S units and a higher proportion of G units.

Luxuriant and limiting nitrogen fertilization promote contrasting tendency of xylem gene expression

In order to get an insight in the transcriptomic changes underlying the phenotypic differences induced by the distinct N fertilization treatments, the xylem tissues of 20 young trees of *E. urophylla* x *E. grandis* were sampled and pooled for each N treatment (N-, N, N+ and NO₃). Four libraries were constructed from the total RNA and submitted to Illumina sequencing. The data set construction and the *de novo* assembly (detailed in Supplemental Figure S1) led to a large sequence set consisting of 36,781 unigenes.

The reads of each of the four libraries (N-, N, N+ and NO₃) were mapped onto the 36,781 unigenes and the RPKM values (reads per kilobase of exons per million of fragments mapped) were calculated for all the unigenes present in the libraries. Unigenes were considered expressed when the corresponding RPKM ≥ 1 in at least one of the libraries, resulting in a transcriptome composed by 34,925 unigenes ($\approx 95\%$ of original number of unigenes) (Supplemental Table 1).

In order to obtain an accurate picture of the genes differentially expressed in response to nitrogen availability, pairwise comparisons were performed between each of the contrasting treatments (N-, N+ and NO₃) against the regular one (N). In addition, a pairwise comparison was

1 performed between each of the two luxuriant (N⁺ and NO₃) against the limiting (N⁻) treatment.
2 The latter comparison between the most contrasting N treatments (N⁻ and N⁺), showed very clear
3 differences at the transcriptome level with 1,469 differently expressed genes (DEG) exhibiting
4 consistent nitrogen-dependent expression patterns (Supplemental Table S2). Genes were
5 considered differently expressed when fold-change $\geq \pm 1.5$ and P -value ≤ 0.01 .

6 We compared the distribution of the RPKM of these 34,925 unigenes to that of the 1469
7 genes found differentially expressed between N⁻ and N⁺ treatments and made three classes
8 depending on the transcript abundance in xylem: genes with low (RPKM<25), intermediate
9 ($300 > \text{RPKM} \geq 25$) and high ($\text{RPKM} \geq 300$) expression. The distribution of the DEG was
10 dramatically different from that of the total unigenes with a low proportion of the DEG in the
11 low-expressed class (Figure 3). In sharp contrast, this latter class contained the vast majority of
12 the total unigenes, with a large peak between 5-9 RPKM values. Most of the DEG were found in
13 the intermediate-class exhibiting a plateau-like shape between 27 and 300 RPKM. The number of
14 DEG in the high-expressed class was low but significantly higher than that of the total unigene
15 set. These results suggest that the main differences occurring at the xylem phenotype level are
16 likely involving genes with intermediate to high abundance of transcripts.

17 Standardized log₂ RPKM of the DEG for each of the four N treatments were subjected to
18 principal component analysis (PCA) enabling a graphical representation of the correlation
19 between variables (*i.e.* DEG in each treatment) (Figure 4a). The two N-luxuriant treatments (N⁺,
20 NO₃) were grouped together and exhibited a strong positive correlation with the first component
21 that explains 62% of the variance of the data. In sharp contrast, the N limiting treatment (N⁻)
22 showed a strong negative correlation with the first component. In other words, most of the DEG
23 that were highly expressed in the N-luxuriant treatments were weakly expressed in N-limiting

conditions and *vice versa*, indicating two main behaviors of genes according to N availability. These three treatments were weakly correlated to the second component, which explains 25% of the variance, whereas the regular nitrogen treatment (N) was strongly positively correlated to it. This indicates that some genes highly expressed in regular N conditions are down-regulated in the two extreme N fertilizations.

We then performed a hierarchical clustering analysis (HCA, Figure 4b) using the log2 standardized RPKM values of the DEG, which revealed two main trends: some genes (I) were induced by nitrogen deprivation and/or repressed by nitrogen luxuriant supply, while others (II) showed the opposite trend being repressed by nitrogen deprivation and/or induced by nitrogen luxuriant fertilization. These results are in line with the PCA, but also illustrates that even, if DEG in both luxuriant treatments exhibit the same tendency, they also display different response intensities.

A subset of the most representative genes from both expression trends (Figure 4b, trends I and II) is shown in Table 2 (for a complete list see Supplemental Table S3) and described below.

Genes induced by N deprivation and/or repressed by N luxuriant fertilization

Heat shock and stress-related proteins were the most abundant classes of genes (69 proteins, 17.4% from the total of DEG of this category). Heat shock proteins are known to induce responses due to environmental stresses, acting as chaperones to protect the proteins correct folding (Åkerfelt, Morimoto & Sistonen 2010). The high proportion of these proteins is in line with the strong stress phenotypes observed on plants grown in N limiting conditions.

In agreement with the cytological observations and the chemical analyses, the majority of the genes involved in the lignin biosynthesis pathway were up-regulated in N-limiting conditions. They included the genes belonging to the general phenylpropanoid metabolism, encoding

1 Phenylalanine ammonia lyase (PAL), Cinnamate-4-hydroxylase (C4H) and 4-Coumarate:CoA
2 ligase (4CL) which exhibited significant and coordinated up-related expression patterns. PAL,
3 C4H and 4CL were encoded by 3, 4 and 1 unigenes, respectively, all up-regulated in response to
4 nitrogen deprivation (Table 2). Within the lignin branch pathway, the transcript encoding
5 Ferulate 5-hydroxylase (F5H) that catalyzes a key step leading to the formation of the syringyl
6 (S) units in lignin was also up regulated by N- treatment. This expression pattern corroborates our
7 chemical analyses results where an increase of the syringyl units has been shown in N-limiting
8 conditions as compared to the N-luxuriant ones (Table 1). Similar patterns have also been
9 reported in poplar (Pitre et al. 2007b). We also identified two genes encoding *Laccase 17* a
10 specific isoform demonstrated recently to be involved in the lignin polymerization step in
11 Arabidopsis (Berthet et al. 2011).

12 The transcript levels of the genes of the whole lignin biosynthetic pathway were further
13 analyzed using RT-qPCR (Figure 5 and detailed on Supplemental Table S4). All the lignin
14 biosynthetic genes exhibited a significant differential expression between the two most
15 contrasting N treatments confirming the differences highlighted by RNA-seq transcripts for PAL,
16 C4H, 4CL and F5H and extending them to C3H, COMT, CCoAOMT, CCR, CAD which were
17 showing the same tendency according to RNAseq data ($P\text{-value} \leq 0.01$) although the fold change
18 was below the 1.5 fold cut off (Supplemental Table S1).

