

UIARA ROMERO SOUZA

**FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS À LIGNINA
E RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO E À BAIXA
TEMPERATURA EM EUCALIPTO**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UIARA ROMERO SOUZA

**“FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS À LIGNINA E
RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO E À BAIXA TEMPERATURA
EM EUCALIPTO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Uiara Romero Souza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So89f Souza, Uiara Romero, 1987-
Fatores de transcrição relacionados à lignina e resposta ao estresse hídrico e à baixa temperatura em eucalipto / Uiara Romero Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Paulo Mazzafera.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Expressão gênica. 2. Estresse abiótico. 3. Madeira. 4. Eucalyptus globulus. 5. Eucalyptus urograndis. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Lignin related transcription factors and response to water stress and low temperature in eucalyptus

Palavras-chave em inglês:

Gene expression

Abiotic stress

Wood

Eucalyptus globulus

Eucalyptus urograndis

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

Arthur Germano Fett Neto

Rafael Vasconcelos Ribeiro

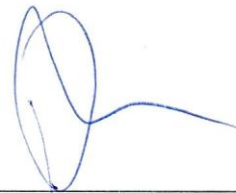
Data de defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 30 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto



Assinatura

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro



Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

RESUMO

A rota de biossíntese de lignina é intensamente estudada. Em grande parte, o interesse neste polímero é vinculado à manipulação do teor de lignina em determinadas espécies de plantas, tais como nas gramíneas utilizadas como forrageiras e em espécies utilizadas para a produção de papel e, mais recentemente, em plantas utilizadas na produção de biocombustíveis. Muitos avanços foram realizados no sentido de alterar o teor de lignina em uma determinada espécie a partir da modificação da expressão de determinados genes da rota de biossíntese de lignina. No entanto, estudos mais recentes passaram a levar em consideração também os fatores de transcrição (FTs) envolvidos no controle da expressão destes genes e como estes fatores interagem entre si para modular a expressão destes genes alvo, de acordo com estímulos ambientais e/ou relacionados ao estágio de desenvolvimento. Neste estudo foram realizadas análises bioquímicas para a dosagem de lignina e de expressão gênica de fatores de transcrição relacionados com a via de biossíntese dos monolignóis em uma espécie de eucalipto e dois híbridos utilizados na produção de papel e celulose, e em duas regiões distintas do caule, ápice e base. Para induzir modificações no metabolismo e no nível de expressão os eucaliptos foram submetidos a estresses hídrico e por baixa temperatura. Sob baixa temperatura, *Eucalyptus globulus* teve aumento do teor de lignina e os FTs envolvidos na regulação positiva de genes da biossíntese de lignina, como *VND7*, *MYB52* e *LIM1*, apresentaram aumento de expressão. *Eucalyptus urolobulus* mostrou pouca variação dos teores de lignina quando submetido a estresse hídrico, assim como *E. globulus*. A via de regulação para a formação de parede secundária parece ter diferentes respostas nestes dois eucaliptos, visto que, em *E. urolobulus* o aumento da expressão de *VND7* não foi suficiente para induzir a expressão de seus fatores de transcrição alvo, *MYB46* e *EgMYB2*. Já em *E. urograndis P42*, na base do caule de plantas estressadas por déficit hídrico, os alvos de *VND7* tiveram expressão reduzida acompanhando os valores de lignina também menores. Deste modo, esta pesquisa pode evidenciar as diversas respostas ao estresse apresentadas em três genótipos diferentes de eucaliptos, de forma que foi possível encontrar relações pontuais coerentes com as análises bioquímicas e de expressão.

ABSTRACT

The lignin biosynthesis pathway is intensely studied largely because of the interest in modifying lignin content in some plant species used for the production of paper and more recently in plants used in producing biofuels. Many advances have been made to modify the lignin content in species by modification of the expression lignin biosynthesis pathway genes. However, recent studies consider transcription factors involved in control of gene expression and how these factors interact with each other to modulate the expression of target genes in accordance with developmental or environmental signals. In this study, biochemical analysis of lignin and transcription factors genes expression was performed in eucalyptus for two distinct regions of the stem (shoot tips and shoot bases). To induce changes in eucalyptus metabolism plants were exposed to water stress and low temperature. *E. globulus*, under low temperature stress, showed increased lignin content and increased expression to FTs *VND7*, *MYB52* and *LIM1*, which plays a positive adjustment. *E. urolobulus* and *E. globulus* showed no variation in lignin content when exposed to water stress condition. The hybrid *E. urolobulus* showed increased expression of *VND7*, but the expression of their target transcription factors, *MYB46* and *EgMYB2* did not change, unlike *E. urograndis* P42 because at the dry group shoot base FT *VND7* displayed reduced expression and lignin content. In summary, we demonstrate genes differentially expressed during stress in eucalyptus, so that it was possible to find consistent relations between biochemical analysis and expression.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. EUCALIPTO	1
1.2. LIGNINA	2
1.3. BIOSSÍNTESE DE LIGNINA	2
1.4. BAIXA TEMPERATURA	4
1.5. ESTRESSE HÍDRICO	5
1.6. FATORES DE TRANSCRIÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVO.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	12
4.2. MEDIDAS DE TROCAS GASOSAS E POTENCIAL HÍDRICO	14
4.3. PREPARO DO MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISES	16
4.4. DOSAGENS DE LIGNINA (KLASON).....	16
4.5. EXTRAÇÕES DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA.....	16
4.6. IDENTIFICAÇÃO DE SEQUENCIAS.....	17
4.7. CONSTRUÇÃO DE PRIMERS	18
4.8. REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	18
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
5. RESULTADOS	22
5.1. TROCAS GASOSAS E POTENCIAL HÍDRICO.....	22
5.2. DOSAGENS DE LIGNINA	30
5.3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO	35
6. DISCUSSÃO.....	41
6.1. TROCAS GASOSAS.....	41
6.2. ANÁLISES DE EXPRESSÃO E DE DOSAGEM DE LIGNINA.....	41
7. CONCLUSÕES.....	47
ANEXO I.....	52
ANEXO II	58

Aos meus pais Rose e João,
minha irmã Bia e
meu avô Feliciano.

Ao Ricardo, meu amor,
e especialmente ao nosso filho Ebraim,
meu novo amor.
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minhas conquistas e por direcionar meu caminho.

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e suporte.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela orientação.

Ao Prof. Dr. Renato Vicentini pelo auxílio nas análises filogenéticas.

A todos os colegas do departamento com quem convivi durante a realização deste trabalho, em especial a Jullyana por compartilhar seu conhecimento e me orientar no laboratório. E ainda a Vivian, Kellen, Vivi e ao Laerti por auxiliarem nas análises bioquímicas.

Ao Adilson e ao Luciano por sempre estarem disponíveis para me ajudar com a estatística e demais assuntos científicos.

Aos caros colegas Cristiane, Higor e Simone, pelos momentos mais engraçados, porém produtivos e informativos, que vivi na graduação, incluindo a hora do desespero, que certamente me livrou do exame muitas vezes.

A minha amiga de infância, Simone, por estar sempre ao meu lado, até no laboratório!

A FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

E a empresa Fibria Celulose S.A. pelo suporte financeiro e fornecimento do material vegetal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A VIA DOS MONOLIGNÓIS.....	4
FIGURA 2: DIAGRAMA SIMPLIFICADO DA REDE DE TRANSCRIÇÃO REGULADORA PARA BIOSÍNTESE DE PAREDE SECUNDÁRIA E LIGNIFICAÇÃO.	7
FIGURA 3: TROCAS GASOSAS EM <i>E. UROGRANDIS</i> P00.	23
FIGURA 4: TROCAS GASOSAS EM <i>E. UROGRANDIS</i> P42.	24
FIGURA 5: TROCAS GASOSAS EM <i>E. UROGRANDIS</i> C19.	25
FIGURA 6: TROCAS GASOSAS EM <i>E. UROGLOBULUS</i>	26
FIGURA 7: TROCAS GASOSAS EM <i>E. GLOBULUS</i>	27
FIGURA 8: POTENCIAL HÍDRICO.	28
FIGURA 9: TROCAS GASOSAS PARA O EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO.	29
FIGURA 10: DOSAGEM DE LIGNINA PELO MÉTODO KLASON (KL) PARA O EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA NA REGIÃO DOS ÁPICES.	31
FIGURA 11. DOSAGEM DE LIGNINA PELO MÉTODO KLASON (KL) PARA O EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA NA REGIÃO DAS BASES.....	32
FIGURA 12: DOSAGEM DE LIGNINA PELO MÉTODO KLASON (KL) PARA O EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO NA REGIÃO DOS ÁPICES	33
FIGURA 13: DOSAGEM DE LIGNINA PELO MÉTODO KLASON (KL) PARA O EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO NA REGIÃO DAS BASES.....	34
FIGURA 14: EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DOS FTS PARA O EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA.....	37
FIGURA 15: EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DOS FTS PARA O EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO.....	40
FIGURA 16: RESUMO DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA E DOSAGEM DE LIGNINA PARA O EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA.	43
FIGURA 17: RESUMO DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA E DOSAGEM DE LIGNINA PARA O EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO.	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS COM A BIOSÍNTESE DE LIGNINA. ...	12
TABELA 2: DADOS DO EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA.....	13
TABELA 3: DADOS DO EXPERIMENTO DE ESTRESSE HÍDRICO.....	13
TABELA 4: DADOS DA MEDIÇÃO DA TEMPERATURA NOS EXPERIMENTOS DE BAIXA TEMPERATURA.....	15
TABELA 5: PRIMERS USADOS NAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO	20
TABELA 6: PRIMERS USADOS NAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO DOS GENES CONSTITUTIVOS.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

4CL: hidroxicinamoil CoA ligase

C19: *E. urograndis* clone C219

C3H: *p*-Cumarato 3- hidroxilase

C4H: cinamato-4-hidroxilase

CAD: cinamil álcool desidrogenase

CCoAOMT: cafeoil-CoA Ometiltransferase

CCR: hidroxicinamoil CoA redutase

COMT: ácido cafeico O-metiltransferase

F5H: ferulato 5-hidroxilase

FT: fator de transcrição

HCT: hidroxicinamoil-CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase

KL: análise de lignina pelo método Klason

P00: *E. urograndis* clone P00

P42: *E. urograndis* clone P42

PAL: fenilalanina amonialiase

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eucalipto

O gênero *Eucalyptus* L'Hérit é nativo da Austrália e outras ilhas da Oceania, com distribuição ampla, ocorrendo ao nível do mar até grandes altitudes, desde regiões chuvosas a semiáridas e dos trópicos até 43° latitude Sul (Ladiges et al., 2003). As espécies do gênero são utilizadas amplamente pela indústria florestal de papel e celulose em regiões tropicais, subtropicais e em algumas regiões temperadas devido a seu crescimento superior, adaptabilidade e alta qualidade de biomassa da madeira. Os eucaliptos mais utilizados para a plantação florestal são *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus globulus* (Grattapaglia and Kirst, 2008).

A espécie *E. grandis* tem o cultivo localizado em regiões tropicais e subtropicais e *E. globulus* concentra-se em regiões temperadas, sendo que seus híbridos são amplamente utilizados para plantações industriais devido à capacidade de adaptação e crescimento rápido (Paiva et al., 2011).

Desta forma, há grande interesse no aumento da produtividade e da qualidade desta matéria-prima para a indústria florestal e este avanço está sendo alcançado através de investimentos em biotecnologia. A criação de híbridos de eucalipto está proporcionando muitos ganhos, uma vez que as espécies apresentam grande variação fenotípica, e juntamente com a propagação clonal tem se tornado uma ferramenta para a melhoria da qualidade da madeira (Grattapaglia and Kirst, 2008).

Híbridos das espécies *E. grandis* Hill ex-Maiden e *E. urophylla* S. T. Blake são amplamente cultivados, pois juntos combinam o rápido crescimento e propagação vegetativa de *E. grandis* com maior tolerância a doenças fúngicas, capacidade de adaptação, maior densidade e rebrota de *E. urophylla* (Kullan et al., 2012).

E. globulus Labill: retém as melhores propriedades para produção de celulose e de papel dentre as espécies de eucalipto plantadas comercialmente, pois tem maior comprimento da fibra e maior teor de holocelulose, sendo necessários aproximadamente 25% a menos de madeira para produzir uma tonelada de celulose em relação a *E. grandis*. Deste modo, mesmo com taxas de crescimento lento sua madeira gera um produto distinto e superior para o mercado (Grattapaglia, 2004).

1.2. Lignina

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica e complexa que é monitorada continuamente quanto à integridade funcional durante o desenvolvimento e interação com o meio ambiente (Denness et al., 2011). Constituída por celulose, hemicelulose, pectinas, proteínas e lignina, a parede define o formato da célula, regula o seu crescimento, proporciona suporte mecânico e estrutural às plantas, atua na defesa da planta contra ataque de patógenos e estresses abióticos e representa a maior fonte de biomassa renovável utilizada no mundo (Zhong and Ye, 2007).

A deposição da lignina na parede celular secundária, após a finalização do alongamento celular, se dá em alguns tipos de células, principalmente no xilema, como também no esclerênquima, fibras do floema e periderme (Baucher et al., 1998); este processo de deposição é regulado por uma cascata de FTs. Recentes estudos com transgenia realizados principalmente em *Arabidopsis sp* tem demonstrado a existência de vários FTs envolvidos na biossíntese de parede celular secundária (McCarthy et al., 2009).

Lignina é um polímero aromático complexo, que pode ser sintetizado a partir de três álcoois hidroxicinamoil (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico), que recebem o nome comum de monolignóis e diferem na metoxilação dos C₃ e C₅ posicionados no anel aromático. Quando incorporados ao polímero, os monolignóis são denominados unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Boerjan et al., 2003).

1.3. Biossíntese de lignina

A biossíntese de lignina deriva da via dos fenilpropanóides, tendo como substrato inicial a fenilalanina. Atualmente são reconhecidas dez enzimas necessárias para a biossíntese dos monolignóis (Figura 1): fenilalanina amonialiase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil-CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT), *p*-Cumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA *O*-metiltransferase (CCoAOMT), hidroxicinamoil-CoA redutase (CCR), ferulato 5-hidroxilase (F5H), ácido cafeico *O*-metiltransferase (COMT), cinamil álcool desidrogenase (CAD). Os monolignóis sintetizados são transportados até a parede celular onde são oxidados por peroxidases (PER) e lacases (LAC), ocorrendo então polimerização espontânea entre os produtos (Boerjan et al., 2003).