19 In line with the up-regulation of the lignin pathway genes, genes of the upstream
20 shikimate pathway such as those encoding Arogenate Dehydratase (ADT) isoforms able
21 modulate the carbon flux into lignins (Corea et al. 2012) were induced in response to N
22 deficiency (Table 2). All together these findings support the hypothesis of Canton et al. (2005),
23 who proposed that the NH_4^+ released by PAL during phenylalanine deamination is strictly
24 destined to synthesize arogenate for phenylalanine regeneration and not made available to the

1 general protein biosynthesis. According to these authors, the phenylpropanoid-N cycle is a tightly
2 compartmentalized process, separated from the general N metabolism in actively lignifying cells,
3 so that these cells can maintain high rates of lignification without causing a collapse of N content
4 in the plant. This hypothesis seems to be valid even under N-limiting conditions as suggested by
5 the increased transcript levels of genes of the shikimate and lignin pathway

6 Besides the up-regulation of the lignin pathway genes, a significant up-regulation of genes
7 encoding Serine HydroxyMethylTransferases 4 (SHMT) belonging to the C1 metabolism was
8 observed in N-limiting conditions. The C1 metabolism, which is especially active in tissues
9 producing methylated compounds such as lignin, has been proposed to be closely connected to
10 lignin biosynthesis through COMT and CCoAOMT (Hanson & Roje 2001; Cantón, Suárez &
11 Cánovas 2005; van den Broeck et al. 2008). The higher rate of lignin synthesis is apparently
12 connected to an increase in methyl donor recycling. S-adenosyl methionine must be regenerated
13 from S-adenosylhomocysteine (SAH) in C1 metabolism associated with 5,6,7,8 tetrahydrofolate
14 (THF) and may rely on formate or on serine and/or glycine as a one carbon donor. In the case of
15 N depletion, serine rather than formate seems to be used as a carbon donor as suggested by the
16 increased levels of SHMT in N deficient conditions. In addition, the NH_4^+ released by the
17 glycine to serine recycling could be reassimilated to produce phenylalanine as suggested by
18 Cantón et al. (2005).

19 As could be expected from the fact that the secondary cell walls formation is mainly
20 regulated at the transcriptional level (Demura & Fukuda 2007; Du & Groover 2010; Déjardin et
21 al. 2010; Grima-Pettenati et al. 2012), many SCW-related transcription factors (TF) were up-
22 regulated in response to N deprivation. They included members of MYB, bHLH, WRKY and
23 WD40 TF families, which contain members described to play a role in secondary wall formation
24 (Goicoichea et al. 2005, Legay et al. 2007, 2010, Wang et al. 2010, Demura & Fukuda 2007).

1 Among them, and in agreement it is also worth noting that a potential ortholog of the MYB
2 transcription factor *AtMYB85*, described as specifically controlling the biosynthesis of lignin
3 (Zhong et al. 2008) was also up-regulated in N limiting conditions.

5 **Genes repressed by N deprivation and/or induced by N luxuriant fertilization**

6 Genes corresponding to ribosomal proteins were by far the most represented category
7 (135; 55.4% from the total of inducible genes from this category). Ribosomal proteins are
8 directly correlated with protein synthesis, the principal sink of incorporated N. Several other
9 genes related to amino acids metabolism and transport were also induced by high N fertilization.
10 Among them are genes encoding the Glutamine dumper 3, an amino acid exporter highly
11 expressed in *Arabidopsis* vasculature (Pratelli et al. 2010) and recently shown to be induced by
12 high N supply in poplar (Plavcová et al. 2012).

13 One of the most N-inducible gene encoded a Formate Dehydrogenase (FDH). FDH was
14 represented by five unigenes, all very poorly expressed in N- or N conditions and highly induced
15 in both nitrogen luxuriant treatments. This enzyme is part of the C1 metabolism and known to be
16 induced by several stresses (Alekseeva, Savin & Tishkov 2011) and its induction by high
17 nitrogen content has not been reported before. It's tempting to link the oxidation of fomite into
18 NADH and CO₂ by FDH, to a possible control mechanism of intermediates supply to C1
19 metabolism. The *Hemoglobin1 (HB)* gene was also strongly induced in both N luxuriant
20 treatments. The expression of *HB* has been already shown to be correlated to the expression
21 profile of a nitrate reductase in maize roots (Trevisan et al. 2011). In addition, several non
22 symbiotic hemoglobins are known to scavenge NO through production of *S*-nitrosohemoglobin
23 (Perazzoli et al. 2004). Thus it is possible that the induction of HB under high N supply has a role
24 in NO detoxification.

We also identified genes directly correlated to nitrate uptake such as two potential orthologs of the *Arabidopsis NRT1*, a low-affinity nitrate transporter. Genes involved in nitrate reduction were represented by one *Nitrate reductase 1 (NR1)*, two *Nitrate reductase 2 (NR2)* and six *Nitrite reductase (NiR)* genes that showed similar expression patterns, being up-regulated under high nitrogen availability. An *UPMI* gene, which catalyses the biosynthesis of an essential cofactor for *NiR* (Wang et al. 2000), had a similar trend. Two genes encoding *Glutamine synthetase (GS)*, enzymes involved in ammonium assimilation and re-assimilation processes were up-regulated in both nitrogen luxuriant treatments.

Many transcription factors were also induced by N luxuriant supply. The most different expressed corresponded to an ortholog of *Arabidopsis Lateral Organ Boundary Domain (LBD38)*. This TF and other members of the family (*AtLBD37* and *AtLBD39*) were also induced by nitrate in *Arabidopsis* (Rubin et al. 2009) and recently described to be up-regulated by high N fertilization in poplar (Pitre et al. 2010; Plavcová et al. 2012). Some members of the LBD family are involved on the transcriptional regulation of secondary woody growth in poplar (Yordanov, Regan & Busov 2010).

The high rates of lignification under N limiting fertilization are likely maintained by the flux of recycled NH_4^+

To get a comprehensive picture that could explain how lignification observed on N limiting plants is maintained and even enhanced, we integrated in a scheme the nitrogen metabolism, the C1 cycle and the phenylpropanoid/lignin pathways (figure 6). We reported the expression ratios of all the genes involved in these metabolisms presenting differential expression ($P\text{-value} \leq 0.01$) in the RNAseq data, even if fold change was lower than ± 1.5 (supplemental table 1).