As ligações que se formam entre as estruturas C₆-C₃ dos monolignóis são do tipo covalentes C-O-C e C-C, que, em teoria, totalizam 16 tipos (Baucher et al., 1998). O tipo de ligação mais frequente é β-O-4, sendo a mais facilmente clivada, enquanto que as outras ligações são mais resistentes à degradação química. A abundância relativa de cada tipo de ligação irá depender do tipo de monômero que é incorporado durante o processo de polimerização. Ligninas compostas principalmente de unidades G, contêm mais ligações resistentes do que ligninas que incorporam unidades S. Isto ocorre devido à disponibilidade de ligação no C₅ da unidade G, que é inexistente na unidade S (Boerjan et al., 2003).

A significância funcional das ligninas tem sido associada principalmente ao suporte mecânico dos órgãos vegetais, à condução de seiva mais eficiente através de elementos vasculares lignificados e à participação em mecanismos de defesa (Boudet, 2000). A composição e quantidade das ligninas variam entre as diferentes espécies vegetais, indivíduos de uma população, tipos celulares e entre as camadas individuais das paredes celulares, sendo influenciadas por fatores ambientais e estágio de desenvolvimento (Campbell and Sederoff, 1996). Tem sido demonstrado que as ligninas estão entre as inúmeras respostas vegetais a diferentes tipos de estresses abióticos, tais como deficiência mineral, déficit hídrico, radiação UV-B, vento e baixas temperaturas (Moura et al., 2010).

Reconhece-se que a lignina confere às plantas vantagem adaptativa além de ser um dreno metabólico de carbono (Novaes et al., 2010). A lignina, mesmo sendo tão importante para as plantas, representa um problema no aproveitamento agroindustrial de inúmeras espécies vegetais. Têm, por exemplo, um impacto negativo na digestibilidade de gramíneas e são componentes indesejáveis na manufatura do papel (Hatfield and Fukushima, 2005).

A madeira é a principal matéria-prima para fabricação de papel. A produção de papel de alta qualidade demanda a remoção da lignina, por intermédio de processos de polpação química e de branqueamento, resultando no alto consumo de energia e gerando resíduos tóxicos (Li et al., 2008). O processo de polpação química mais utilizado para a produção de papel é o Kraft. Neste sistema, os cavacos da madeira são tratados a altas temperaturas (150-170°C), com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, sendo grande parte das ligninas hidrolisadas e solubilizadas (Lisboa et al., 2005).

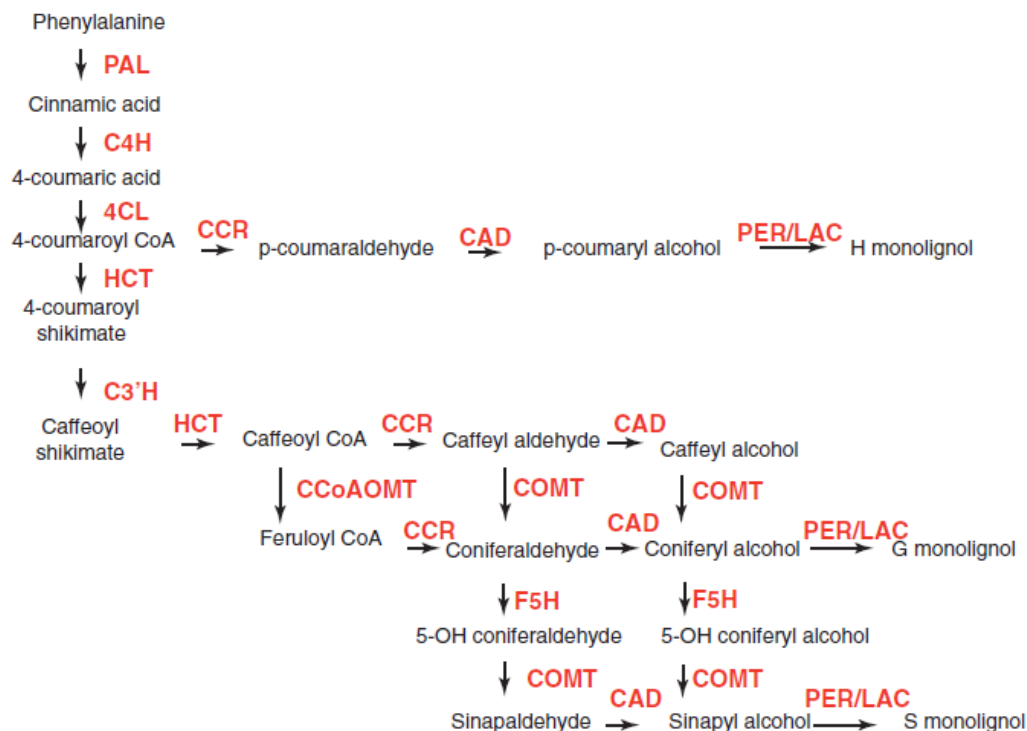


Figura 1: A via dos monolignóis.

As enzimas abreviadas correspondem a: fenilalanina amonialiase (PAL); cinamato-4-hidroxilase (C4H); hidroxicinamoil CoA ligase (4CL); hidroxicinamoil CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT); p-Cumarato 3- hidroxilase(C3'H); cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT); hidroxicinamoil CoA redutase (CCR); cinamil álcool desidrogenase (CAD);ferulato 5-hidroxilas (F5H); ácido cafeico O-metiltransferase (COMT); peroxidase (PER) e lacase (LAC) (Zhao and Dixon, 2011).

Ao lado dos estudos puramente químicos, nos quais se tenta aperfeiçoar ou descobrir métodos mais eficientes de extração das ligninas para uma produção mais eficiente e ecologicamente correta do papel, estão sendo realizados também numerosos programas de biotecnologia que têm como enfoque o processo de formação das ligninas. Deste modo, vários estudos sugerem que maior porcentagem de unidades S (mais facilmente removidas) facilitaria este processo de polpação, visto que a redução no conteúdo de ligninas na parede celular compromete o crescimento da planta (Novaes et al., 2010).

1.4. Baixa temperatura

O frio é um importante fator abiótico, pois restringe a produtividade e limita áreas de cultivo de plantas. A aclimação ao frio é um processo que induz mudanças na expressão gênica, resultando em alterações fisiológicas e bioquímicas, podendo inclusive causar alterações no teor

de lignina das plantas (Moura et al., 2010). Em raízes de soja, foi constatado aumento da atividade da enzima PAL e dos níveis de ácido ferúlico, siríngico e *p*-hidroxibenzóico durante a aclimação ao frio (Janas et al., 2000; Janas et al., 2002). Em plantas de *Populus* submetidas à temperatura de 10°C durante 14 dias observou-se aumento na deposição de lignina após o 7º dia de tratamento (Hausman et al., 2000). A indução da síntese de lignina, segundo os autores, estaria relacionada ao reforço da parede celular contra estresse mecânico ou por desidratação.

1.5. Estresse hídrico

Em plantações de eucalipto a disponibilidade de água é um fator limitante para o crescimento e produtividade. No entanto, o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares que conferem adaptação do eucalipto à escassez de água ainda é pequeno, mas por outro lado, alguns estudos têm relatado que os genótipos de eucalipto diferem na modificação fenotípica em resposta ao déficit hídrico (Villar et al., 2011).

O estresse hídrico afeta o metabolismo de lignina em plantas. Análises anatômicas de troncos de *Pinus radiata*, provenientes de regiões de seca periódica e severa, mostraram diminuição da lignificação e em alguns casos o estresse foi extremo a ponto de haver células colapsadas (Donaldson, 2002). Em milho, foi demonstrado que o aumento da expressão dos genes de cinamoil-CoA redutase 1 e 2, aliado ao aumento na deposição de lignina, levou à redução do crescimento da região basal das raízes (Fan et al., 2006). Em raízes de arroz, em estágio intermediário e final de estresse hídrico (48-72 h), verificou-se aumento da expressão gênica de *PAL*, *C3H*, *4CL*, *CCoAOMT*, *CAD* e peroxidases (Yang et al., 2006). *Citrullus lanatus* sp. sob estresse hídrico apresentou redução do crescimento, assim como se verificou que a biossíntese de lignina foi induzida, a partir do aumento da expressão de *CCoAOMT* e de grande número de isoenzimas classe III de peroxidases (Yoshimura et al., 2008).

Redução do crescimento foliar também foi observada em plantas de *Trifolium repens* após 28 dias de tratamento de estresse hídrico, assim como o aumento da biossíntese de lignina, evidenciando que as respostas enzimáticas envolvidas na biossíntese desse polímero podem diferir a curto e longo prazo de exposição ao estresse. Nos estágios iniciais (0-14 dias) houve aumento da atividade de PAL e ascorbato peroxidase nas folhas, sendo gradativamente reduzidas conforme prolongou-se o período de estresse. Porém, nos estágios finais de estresse (14-28 dias)

as enzimas que mostraram aumento da atividade foram peroxidases de guaiacol, de álcool coniferil e de siringaldazina (Bok-Rye et al., 2007).

1.6. Fatores de transcrição

Muitos avanços foram realizados no sentido de alterar o teor de lignina em algumas espécies, principalmente espécies modelo como *A. thaliana* e *Populus trichocarpa*, a partir da modificação da expressão de determinados genes da rota de biossíntese de monolignóis. No entanto, estudos mais recentes passaram a levar em consideração também os genes envolvidos no controle da expressão destes genes e como eles interagem entre si para modular a expressão através de estímulos ambientais e/ou do desenvolvimento.

Plantas, assim como outros seres eucarióticos, têm a expressão gênica regulada em vários níveis. Um dos principais meios de controle é através da regulação no nível da transcrição, a qual é regulada por proteínas chamadas fatores de transcrição (FTs). FTs são responsáveis por induzir ou reprimir a expressão dos genes, através de ligações em sequências específicas de DNA que estão na região promotora do gene alvo (Riechmann and Ratcliffe, 2000; Caldana et al., 2007). FTs representam uma fração considerável do genoma de organismos eucariotos, podendo ser agrupados em diferentes famílias gênicas, de acordo com o tipo de ligação no DNA e o domínio que eles codificam (Ratcliffe and Riechmann, 2002). As famílias de FTs podem apresentar funções biológicas equivalentes ou similares (Riechmann and Ratcliffe, 2000). A interação dos FTs com a região promotora de um gene permite o reconhecimento pela RNA polimerase II dando início ao processo de transcrição (Grotewold, 2008).

Os FTs se organizam em redes regulatórias (Figura 2), onde representam papéis diferenciados à medida que muda seu nível hierárquico. Os reguladores “master switches” estão no alto nível hierárquico de controle da rede e, associados ou não a outros FTs, podem afetar negativa ou positivamente a expressão de outro fator de transcrição. Abaixo destes, estão os FTs que controlam diretamente enzimas cuja função é efetuar processos celulares (Grotewold, 2008). Baseado na sequência de aminoácidos e nas estruturas do domínio de ligação ao DNA, estes fatores de transcrição são classificados em famílias, segundo a caracterização de seus motivos conservados.

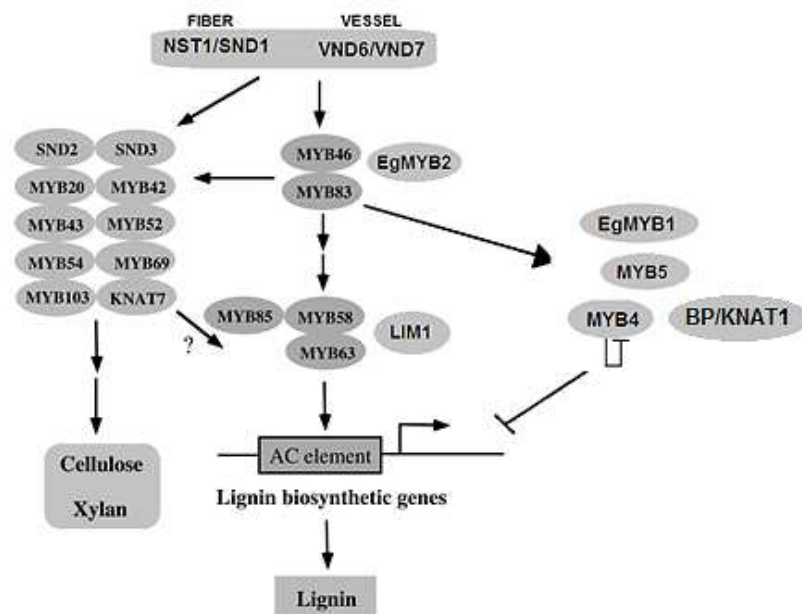


Figura 2: Diagrama simplificado da rede de transcrição reguladora para biossíntese de parede secundária e lignificação.

Nesta rede de regulação NST1/SND1 e VND6/7 (família NAC) são reguladores chave no programa de biossíntese de parede secundária. MYB46 e seus ortólogos são reguladores de segundo nível, pois são alvos dos reguladores chave NAC. MYB58, MYB63 e MYB85 ativam diretamente a expressão de genes da via de biossíntese de lignina, através de ligações nos elementos AC. Outros FTs também ilustrados interferem na regulação dos componentes da parede celular, assim como outros fatores como luz, sacarose, fermentos e auxina. As setas indicam a estimulação positiva da via e as barras indicam inibição. Modificado de (Zhong and Ye, 2009 e Zhao and Dixon, 2011).

Em seguida serão feitos alguns comentários direcionados a certas famílias de FTs que foram estudados nesta dissertação.

Família Homeobox

Os genes representantes desta família foram inicialmente encontrados em *Drosophila*, evidenciando controle genético do desenvolvimento e diferenciação celular. Em plantas, membros desta família têm importantes papéis na divisão e diferenciação celular do meristema. Em mutantes de *Arabidopsis* mostrou-se para o FT BREVIPEDICELLUS (BP/KNAT1), um dos sete genes da família em *Arabidopsis*, aumento de deposição de lignina nos mutantes (*bp*) e redução da lignificação em plantas superexpressando BP (Mele et al., 2003). Através da técnica de ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA), foram encontrados nos promotores dos genes *CCoAOMT* e *COMT* sítios de ligação para BP. Análises de expressão demonstraram maior

expressão dos genes *4CL*, *C4H*, *PAL1* e uma peroxidase em linhagens *bp*, sugerindo que a expressão de BP poderia afetar a cascata de regulação da via de biossíntese de lignina, em enzimas que atuam em nível intermediário para a formação dos monolignóis.