In plants, nitrogen is assimilated from inorganic forms NO_3^- and NH_4^+ , and incorporated into amino acids. NO_3^- is uptake by nitrate transporters (NTRs) and converted to nitrite (NO_2^-) by the Nitrate Reductase (NR) and reduced to NH_4^+ by a plastidial Glutamine Synthetase (GS2). As shown by the RNA seq data, the expression of all these genes involved in nitrogen metabolism exhibited the same trend, being induced in the presence of high N fertilization. The only exception was *NTR2.5* a high-affinity nitrate transporter that was, expectedly up-regulated in limiting N supply. In contrast to the plastidial GS2, two other glutamine synthetase 1 (GS1) and one Glutamate synthase (GOGAT) exhibited a pattern similar to *NTR2.5*. The cytosolic isoform of glutamine synthetase (GS1) is involved both in primary nitrogen assimilation and recycling (Bernard & Habash 2009). The capacity of GS1 to reassimilate N from proteolysis and even from L-phenylalanine deamination has been described (Bernard & Habash 2009). GS1 has also been shown to co-express with PAL in conifer xylem cells (Suárez et al. 2002; Cantón et al. 2005; Cánovas et al. 2007). The PAL genes as well as the genes of the common phenylpropanoid metabolism and the lignin branch pathway are induced in N limiting conditions. These results suggest that an efficient N recycling mechanism, similar to that proposed by Canton et al (2005) in cells undergoing active lignification in trees, is induced in N limiting conditions and contributes to maintain a high rate of lignin biosynthesis. In this mechanism, the NH_4^+ liberated by PAL activity is incorporated by a cytosolic glutamine synthetase (GS1)/GOGAT and recycled into L-phenylalanine via Arogenate (Cantón et al. 2005). The high induction of the transcript abundance of the 5 genes encoding Arogenate dehydratases in N- further strengthens this hypothesis (Figure 6).

CONCLUSIONS

We have shown here that N supply impacts secondary cell wall composition and structure

1 and that lignin seemed to be the main biopolymer affected, illustrating the high phenotypic
2 plasticity of the secondary cell walls in response to nutrient availability. Among the differentially
3 expressed genes between the two most contrasting treatments, those related to the
4 phenylpropanoid and lignin biosynthesis were down-regulated in response to luxuriant nitrogen
5 fertilization, in agreement with the phenotypic modifications observed. Some transcription
6 factors exhibiting a clear and consistent nitrogen-dependent expression pattern could be identified
7 as potentially controlling xylogenesis in response to environment cues.

8 We were also able to establish that in *Eucalyptus* under N deprivation, a mechanism involving
9 the recycle of ammonium by arogenate is up-regulated in order to maintain the flux of nitrogen
10 into lignin biosynthesis. Finally, we have shown that nitrogen fertilization, which is a common
11 field management practice in commercial Eucalyptus forests, can be used not only to enhance
12 biomass production but also wood quality. This is particularly important for instance when
13 lignocellulosic biomass is used for second generation bioethanol production since lignin hinders
14 cellulose accessibility during the saccharification step. Our findings thereby reinforce and extend
15 the results obtained in poplar, offering exiting possibilities to improve lignocellulosic biomass
16 quantity and quality and making it more suitable for industrial end-uses by the means of field
17 management practises such as N fertilization.

18 19 **ACKNOWLEDGEMENTS**

20 The authors would like to thank Hua Cassan-Wang, Nathalie Ladouce, Victor Carrocha (LRSV)
21 and the Plateforme Génomique Génopole Toulouse/Midi- Pyrénées (Genotoul) for advice and
22 technical assistance with high-throughput Biomark Fluidigm qRT-PCR amplifications; Luis
23 Fernando Silva, Adriano Almeida and Carla Garcia (International Paper do Brasil) for the
24 biological material and financial support. ELOC was supported by grants from FAPESP (Process

Number: 2008/53520-3). MS was supported by a fellowship “Beatriu de Pinós” thanks to the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya. This work was partially supported by grants from the ANR France (Project Tree For Joules ANR-2010-KBBE-007-01; Labex TULIP ANR -10-LABX-41).

REFERENCES

Åkerfelt M., Morimoto R.I. & Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 545-555.

Alekseeva A.A., Savin S.S. & Tishkov V.I. (2011) NAD(+)-dependent Formate Dehydrogenase from Plants. *Acta Naturae* **3** (4), 38-54.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25** (17), 3389–3402.

Alves A., Schwanninger M., Pereira H. & Rodrigues, J. (2006) Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood - Part 1: Comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **76** (1-2), 209–213.

Alves A., Simões R., Santos C., Potts B., Rodrigues J. & Schwanninger M. (2012) Determination of Eucalyptus globulus wood extractives content by NIR-based PLS-R models: Comparison between extraction procedures. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **20**, 275-285.

Alves A., Simões R., Stackpole D. J., Vaillancourt R. E., Potts B. M., Schwanninger M. & Rodrigues, J. (2011) Determination of the syringyl/guaiacyl ratio of Eucalyptus globulus wood lignin by near infrared-based partial least squares regression models using analytical pyrolysis as the reference method. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **19** (5), 343-348.

Arvidsson S., Kwasniewski M., Riaño-Pachón D.M. & Mueller-Roeber B. (2008) QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**:465.

Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Etwiller L., Griffiths-Jones S., Howe K.L., Marshall M. & Sonnhammer E.L.L. (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* **30** (1), 276-280.

Baucher M., Halpin C., Petit-Conil M. & Boerjan W. (2003) Lignin: Genetic Engineering and Impact on Pulping. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 305–350.

Bernard S.M. & Habash D.Z. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* **182**, 608–620.

Berthet S., Demont-Caulet N., Pollet B. et al. (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of Arabidopsis thaliana stems. *Plant Cell* **23** (3), 1124-1137.

Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J. & Goffner D. (2003) Lignins and lignocellulosics: a

1 better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* **12**, 576-581.

2
3 Canam, T. and Campbell, M. M. (2009) Genes and nitrogen fuel wood formation. *New*
4 *Phytologist* **182**, 783–785.

5
6 Cánovas F.M., Avila C., Cantón F.R., Cañas R.A. & de la Torre F. (2007) Ammonium
7 assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* **58** (9),
8 2307–2318.

9
10 Cantón F.R., Suárez M.F. & Cánovas F.M. (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization
11 and recycling in trees. *Photosynthesis Research* **83**, 265–278.

12
13 Carpita N.C. (2011) Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for
14 improving biomass for bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 1–8.