Família NAC

A família gênica NAC (Nam Ataf CUC2) tem muitos representantes em *Arabidopsis*. Estes FTs tem papel fundamental na formação da parede celular secundária, coordenando a síntese de lignina, celulose e xilano, juntamente com outros FTs da família MYB. Os FTs da família NAC funcionam como reguladores chaves - “master switches”, pois estão localizados no início da cascata de regulação da formação de parede secundária e apresentam redundância, ou seja, há mais de um gene com a mesma função. Atualmente são reconhecidos os seguintes FTs da família NAC que atuam nesta coordenação: *NST1* (NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1), *NST2* e *NST3/SND1* (SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN1), *VND6* (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6) e *VND7* (Wang et al., 2011).

NST1 é homólogo de *SND1*, portanto agem de forma redundante na síntese de parede secundária em fibras do xilema de *Arabidopsis*. Esta informação baseia-se nos estudos de duplos mutantes gerados por iRNA, resultando na má formação da parede secundária nessas células, consequentemente a síntese de lignina foi reduzida localmente e houve redução do número de transcritos dos genes *4CL1* e *CCoAOMT* (Zhong et al., 2007).

A expressão de *VND6* e *VND7* é localizada especificamente nos vasos do xilema (Zhong et al., 2008). Plantas transgênicas superexpressando estes dois FTs revelaram a expressão de *VND6* nos vasos do metaxilema e *VND7* no metaxilema e protoxilema, e em plantas estimuladas para crescimento secundário na raiz foi verificada a expressão de *VND7* no xilema em desenvolvimento. Estas informações sugerem que *VND6* e *VND7* tem função homóloga a *NST1* e *SND1*, mas com localização diferente no tecido da planta (Zhong et al., 2008). A estes dois genes é também atribuída função de controlar FTs relacionados com o programa de morte celular, visto que as células dos vasos precisam passar por este processo a fim de lhes conferir características para exercer a função de transporte (Yamaguchi et al., 2011).

Família LIM

Membros da família LIM, assim como da família MYB a ser comentada em seguida, controlam a biossíntese de lignina a partir de interação com elementos AC presentes na região

promotora de genes que codificam enzimas da via de biossíntese de lignina. Elementos AC também são chamados de H-boxes ou PAL-boxes e são regiões ricas em adenosina e citosina e, ocasionalmente, timina. Os genes com estas marcas são: *PAL*, *C4H*, *COMT*, *CCoAOMT*, *4CL*, *CCR* e *CAD* (Patzlaff et al., 2003).

Plantas de tabaco transgênico, antisense para *Ntlm1*, apresentaram redução de transcritos de genes codificando para as enzimas PAL, 4CL e CAD e redução do teor de lignina em 27% (Kawaoka and Ebinuma, 2001). O mesmo grupo de pesquisadores encontrou o ortólogo para *EcLIM1*, isolado de *Eucalyptus camaldulensis*. Similar ao observado em tabaco, o mutante *Eclim1* apresentou redução de 29% no teor de lignina em relação ao seu controle e a supressão da expressão do gene reduziu a expressão de *PAL*, *C4H* e *4CL* (Kawaoka et al., 2006).

Família MYB

A família de proteínas MYB tem ampla diversidade e está representada na maioria dos organismos eucariotos. Em plantas se destaca uma classe que há muitos fatores de transcrição envolvidos em redes regulatórias no metabolismo, desenvolvimento e a resposta a estresse biótico e abiótico. Os representantes desta família escolhidos para este estudo estão todos envolvidos na regulação da via de biossíntese de lignina e com a rede regulatória de formação da parede secundária. Dentre eles há os “master switches” como *AtMYB46* que regulam outros FTs e os que atuam diretamente sobre os genes da síntese de lignina como *EgMYB1*.

O *EgMYB1* reprime a transcrição de *EgCCR* e *EgCAD2* de *E. gunnii* ao se ligar aos sítios MBSIIIG localizados nos promotores destes genes. Está preferencialmente expresso no xilema secundário de caules e raízes de árvores de *Eucalyptus* sendo considerado por isso um regulador negativo da rota de biossíntese de lignina (Legay et al., 2007).

O gene *AtMYB4* é regulador na expressão de genes da via dos fenilpropanóides e funciona como um repressor transcricional. Mutantes *Atmyb4* acumulam sinapil-malato, um composto protetor de UV, sendo, portanto, um redutor da transcrição do gene que codifica a enzima C4H em *Arabidopsis* (Jin et al., 2000). Em tabaco também reprime a expressão de *4CL* e *CAD* (Jin et al., 2000).

O gene *AtMYB46*, ortólogo de *EgMYB2* (de *E. gunii*), é expresso principalmente nas fibras e elementos de vaso dos caules e sua repressão causa a diminuição do espessamento da parede secundária de fibras e vasos (Wang and Dixon, 2012). É considerado um “master switch” de segundo nível, pois é controlado por NST1 e NST3 e também regula outros TFs que se

encontram abaixo na cascata da formação de parede secundária – ver figura 2 (Wang and Dixon, 2012). A superexpressão ativa a rota de celulose e lignina, causando deposição ectópica de parede secundária e ativação de dois fatores de transcrição *AtMYB85* e *AtKNAT7* (Zhong et al., 2007).

O FT *EgMYB2* se liga em regiões de regulação *cis* nos promotores de dois genes da biossíntese de lignina em *E. gunnii*: *EgCCR* e *EgCAD2*. Plantas transgênicas de tabaco com superexpressão de *EgMYB2* apresentam aumento da espessura das paredes celulares e alteração na composição da lignina, atua no papel de regulador positivo da formação de parede celular, lignina e está filogeneticamente próximo a *AtMYB46* (Goicoechea et al., 2005).

O FT *VvMYB5a* é conhecido por regular a via de biossíntese dos fenilpropanóides em *Vitis vinifera*. Plantas mutantes de tabaco superexpressando *VvMYB5a* reprimiram a expressão de *CCoAOMT* nas células de anteras, indicando que podem também atuar na via de biossíntese de lignina (Deluc et al., 2006).

O mutante *det3* de *Arabidopsis* apresenta maiores níveis de expressão de *AtMYB61* e sua localização coincide com a deposição ectópica de lignina (Newman et al., 2004). O ortólogo de *AtMYB61* em *Pinus*, *PtMYB8*, quando superexpresso em *Arabidopsis* leva à lignificação ectópica, além de estar relacionado com abertura estomática e deposição de mucilagem nas sementes (Zhong and Ye, 2009).

Zhong et al., (2008) verificaram em mutantes de *Arabidopsis* com repressão dos FTs *AtMYB52* e *AtMYB85*, redução no espessamento da parede secundária. Para *AtMYB52*, esta redução foi verificada nas fibras interfasciculares e do xilema, porém, para *AtMYB85*, houve deformação dos vasos do xilema, provavelmente devido ao enfraquecimento da parede secundária.

E finalmente, verificou-se em dois mutantes de *Arabidopsis* para o FT *AtMYB103* a redução de transcritos do gene de *F5H* e redução de subunidades S (Ohman et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Diante da grande importância de eucalipto, principalmente na produção de papel e celulose, o estudo dos mecanismos envolvidos na deposição de lignina nestas espécies, bem como o conhecimento acerca das alterações provocadas nestes mecanismos a partir da ação de condições ambientais distintas, são cada vez mais importantes. No entanto, apesar da existência de trabalhos

relatando a influência de fatores abióticos na biossíntese de ligninas em diferentes plantas, ainda sabe-se pouco a respeito da influência destes fatores nos mecanismos de deposição de ligninas em *Eucalyptus*.

Em adição a isto, alguns destes fatores abióticos poderiam ser utilizados como ferramentas na elucidação dos mecanismos envolvidos durante o processo de deposição de ligninas em espécies notoriamente importantes na manufatura de papel, como é o eucalipto. Dentro deste contexto, o estresse hídrico e por baixa temperatura, que limitam o cultivo de eucalipto em algumas regiões do Brasil, seriam importantes sob este ponto de vista.

Em relação aos FTs, ainda que se conheçam alguns em eucalipto, pouco se sabe de fato sobre o controle que podem ter na biossíntese de lignina não só nesta planta, mas em todas em que este polímero tem sido estudado.

3. OBJETIVO

Verificar a expressão de alguns fatores de transcrição relacionados com o controle de deposição de ligninas em eucaliptos em resposta ao tratamento de frio e estresse hídrico.

A Tabela 1 lista os fatores de transcrição estudados nesta dissertação. Além dos nomes dos genes também constam as espécies em que foram inicialmente descritos seguidos da sua função reguladora, se ativam os genes alvo ou se reprimem sua expressão (Zhao and Dixon, 2011). Por último, o número de acesso do GenBank.

Tabela 1: Fatores de Transcrição relacionados com a biossíntese de lignina.

Gene	Espécie	Função	GenBank
<i>AtVND7</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT1G71930
<i>AtBP</i>	<i>A. thaliana</i>	Repressor	AT4G08150
<i>EcLIM1</i>	<i>E. camaldulensis</i>	Ativador	AB208712
<i>EgMYB1</i>	<i>E. gunni</i>	Repressor	AJ576024
<i>EgMYB2</i>	<i>E. gunni</i>	Ativador	AJ576023
<i>AtMYB4</i>	<i>A. thaliana</i>	Repressor	AT5G26660
<i>VvMYB5</i>	<i>V. vinifera</i>	Repressor	AY555190
<i>AtMYB46</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT5G12870
<i>AtMYB52</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT1G17950
<i>AtMYB61</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT1G09540
<i>AtMYB85</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT4G22680
<i>AtMYB103</i>	<i>A. thaliana</i>	Ativador	AT5G56110

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de tratamento

4.1.1. Para a realização dos experimentos de baixa temperatura e estresse hídrico foram utilizadas mudas de três clones do híbrido *Eucalyptus urograndis* (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden), a saber C19, P00 e P42, mudas do híbrido *Eucalyptus uroglobulus* RS01HG (*E. urophylla* x *E. grandis*) x (*Eucalyptus globulus* Labill.) e mudas da espécie *E. globulus*, todas fornecidas pela empresa Fibria Celulose S.A. As mudas foram mantidas na casa de vegetação em temperatura ambiente até o momento dos ensaios. Para os ensaios de baixa temperatura cada muda foi transplantada em vasos de 1 L contendo solo, enquanto que para as mudas que foram submetidas ao ensaio de estresse hídrico, a mistura utilizada foi de solo e areia (2:1, v/v) em vasos de 4 L, com quatro mudas por vaso. A idade das mudas está informada na tabela 2 para o ensaio de baixa temperatura e na tabela 3 para o ensaio de estresse hídrico.

4.1.2. Tratamento de baixa temperatura: Os ensaios foram conduzidos durante os meses de setembro/outubro (clones de *E. urograndis*), fevereiro/março (*E. globulus*) e abril (*E. uroglobulus*). As plantas foram mantidas na casa de vegetação durante o dia. Na iminência do escurecer, as plantas controle eram transferidas para câmara escura na temperatura ambiente, e as

plantas do tratamento eram transportadas até a câmara fria e mantidas no escuro. A duração dos ensaios foi de 7-10 dias (Tabela 2). As temperaturas foram aferidas diariamente sendo que, os valores médios para temperatura mínima e máxima na câmara fria respectivamente, para as plantas foram de 3,2 e 5,7°C para *E. urograndis*, 6,1 e 9,1°C para *E. globulus* e 5,7 e 8,8°C para *E. uroglobulus* (Tabela 4).

Tabela 2: Dados do experimento de baixa temperatura.

Idade das plantas e data de realização do ensaio de baixa temperatura.

	Idade (Dias)	Início	Término	Dias
<i>E. urograndis C19</i>	99	26/09/2009	02/10/2009	7
<i>E. urograndis P00</i>	99	26/09/2009	02/10/2009	7
<i>E. urograndis P42</i>	99	26/09/2009	02/10/2009	7
<i>E. globulus</i>	90	23/02/2010	02/03/2010	8
<i>E. uroglobulus</i>	90	06/04/2010	15/04/2010	10

4.1.3. Tratamento de estresse hídrico: As plantas foram acondicionadas na estufa em temperatura ambiente durante toda a duração do ensaio. Dividiu-se em dois grupos de tratamento denominados controle (C) e seca (S). O grupo controle era irrigado diariamente e o grupo seca não recebeu irrigação e sua coleta era realizada apenas se o sintoma de murcha, verificado ao meio dia (12:00 h), era persistente até a manhã do dia seguinte.

A duração do ensaio foi variada para cada grupo devido à espera dos sintomas, esta variação e a idade das plantas estão na tabela 3.

Tabela 3: Dados do experimento de estresse hídrico.

Idade das plantas, data de realização e duração do experimento de seca.

	Idade (Dias)	Início	Término	Dias
<i>E. urograndis C19</i>	120	24/11/2009	14/12/2009	21
<i>E. urograndis P00</i>	120	24/11/2009	14/12/2009	21
<i>E. urograndis P42</i>	120	24/11/2009	14/12/2009	21
<i>E. globulus</i>	120	08/06/2010	26/06/2010	19
<i>E. uroglobulus</i>	120	26/04/2010	08/05/2010	13

4.1.4. Procedimentos de coleta

As plantas foram coletadas descartando-se as folhas e separando o caule em duas regiões. Os primeiros 5 cm do caule a partir do ápice foram separados, em seguida os próximos 10 cm foram descartados e coletou-se os 5 cm seguintes. Estas duas porções de 5 cm foram chamadas de ápice e base, respectivamente, tratando-se de uma região pouco lignificada e outra com maior lignificação. Os fragmentos dessas duas regiões do caule foram colocados em sacos de papel alumínio perfurados e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido, armazenados em biofreezer (-80°C), onde permaneceram até o momento das análises.