15
16 Cassan-Wang H., Soler M, Yu H., Camargo E.L.O., Carocha V., Ladouce N., Savelli B., Paiva
17 J.A.P., Leplé JC. & Grima-Pettenati J. (2012) Reference Genes for High-Throughput Quantitative
18 RT-PCR Analysis of Gene Expression in Organs and Tissues of Eucalyptus Grown in Various
19 Environmental Conditions. *Plant and Cell Physiology* **53** (12), 2101-2116.

20
21 Conesa A., Gotz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a
22 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics
23 research. *Bioinformatics* **21** (18), 3674-3676.

- 1 Cooke J.E.K., Martin T.A. & Davis J.M. (2005) Short-term physiological and developmental
2 responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist* **167**, 41–52.
- 3
- 4 Corea O.R.A., Bedgar D.L., Davin, L.B. & Lewis, N.G. (2012) The arogenate dehydratase gene
5 family: Towards understanding differential regulation of carbon flux through phenylalanine into
6 primary versus secondary metabolic pathways. *Phytochemistry* **82**, 22–37.
- 7
- 8 Déjardin A., Laurans F., Arnaud D., Breton C., Pilate G., Leplé JC. (2010) Wood formation in
9 Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 325–334.
- 10
- 11 Demura T. & Ye ZH. (2010) Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant*
12 *Biology* **13**, 299–304.
- 13
- 14 Demura T. & Fukuda H. (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *TRENDS in Plant*
15 *Science* **12** (2), 64–70.
- 16
- 17 Du J. & Groover A. (2010) Transcriptional Regulation of Secondary Growth and Wood
18 Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52** (1), 17–27
- 19
- 20 Eldridge K., Davidson J., Harwood C. & Van Wyk G. (1993). Eucalypt domestication and
21 breeding. *Oxford, UK: Clarendon Press*.
- 22
- 23 Euring D., Löffke C., Teichmann T. & Polle A. (2012) Nitrogen fertilization has differential
24 effects on N allocation and lignin in two *Populus* species with contrasting ecology. *Trees* **26**,

1 1933–1942.

2
3 Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R. & Stitt M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the
4 carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism.
5 *The Plant Journal* **46**, 533–548.

6
7 Goicoechea M., Lacombe E., Legay S. et al. (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator
8 from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant*
9 *Journal* **43**, 553–567.

10
11 Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M. et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from
12 RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* **29**, 644–652.

13
14 Grattapaglia D. & Kirst M. (2008) Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to
15 breeding tools. *New Phytologist* **179**, 911–929.

16
17 Grima-Pettenati J., Soler M., Camargo E.L.O. & Wang H. (2012) Transcriptional Regulation of
18 the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights. In *Advances in Botanical*
19 *Research* **61** (eds L. Jouanin & C. Lapierre), pp. 173–218. Academic Press, Burlington

20
21 Hanson A.D. & Roje S. (2001) One-Carbon Metabolism in Higher Plants. *Annual Review of*
22 *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 119–137.

1 Kanehisa M. & Goto S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic*
2 *Acids Research* **28** (1), 27-30.

3
4 Keller G., Marchal T., San Clemente H., Navarro M., Ladouce N., Wincker P., Coloux A.,
5 Teulière C. & Marque C. (2009) Development and functional annotation of an 11,303-EST
6 collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes* **5**, 317-327.

7
8 Kirst M., Myburg A.A., De Leon J.P.G., Kirst M.E., Scott J. & Sederoff R. (2004) Coordinated
9 genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA
10 microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. *Plant Physiology* **135**, 2368–2378.

11
12 Koski L.B., Gray L.W., Lang B.F. & Burger G. (2005) AutoFACT: An Automatic Functional
13 Annotation and Classification Tool. *BMC Bioinformatics* **6**:151.

14
15 Legay S., Lacombe E., Goicoechea M., Brière C., Séguin A., Mackay J. & Grima-Pettenati J.
16 (2007) Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin
17 biosynthetic pathway. *Plant Science* **173**, 542–549.

18
19 Legay S., Sivadon P., Blervacq AS. et al. (2010) EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor
20 from *eucalyptus* negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and *poplar*.
21 *New Phytologist* **188**, 774–786.

22
23 Le Provost G., Herrera R., Paiva J.A.P., Chaumeil P., Salin F. & Plomion C. (2007) A
24 micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research* **40**, 291-

297.

Li H., Li M., Luo J. et al. (2012) N-fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fast-growing *Populus* species. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6173-6185.

Li R., Yu C., Li Y., Lam TW., Yiu SM., Kristiansen K. & Wang J. (2009) SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25** (15), 1966-1967.

Mansfield S.D., Kang KY. & Chapple C. (2012a) Designed for deconstruction – poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production. *New Phytologist* **194**, 91–101.

Mizrachi E., Hefer C.A., Ranik M., Joubert F. & Myburg A.A. (2010) *De novo* assembled expressed gene catalog of a fast-growing *Eucalyptus* tree produced by Illumina mRNA-Seq. *BMC Genomics* **11**:681

Mizrachi E., Mansfield S.D. & Myburg A.A. (2012b) Cellulose factories: advancing bioenergy production from forest trees. *New Phytologist* **194**, 54–62.

Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L. & Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**, 621-628.

Novaes E., Kirst M., Chiang V., Winter-Sederoff H. & Sederoff R. (2010) Lignin and Biomass:

1 A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. *Plant Physiology* **154**,
2 555–561.

3
4 Novaes E., Osorio L., Drost D.R. et al. (2009) Quantitative genetic analysis of biomass and wood
5 chemistry of *Populus* under different nitrogen levels. *New Phytologist* **182**, 878–890.

6
7 Paux E., Carocha V., Marques C., Mendes de Sousa A., Borralho N., Sivadon P. & Grima-
8 Pettenati J. (2005) Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood
9 formation. *New Phytologist* **167**, 89–100.

10
11 Peng M., Hudson D., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H., Bi YM. & Rothstein S.J. (2008)
12 Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis
13 which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany* **59** (11), 2933–2944.

14
15 Perazzoli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C., Zago E., Zeier A., Sonoda M., Lamb C. &
16 Delledonne M. (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide
17 bioactivity. *Plant Cell* **16**, 2785–2794.

18
19 Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
20 *Nucleic Acids Research* **29** (900), 2002 – 2007.

21
22 Pilate G., Déjardin A., Laurans F. & Leplé JC. (2004a) Tension wood as a model for functional
23 genomics of wood formation. *New Phytologist* **164**, 63–72.

- 1 Pilate G., Chabbert B., Cathala B., Yoshinaga A., Leplé JC., Laurans F., Lapierre C. & Ruel K.
2 (2004b) Lignification and tension wood. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 889–901
3
- 4 Pitre F.E., Cooke J.E.K. & Mackay J.J. (2007a) Short-term effects of nitrogen availability on
5 wood formation and fibre properties in hybrid poplar. *Trees* **21**, 249–259.
6
- 7 Pitre F.E., Pollet B., Lafarguette F., Cooke J.E.K., Mackay J.J. & Lapierre C. (2007b) Effects of
8 Increased Nitrogen Supply on the Lignification of Poplar Wood. *Journal of Agricultural and*
9 *Food Chemistry* **55**, 10306–10314.
10
- 11 Pitre F.E., Lafarguette F., Boyle B., Pavy N., Caron S., Dallaire N., Poulin PL., Ouellet M.,
12 Morency MJ., Wiebe N., Lim E.L., Urbain A., Mouille G., Cooke J.E.K. & Mackay J.J. (2010)
13 High nitrogen fertilization and stem leaning have overlapping effects on wood formation in
14 poplar but invoke largely distinct molecular pathways. *Tree Physiology* **30**, 1273–1289.
15
- 16 Plavcová, L., Hacke, U. G., Almeida-Rodriguez, A. M., Li, E. & Douglas, C. J. (2012) Gene
17 expression patterns underlying changes in xylem structure and function in response to increased
18 nitrogen availability in hybrid poplar. *Plant, Cell & Environment* **36**, 186–199
19
- 20 Plomion C., Leprovost G. & Stokes A. (2001) Wood Formation in Trees. *Plant Physiology* **127**
21 **(4)**, 1513-1523.
22
- 23 Potts B.M. (2004) Genetic improvement of eucalypts, *In: Encyclopedia of forest science (eds.*
24 *Burley J., Evans J., Youngquist J.A.), pp. 1480–1490. Oxford, UK: Elsevier Science.*

1
2 Pratelli R., Voll L.M., Horst R.J., Frommer W.B. & Pilot G. (2010) Stimulation of Nonselective
3 Amino Acid Export by Glutamine Dumper Proteins. *Plant Physiology* **152** (2), 762-773.

4
5 Quail M.A., Kozarewa I., Smith F., Scally A., Stephens P.J., Durbin R., Swerdlow H. & Turner
6 D.J. (2008) A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature*
7 *Methods* **5**,1005–1010.

8
9 Rengel D., San Clemente H., Servant F., Ladouce N., Paux E., Wincker P., Couloux A., Pierre
10 Sivadon P. & Grima-Pettenati J. (2009) A new genomic resource dedicated to wood formation in
11 *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* **9**:36.

12
13 Rennenberg H. & Schmidt S. (2010) Perennial lifestyle - an adaptation to nutrient limitation?
14 *Tree Physiology* **30**, 1047–1049.

15
16 Rodrigues J., Meier D., Faix O. & Pereira H. (1999) Determination of tree to tree variation in
17 syringyl/guaiacyl ratio of Eucalyptus globulus wood lignin by analytical pyrolysis. *Journal of*
18 *Analytical and Applied Pyrolysis* **48** (2), 121–128.

19
20 Rodrigues J., Graça J. & Pereira H. (2001) Influence of tree eccentric growth on
21 syringyl/guaiacyl ratio in Eucalyptus globulus wood lignin assessed by analytical pyrolysis.
22 *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **58-59**, 481-489.

23
24 Rubin G., Tohge T., Matsuda F., Saito K. & Scheible WR. (2009) Members of the LBD family of

transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in
Arabidopsis. *Plant Cell* **21** (11), 3567-3584.

Séguin A. (2011) How could forest trees play an important role as feedstock for bioenergy
production? *Current Opinion in Environmental Sustainability* **3**, 90–94.

Suárez M.F., Avila C., Gallardo F., Cantón F.R., García-Gutiérrez A., Claros M.G. and Cánovas
F.M. (2002) Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants.
Journal of Experimental Botany **53**, 891–904

Suzek B.E., Huang H., McGarvey P., Mazumber R. & Wu C.H. (2007) Uniref: comprehensive
and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* **23** (10), 1282-1288.

Trevisan S., Manoli A., Begheldo M., Nonis A., Enna M., Vaccaro S., Caporale G., Ruperti B. &
Quaggiotti S. (2011) Transcriptome analysis reveals coordinated spatiotemporal regulation of
hemoglobin and nitrate reductase in response to nitrate in maize roots. *New Phytologist* **192**, 338–
352.

Ulitsky I., Maron-Katz A., Shavit S., Sagir D., Linhart C., Elkon R., Tanay A., Sharan R., Shiloh
Y. & Shamir R. (2010) Expander: from expression microarrays to networks and functions.
Nature Protocols **5** (2), 303-322.

van den Broeck H.C., Maliepaard C., Ebskamp M.J.M., Toonen M.A.J. & Koops A.J. (2008)

Differential expression of genes involved in C1 metabolism and lignin biosynthesis in wooden core and bast tissues of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Science* **174**, 205–220.

Vanholme R., Brecht Demedts B., Morreel K., Ralph J. & Boerjan W. (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153** (3), 895-905.

Wang R., Guegler K., LaBrie S.T. & Crawford N.M. (2000) Genomic Analysis of a Nutrient Response in Arabidopsis Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. *The Plant Cell* **12**, 1491–1509.

Wang H., Avci U., Nakashima J., Hahn M.G., Chen F. & Dixon R.A. (2010) Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *PNAS* **107** (51), 22338–22343.

Xu G., Fan X. & Miller A.J. (2012) Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 153-182.

Yordanov Y., Regan S. & Busov V. (2010) Members of the Lateral Organ Boundaries Domain (LBD) transcription factors family are involved in regulation of secondary growth in *Populus*. *Plant Cell* **22**, 3662–3677.

Zhong R., Lee C., Zhou J., McCarthy R.L. & Ye ZH. (2008) A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 2763–2782.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

Zhong R. & Ye ZH. (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior* **4** (11), 1028-1034.

Figures legends:

Figure 1. Effects of limiting (N-) and luxuriant (N+) fertilizations on the growth and phenotypes of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* hybrids. (a) Representative young trees and corresponding leaves from the main stem submitted to limiting (N-) and luxuriant (N+) treatments for 30 days. Bar= 20 cm. (b) Plant height (Anova: *, $P < 0.01$) (c) Plant basal diameter (Anova: *, $P < 0.01$) (d) Closer view of the youngest leaves (upper part) and fully expanded leaves (lower part) from plants under N- and N+ treatments. Bar= 2 cm.