4.1.5. Delineamento experimental

Nos experimentos de baixa temperatura e de estresse hídrico foram utilizadas 30 plantas de cada híbrido por tratamento, sendo 15 destinadas para extrações de RNA (3 repetições, compostas por 5 plantas cada) e 15 plantas destinadas para análises Klason, (3 repetições, compostas por 5 plantas cada). As medições de trocas gasosas e potencial hídrico foram realizadas em cinco plantas de cada tratamento.

4.2. Medidas de trocas gasosas e potencial hídrico

No decorrer dos ensaios, mas normalmente nos dias iniciais até a metade dos tratamentos, alguns exemplares foram escolhidos para avaliação de assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foi usado um analisador de gases por infravermelho IRGA-LCpro + Photosynthesis System (ADC Bioscientific Ltd.), acoplado com luz artificial simulando radiação de 1050 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O tempo mínimo de estabilização para cada medida foi de 2 min. A concentração de CO₂ e a temperatura das folhas foram similares a do ambiente. As medidas foram realizadas em folhas no 3º ou 4º par foliar, preferencialmente na mais desenvolvida. Em ambos os ensaios padronizou-se o horário das 11 às 13 h para as medidas que foram feitas ao longo da aplicação do estresse.

Para o ensaio de estresse hídrico foram realizadas medidas de potencial hídrico, utilizando-se a câmara de pressão tipo Scholander (PMS Instrumentos Co.). As medidas de potencial hídrico foram realizadas com a região do ápice caulinar, obtido cortando-se o caule logo após o 4º par foliar. Adotou-se este procedimento porque as folhas de *E. globulus* possuem pecíolo pequeno.

Tabela 4: Dados da medição da temperatura nos experimentos de baixa temperatura.

As temperaturas estão indicadas por mínima e máxima observada (separadas por barras). Temperatura no período Diurno (°C) corresponde à temperatura comum na qual todas as plantas foram mantidas durante o dia. Em Câmara Controle Escura (°C) e Câmara Fria Escura (°C) estão indicadas as temperaturas noturnas nas quais as plantas controle e sob estresse, respectivamente, foram mantidas. Dias destacados de cinza correspondem às datas de medições de trocas gasosas.

	Temperatura (°C)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
<i>E. urograndis</i>	Período Diurno	28°/30°	26°/36°	23°/33°	21°/23°	16°/22°	22°/30°	coletado			
	Câmara Controle Escura	23°/23°	23°/24°	23°/24°	22°/24°	21°/23°	22°/22°				
	Câmara Fria Escura	3°/5°	4°/5°	3°/6°	3°/6°	3°/6°	3°/6°				
<i>E. globulus</i>	Período Diurno	27°/33°	26°/36°	21°/25°	22°/30°	23°/31°	19°/31°	23°/30°	coletado		
	Câmara Controle Escura	25°/26°	25°/27°	25°/26°	24°/25°	24°/25°	23°/25°	22°/24°			
	Câmara Fria Escura	9°/9°	9°/13°	6°/10°	5°/9°	6°/8°	4°/8°	4°/7°			
<i>E. uroglobulus</i>	Período Diurno	22°/30°	22°/30°	22°/30°	22°/30°	22°/30°	22°/31	24°/30°	25°/30°	25°/30°	coletado
	Câmara Controle Escura	20°/20°	20°/20°	20°/20°	20°/20°	20°/21°	20°/21°	20°/21°	21°/23°	23°/24°	
	Câmara Fria Escura	5°/7°	5°/7°	5°/7°	5°/7°	5°/7°	5°/15°	13°/15°	4°/7°	4°/7°	

4.3. Preparo do material vegetal para análises

4.3.1. Análises bioquímicas: os ápices e as bases caulinares foram macerados em Nitrogênio líquido e liofilizados. Lavou-se aproximadamente 100 mg das amostras com 1,5 mL de etanol 80% (três vezes) e logo após com água deionizada. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 15 min e o precipitado foi colocado em estufa “overnight” a 65°C. Adicionalmente, para a análise de lignina pelo método Klason, lavou-se o material triturado e liofilizado com acetona em Soxhlet por 8 h. Após a extração a acetona foi evaporada sob o fluxo de ar em capela.

4.3.2. Análise molecular: O material colhido foi macerado com Nitrogênio líquido e mantido em biofreezer. A extração de RNA foi de acordo com Chang et al., (1993).

4.4. Dosagens de lignina (Klason)

A dosagem seguiu o protocolo de Rogers et al., (2005). Em tubos de ensaio, a cada 0,2 g de material seco, preparado conforme citado anteriormente, adicionou-se 3 mL H₂SO₄ 72%, que foram homogeneizados em vórtex e mantidos em banho-maria frio (20°C) por 2 h, sendo agitados por 1 min a cada 10 min. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos de 125 mL, utilizando-se 112 mL de água MilliQ para lavagem dos resíduos dos tubos de reação. Os tubos de 125 mL contendo as amostras foram selados e autoclavados a 121°C por 60 min. As amostras foram resfriadas no ambiente e os hidrolisados foram filtrados a vácuo em filtro de vidro (filtros secos em estufa a 105°C e pré-pesados), lavando-se com 200 mL de água MilliQ pré-aquecida a aproximadamente 50°C, para remover resíduos do ácido e de açúcares. Os filtros utilizados foram novamente secos em estufa a 105°C e pesados. Lignina Klason (lignina insolúvel em ácido) foi determinada gravimetricamente a partir da diferença do peso final do filtro com seu peso inicial. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado a partir da absorbância do filtrado dos filtros de vidro em 205 nm de acordo com TAPPI Useful Method UM250 (TAPPI, 1985).

4.5. Extrações de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada de acordo com Chang et al. (1993), com modificações. Inicialmente, aqueceu-se a 65°C um volume de 750 µL de tampão de extração em tubos Eppendorf de 2 mL e acrescentou-se 7,5 µL de mercaptoetanol em cada tubo. Cerca de 100 mg de amostra macerada em Nitrogênio líquido foi colocada no tubo, que foi agitado em vortex,

resfriado na temperatura ambiente e em seguida extraído uma vez com 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v), sob agitação por 2 min. Após centrifugação a 10000 rpm por 10 min a 4°C, coletou-se o sobrenadante e a ele adicionou-se 188 µL de 10M LiCl, e misturou-se por inversão do tubo. As amostras foram mantidas a 4°C, por 12 h para precipitação do RNA. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a 10000 rpm por 30 min na temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o “pellet” (RNA) em 200 µL de tampão SSE (mantido a 37°C). Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v), misturando-se por inversão do tubo e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 min. Ao sobrenadante recuperado, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto e deixou-se a -20°C durante 2 h. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi lavado com etanol 75% e fez-se uma nova centrifugação a 14000 rpm por 20 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante e deixando-se secar o pellet em temperatura ambiente. O RNA seco foi solubilizado em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC). A quantificação da concentração de RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e reagentes do kit Quant-it (Invitrogen), segundo as instruções dos fabricantes. A qualidade do RNA foi aferida por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo brometo de etídio e visualização sob luz UV no fotodocumentador Gel Doc 2000 da BIO RAD.