Figure 2. Effects of N fertilization on *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* xylem secondary cell walls. (a) Phloroglucinol-HCl staining of the basal stem sections from samples grown under N fertilization treatments (N-, R and N+). Bar= 100 μ m. (b) SEM images from xylem secondary cell walls under limiting (N-) and luxuriant (N+) treatments.

Figure 3. Distribution of all unigenes (grey line) and differently expressed genes (DEG, black) in classes of transcript abundance. The classes were defined as high (RPKM $\geq$ 300), intermediate (300>RPKM $\geq$ 25) and low (RPKM<25) RPKM values. Axis “x” in Log₂ scale.

Figure 4. Global analysis of the differently expressed genes between the contrasting N treatments. (a) PCA analysis of the DEG in each of the four treatment (b) Hierarchical clustering analysis of the DEG (I) genes induced by nitrogen deprivation and repressed by nitrogen luxuriant supply, (II) genes repressed by nitrogen deprivation and induced by nitrogen luxuriant fertilization. All analyses were based on RPKM values for the 4 N treatments and p-value $\leq$ 0,01.

Figure 5. Expression of selected lignin and secondary cell wall related genes by RT-qPCR.

Figure 6. Integrate view of nitrogen (N) and lignin metabolisms and expression profile from genes-related under limiting and luxuriant N fertilization. Nitrate (NO_3^-) is uptake by nitrate transporters (NTRs) and converted to nitrite (NO_2^-) by the nitrate reductase (NR) and in the plastid reduced to ammonium (NH_4^+). The NH_4^+ is incorporated by glutamine synthetase/glutamate synthase (GS2/GOGAT) into the amino acids. Cells in N deficiency and undergoing active lignification use an efficient N recycling mechanism where the NH_4^+ liberate by phenylalanine-ammonia lyase (PAL) are incorporate by a cytosolic glutamine synthetase (GS2) and recycle into phenylalanine. Under N deficiency, high rates of lignification are maintained by the flux of N recycled from phenylalanine deamination.

Table 1. Lignin chemical analysis from limiting (N-) and luxuriant (N+) treated plants. Lignin content (total and klason) was determined by NIR-PLSR models. Lignin-derived S and G monomers and ratio were calculated by pyrolysis analysis. Each repetition corresponded to 20-polluted plants. Percentage was calculated by 20 mg of lignin/ 100 mg dry mass. Anova statistic test: *, $P < 0.01$; ** $P < 0.001$

	NIR				Pyrolysis					
	Total lignin		Klason lignin		N-			N+		
	N-	N+	N-	N+	S(%)	G(%)	S/G	S(%)	G(%)	S/G
R1	27.6	26.7	20.4	19.2	62.7	37.3	1.69	61.4	38.6	1.59
R2	28.0	26.4	21.0	18.8	62.3	37.7	1.65	61.7	38.3	1.61
R3	27.5	26.3	19.9	19.0	62.8	37.2	1.69	61.5	38.5	1.59
Average	27.7	26.5 **	20.4	19.0*	62.6	37.4	1.68	61.5	38.4	1.60**
STD	0.28	0.21	0.58	0.19	0.26	0.26	0.02	0.15	0.15	0.01

1 **Table 2.** Subset of the most representative differently expressed genes.

Gene ID (EucDS)	Gene ID (TAIR)	Description	N+/N-	
			Fold	P-value
Nitrogen/Amino acids metabolism				
CD668569.1	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	-1,86	6,3E-11
contig_23319	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	-1,61	3,9E-03
Contig7054	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	-1,85	6,9E-03
de_novo_15907	AT4G13930.1	Serine hydroxymethyltransferase 4	-1,70	1,0E-16
contig_8461	AT2G27820.1	Prephenate dehydratase 1/ Arogenate dehydratase3	-2,26	1,5E-09
contig_15070	AT2G27820.1	Prephenate dehydratase 1/ Arogenate dehydratase3	-2,46	3,3E-03
contig_10858	AT1G08250.1	Arogenate dehydratase 6	-2,19	4,2E-06
de_novo_11386	AT1G08250.1	Arogenate dehydratase 6	-2,71	3,5E-05
de_novo_11507	AT3G44720.1	Arogenate dehydratase 4	-2,33	8,9E-51
contig_10937	AT5G18170.1	Glutamate dehydrogenase 1	-4,14	2,4E-03
de_novo_11901	AT1G12940.1	Nitrate transporter 2.5	-6,57	3,2E-12
de_novo_12308	AT4G13940.4	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	-1,70	6,7E-03
de_novo_11480	AT1G32450.1	Nitrate transporter 1.5	2,32	2,9E-04
de_novo_11781	AT1G32450.1	Nitrate transporter 1.5	2,25	5,5E-03
contig_94502	AT1G37130.1	Nitrate reductase 2	3,63	6,3E-03
de_novo_11752	AT1G37130.1	Nitrate reductase 2	3,30	3,7E-24
CU395994	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	7,79	7,6E-19
de_novo_11688	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	7,57	8,4E-03
CD670065	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	6,81	1,4E-04
CD669078	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	6,70	4,3E-03
de_novo_11644	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	6,65	1,7E-09
CU396904	AT2G15620.1	Nitrite reductase 1	6,53	6,6E-02
de_novo_19746	AT1G77760.1	Nitrate reductase 1	4,46	1,2E-08
de_novo_11746	AT5G40850.1	Urophorphyrin methylase III	11,16	6,4E-07
CD668172	AT5G35630.3	Glutamine synthetase 2	2,53	7,5E-10
contig_20989	AT5G35630.3	Glutamine synthetase 2	2,43	2,7E-04
de_novo_11573	AT5G57685.1	Glutamine dumper 3	4,38	8,1E-02
de_novo_11536	AT5G57685.1	Glutamine dumper 3	1,84	1,8E-05
Phenylpropanoid metabolism/Lignin Biosynthesis				
contig_10482	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	-1,56	1,4E-02
contig_21173	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	-1,68	2,4E-04
contig_16352	AT3G53260.1	Phenylalanine ammonia-lyase 2	-1,65	1,8E-01
contig_3622	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	-1,61	3,7E-02
Contig7339	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	-1,70	2,1E-02
BD224437.1	AT2G30490.1	Cinnamate-4-hydroxylase	-1,76	8,1E-04
contig_6919	AT1G51680.1	4-coumarate:CoA ligase 1	-1,65	3,4E-02

contig_390	AT4G36220.1	Ferulic acid 5-hydroxylase 1	-1,56	7,5E-02
contig_72476	AT2G40890.1	Cytochrome P450, C3H	-3,48	8,3E-03
de_novo_24790	AT5G54160.1	Caffeic O-methyltransferase1	-1,53	9,5E-32
contig_3127	AT5G60020.1	Laccase 17	-1,56	5,6E-04
contig_23816	AT5G60020.1	Laccase 17	-1,50	1,7E-03
Transcription factors				
contig_3124	AT4G22680.1	Myb domain protein 85	-1,57	4,6E-03
BD377759.1	AT2G23290.1	Myb domain protein 70	-2,14	8,5E-03
contig_18752	AT2G27580.2	A20/AN1-like zinc finger family protein	-2,14	7,4E-02
contig_41808	AT2G27580.2	A20/AN1-like zinc finger family protein	-1,53	6,2E-03
Contig3627	AT3G49930.1	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	-2,08	8,9E-04
contig_6574	AT3G54810.1	Plant-specific GATA-type zinc finger transcription factor family protein	-1,78	1,6E-126
contig_8449	AT1G14920.1	GRAS family transcription factor family protein	-1,98	9,4E-07
contig_3905	AT1G14920.1	GRAS family transcription factor family protein	-1,53	5,7E-03
contig_4005	AT1G78070.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	-1,91	6,5E-03
contig_17263	AT1G24530.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	-1,68	6,0E-02
de_novo_11342	AT3G20640.1	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	-1,82	7,3E-03
contig_7306	AT1G32640.1	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein	-1,54	7,5E-02
contig_16146	AT2G44745.1	WRKY family transcription factor	-1,55	8,3E-04
contig_4484	AT1G10200.1	GATA type zinc finger transcription factor family protein	2,41	4,9E-03
contig_89946	AT1G80840.1	WRKY DNA-binding protein 40	1,65	4,1E-02
CU401821	AT1G80840.1	WRKY DNA-binding protein 40	2,38	4,9E-11
contig_64900	AT2G38470.1	WRKY DNA-binding protein 33	1,79	1,5E-01
de_novo_11651	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	2,10	2,8E-03
de_novo_12111	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	1,79	1,4E-09
CD668471.1	AT3G02380.1	CONSTANS-like 2	2,00	7,2E-12
de_novo_11383	AT3G49940.1	LOB domain-containing protein 38	6,75	2,8E-43
contig_74960	AT4G31800.2	WRKY DNA-binding protein 18	1,73	1,4E-02
contig_74953	AT5G08790.1	NAC domain transcriptional regulator superfamily protein, ATAF2	1,95	1,7E-06
de_novo_11667	AT5G39660.2	Cycling DOF factor 2	1,94	3,5E-05
contig_12125	AT5G39660.2	Cycling DOF factor 2	1,71	1,7E-03
Other processes				
de_novo_11604	AT2G16060.1	Hemoglobin 1	87,88	1,9E-01
CU401963	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	99,23	6,5E-15
Contig5452	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	69,36	1,7E-05
contig_92267	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	57,00	1,1E-06
contig_94429	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	42,23	4,5E-02
CU396775	AT5G14780.1	Formate dehydrogenase	27,80	3,8E-03

Supporting information

Figure S1. Eucalyptus data set construction and *de novo* assembly of xylem RNA reads. After Illumina-Solexa sequencing, more than 123 million xylem single-end reads (about 4.50 Gbp) of 36 bp length were obtained of which 116,360,230 (about 4.20 Gbp) remained for further analysis after filtering to exclude ribosomal and low quality reads. In order to map the produced reads of our RNA sequencing, we constructed a eucalyptus dataset based on two public eucalyptus ESTs databases (Rengel *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2009; Mizrachi *et al.*, 2010). The overlap between these two public databases was filtered resulting in 21,582 sequences. The Illumina-Solexa xylem reads were then aligned against the filtered public databases resulting in the successful mapping of 92,317,189 reads (79.34% of the total number of reads). Subsequently, a *de novo* assembly was performed with the remaining 24,043,041 unmapped reads, which produced 15,199 contigs greater than 200 bp. The final data set consisted of 36,781 unigenes.

Table S1. RPKM values for all transcribed genes

Table S2. Differentially Expressed genes (Limiting vs Luxuriant treatments)

Table S3. Selected genes induced by nitrogen deprivation and/or repressed by nitrogen luxuriant supply; and repressed by nitrogen deprivation and/or induced by nitrogen luxuriant fertilization. (Level of expression in xylem; L-low, I-intermediate, H-high).

Table S4. RT-qPCR validation

ANEXO 2

Transcriptional Regulation of the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights. Jacqueline Grima-Pettenati, Marçal Soler, **Eduardo Leal Oliveira Camargo**, Hua Wang. *In Advances in Botanical Research*, 61 (2012) eds L. Jouanin & C. Lapierre, pp. 173-218. Academic Press, Burlington

(disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124160231000069>)



Advances in Botanical Research

Volume 61, 2012, Pages 173–218

Lignins — Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering



Chapter 6 – Transcriptional Regulation of the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights

Jacqueline Grima-Pettenati*,  , Marçal Soler*, Eduardo Leal O. Camargo*, [†], Hua Wang*

* Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546 : CNRS -Université de Toulouse III (UPS), BP 42617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France

[†] Laboratório de Genômica e Expressão, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00006-9>, How to Cite or Link Using DOI

Abstract

The discovery that AC elements coordinated the regulation of genes belonging to the entire lignin biosynthetic pathway was the first breakthrough in understanding how lignin biosynthesis is regulated. Since then, tremendous progress has been made in the identification and characterization of many transcription factors (TFs) that regulate the genes of the phenylpropanoid branch pathway leading to lignin. A major breakthrough consisted in the discovery of a hierarchical transcriptional network regulating the biosynthesis of lignified secondary walls (SWs) in *Arabidopsis*. The NAC TFs (VND/NST/SND) work as the first layer of master switches activating the whole SW biosynthetic network through the regulation of a cascade of downstream TFs. Among these, MYB46/83 act as a second layer of master switches. Recent findings, however, reveal that the regulation of SW formation is far more complex than initially thought, involving both positive and negative regulators, dual function regulators, feedback loops, combinatorial complexes and cross talk between pathways. Finally, because of the great potential that lignocellulosic biomass represents for the production of bioenergy, there is a great interest in further elucidating the molecular mechanisms underlying the regulation of lignified SW and subsequently applying this knowledge to improve their saccharification potential for the generation of biofuels.

Keywords

Lignin; Phenylpropanoid pathway; Wood; Regulation; Transcription factor; MYB; NAC

ANEXO 3

Identification of four *Eucalyptus* genes potentially involved in cell wall biosynthesis and evolutionarily related to SHINE transcription factors. Wesley Leoricy Marques, Marcela Mendes Salazar, **Eduardo Leal O. Camargo**, Jorge Lepikson-Neto, Ricardo Augusto Tiburcio, Leandro Costa do Nascimento, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. *Plant Growth Regulation* (2012), september.

(disponível em <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10725-012-9754-7>)

Plant Growth Regulation
March 2013, Volume 69, Issue 2, pp 203–208

Identification of four *Eucalyptus* genes potentially involved in cell wall biosynthesis and evolutionarily related to SHINE transcription factors

Wesley Leoricy Marques, Marcela Mendes Salazar, Eduardo Leal Oliveira Camargo, Jorge Lepikson-Neto, Ricardo Augusto Tiburcio, Leandro Costa do Nascimento, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



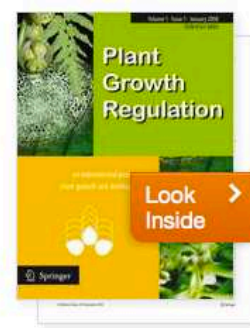
» Download PDF (445 KB)



» View Article

Abstract

Recently, a new *Arabidopsis thaliana* master regulator of plant cell wall biosynthesis was characterized. It was named SHINE transcription factor (SHINE TF). This work searched for homologous genes in *Eucalyptus grandis* genome draft. RNAseq data, phylogeny analysis and qRT-PCR experiments were performed to complement SHINE gene analysis. By similarity searches using *A. thaliana* SHINE genes, four sequences were identified in *Eucalyptus*. Two of them contain all conserved motifs and characteristic features of this family, being assumed as true SHINE TFs and named *EgrSHN1* and *EgrSHN2*. The other two sequences contain an incomplete 'mm' motif and were not considered true SHINE TFs, being further referred as *Egr33m* and *Egr40m*. Expression analysis revealed that *EgrSHN1* is more expressed in flowers than in leaves and immature xylem, and both *EgrSHN1* and *EgrSHN2* are absent from adult xylem RNAseq libraries. This expression profile is similar to *A. thaliana* orthologues. On the other hand, *Egr33m* and *Egr40m* expression was detected in adult xylems. The phylogenetic studies indicate that both *EgrSHNs* were originated by gene duplication events which, together with gene loss, are hypothesized as common events in SHINE evolution. In conclusion, it is possible that the overexpression of SHINE genes in *Eucalyptus* xylem can generate information about wood formation processes, allowing an effective increase in forest plantation productivity.



Share



Within this Article

- » Introduction
- » Materials and methods
- » Results and discussion
- » References
- » References

Other actions

- » Export citations
- » Register for Journal Updates [↗](#)
- » About This Journal [↗](#)
- » Reprints and Permissions [↗](#)

ANEXO 4

Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription–pcr analysis of gene expression in organs and tissues of *Eucalyptus* grown in various environmental conditions. Hua Cassan-Wang, Marçal Soler, Hong Yu, **Eduardo Leal O. Camargo**, Victor Carocha, Nathalie Ladouce, Bruno Savelli, Jorge A. P. Paiva, Jean-Charles Leplé, Jacqueline Grima-Pettenati. *Plant Cell Physiology* (2012), 53(12): 2101-2116.

(disponível em <http://pcp.oxfordjournals.org/content/53/12/2101.abstract>)

OXFORD JOURNALS

CONTACT USMY BASKETMY ACCOUNT

Plant & Cell Physiology

ABOUT THIS JOURNALCONTACT THIS JOURNALSUBSCRIPTIONSCURRENT ISSUEARCHIVESEARCH

Institution: BIBLIOTECA CENTRAL UNIV ESTADUAL CAMPINAS Sign In as Personal Subscriber

Oxford Journals > Life Sciences > Plant and Cell Physiology > Volume 53, Issue 12 > Pp. 2101-2116.

Reference Genes for High-Throughput Quantitative Reverse Transcription–PCR Analysis of Gene Expression in Organs and Tissues of *Eucalyptus* Grown in Various Environmental Conditions

Hua Cassan-Wang^{1,*}, Marçal Soler¹, Hong Yu¹, Eduardo Leal O. Camargo^{1,2}, Victor Carocha^{1,3,4}, Nathalie Ladouce¹, Bruno Savelli¹, Jorge A. P. Paiva^{3,4}, Jean-Charles Leplé⁵ and Jacqueline Grima-Pettenati^{1,*}

+ Author Affiliations

*Corresponding authors: Hua Cassan-Wang, E-mail, wang@lrsv.ups-tlse.fr; Jacqueline Grima-Pettenati, E-mail, grima@lrsv.ups-tlse.fr

Received September 21, 2012.
Accepted November 1, 2012.

Abstract

Interest in the genomics of *Eucalyptus* has skyrocketed thanks to the recent sequencing of the genome of *Eucalyptus grandis* and to a growing number of large-scale transcriptomic studies. Quantitative reverse transcription–PCR (RT–PCR) is the method of choice for gene expression analysis and can now also be used as a high-throughput method. The selection of appropriate internal controls is becoming of utmost importance to ensure accurate expression results in *Eucalyptus*. To this end, we selected 21 candidate reference genes and used high-throughput microfluidic dynamic arrays to assess their expression among a large panel of developmental and environmental conditions with a special focus on wood-forming tissues. We analyzed the expression stability of these genes by using three distinct statistical algorithms (geNorm, NormFinder and ΔCt), and used principal component analysis to compare methods and rankings. We showed that the most stable genes identified depended not only on the panel of biological samples considered but also on the statistical method used. We then developed a comprehensive integration of the rankings generated by the three methods and identified the optimal reference genes for 17 distinct experimental sets covering 13 organs and tissues, as well as various developmental and environmental conditions. The expression patterns of *Eucalyptus* master genes *EgMYB1* and *EgMYB2* experimentally validated our selection. Our findings provide an important resource for the selection of appropriate reference genes for accurate and reliable normalization of gene expression data in the organs and tissues of *Eucalyptus* trees grown in a range of conditions including abiotic stresses.