Para a degradação do DNA residual presente nas amostras de RNA extraídas foi utilizada DNase turbo DNA-free TM (Ambion). As amostras de RNA tratadas foram utilizadas na síntese da primeira fita de cDNA, que foi obtida com o uso do kit SuperScriptR VILO™ cDNA synthesis (Invitrogen). Tais procedimentos foram realizados segundo as instruções dos fabricantes.

4.6. Identificação de sequências

A pesquisa de seqüências de ESTs (Expressed Sequence Tags) foi realizada no banco de dados da empresa Fibria Celulose SA, utilizando como iscas seqüências de nucleotídeos dos fatores de transcrição de interesse conhecidos em *Arabidopsis thaliana*, *Pinus taeda*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Vitis vinifera* e *Populus trichocarpa* para a busca destas sequências. Para a análise comparativa foi realizado um novo alinhamento BLAST, incluindo também as espécies representativas do grupo Viridiplantae (*A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Sorghum*

bicolor, *Selaginella moellendorffii* e *Physcomitrella patens*). As 40 sequências mais similares foram alinhadas por Neighbor-joining, utilizando o software MAFFT (Kato et al., 2005). A relação filogenética das sequências de proteínas alinhadas foi, então, inferida por máxima verossimilhança utilizando PhyML (Guindon et al., 2010), com o modelo de substituição WAG e teste aLTR. Visto isso, as prováveis sequências ortólogas foram agrupadas em “contigs” com o auxílio do algoritmo CAP3 do programa BioEdit (Hall, 1999). Os contigs formados foram novamente comparados nas bases de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; PlnTFDB, <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>; e PlantTFDB, <http://plantfdb.cbi.edu.cn/>) através da ferramenta BLAST para a confirmação da identidade dos fatores de transcrição.

A tabela 5 contém os ESTs utilizados para fazer o contig representativo para os três eucaliptos estudados. As sequências de ESTs foram escolhidas baseadas nas relações filogenéticas estabelecidas pela análise, estas sequências e suas relações com os genes utilizados como iscas podem ser consultadas no Anexo I, que contém as árvores filogenéticas.

Para os FTs *AtBP*, *AtMYB61* e *VvMYB5* foram encontradas 3 ESTs para cada gene, para *AtMYB4*, *AtMYB85*, *AtMYB46* e *AtMYB52* foram encontradas 2 ESTs e para *AtVND7* e *AtMYB103* apenas 1 EST foi localizada.

Para os FTs *EgMYB1*, *EgMYB2* e *EcLIM1* não foram realizadas análises filogenéticas porque para estes genes já havia sido encontradas ESTs com alta similaridade.

4.7. Construção de primers

Os pares de “primers” foram obtidos utilizando o programa OligoAnalyser versão 3.1 (IDT), com parâmetros padrões. As melhores combinações, após a formação das estruturas secundárias, foram escolhidas com o programa GeneRunner (Ramakers et al., 2003). Foram desenhados 12 pares de primers (Tabela 5) para os fatores de transcrição e adicionalmente 10 pares de primers de expressão constitutiva em eucaliptos (Tabela 6).

4.8. Reações de RT-PCR em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR, foram feitas utilizando-se o aparelho iCycler iQ5 (Bio-Rad). As reações foram feitas em volume final de 10 µL, sendo 5 µL de “QuantiFastTM SYBR Green – PCR Mix” (Qiagen), 0,4 µM (concentração final) de cada um dos primers, 3 µL de cDNA e 1,6 µL de água MilliQ autoclavada. As condições de termociclagem tiveram um passo inicial de 95°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 30 s e uma etapa final de 71 ciclos de 60/95°C

por 30 s (curva de dissociação). As reações foram feitas em triplicatas biológicas e, para cada réplica biológica, foram feitas triplicatas técnicas. Foram feitas também triplicatas de reações controle, livres de DNA. Os cálculos do nível de expressão usaram ($2^{\Delta\Delta Ct}$) conforme proposto por Livak and Schmittgen (2001). Utilizou-se o módulo de expressão normalizada, no qual os dados de expressão do gene alvo são normalizados com relação à expressão de genes de referência, constitutivos em plantas. Os genes de referência utilizados foram validados previamente utilizando-se os softwares geNorm (Vandesompele et al., 2002) ou NormFinder (Andersen, 2004). A combinação dos constitutivos mais estáveis (melhor combinação) dentro de cada experimento de frio ou estresse hídrico para cada espécie estão em Moura et al., (2012), os quais foram utilizados como genes de referência nos cálculos de expressão.

4.9. Análise estatística

Os tratamentos foram analisados por ANOVA e comparações entre o tratamento e seu respectivo controle foram realizadas pelo teste t de Student com 5% de significância para análises de trocas gasosas e dosagem de lignina (KL). Os dados de expressão gênica foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% para comparação de médias utilizando-se o software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. USA).

Tabela 5: Primers usados nas análises de expressão dos fatores de transcrição.

Genes	ESTs	Nome do Primer	Sequência	Fragmento amplificado (pb)
<i>AtBP</i>	EUGBHW201BD049F05.b	KNAT1F	GAAACAGAATTACCTGAGATTG	138
	EUMALW201BD002C07.b	KNAT1R	CTTAGGTAGTTTTCTTTCTTC	
	EUMALW201BD047F04.b			
<i>AtVND7</i>	EFFOWDE02AM306A08.g	VND7F	GAGACTACATGAATCCTCGG	123
		VND7R	CCCAGAGAGATTGATGATTC	
<i>AtMYB4</i>	EUUGHW309BF001E08.b	MYB4F	GTTGGCGAACTCTTCCTAAG	120
	GNPEXYN03AW002B01.g	MYB4R	CCTCTTCATCCTCAGCAAAG	
<i>AtMYB61</i>	EUUGHW308BE036H09.b	MYB61F	CTCTGAGGTTGAACATGGTG	91
	EUUGHW308BD050C10.b	MYB61R	GGACAGACCATTTGAGGAC	
	EUUGHW309BE006D08.b			
<i>AtMYB85</i>	EUUGHW202BD011C05.b	MYB85F	AACCGACAACGAAATAAAGAAC	118
	GNGLXYN01AU096A03.g	MYB85R	TCGGATGGAGTTTTCTGAGG	
<i>VvMYB5</i>	EFFOWDE02AF296H04.g	MYB5F	GACGGACTGACAATGAGATC	111
	EFFOSLB07AM040C11.g	MYB5R	TCTGGGTTTCTGGATTGAGC	
	EFFOWDE02AP309C10.g			
<i>EgMYB1</i>	*	MYB1F	CAGCCCTCCTTCTCATCAAC	139
		MYB1R	ACTCTCGATCACCCCAACAC	
<i>EgMYB2</i>	EUGBHW201BD024C11.b;	MYB2F	CTGTTGCCGAGAATGTTGTG	112
		MYB2R	AGAGTTGTCGTCTCCGATGG	
<i>AtMYB46</i>	EUUGHW309BE024E11.b	MYB46F	CACTTGCATTCCATCCTTG	109
		MYB46R	GCCTCTTCTTTATGGTCGAGTT	
<i>AtMYB52</i>	GNPEXYN01AZ031D10.b	MYB52F	GTTGTAGGTTGAGGTGGTTC	132
	EFFOWDE02AM238G09.g	MYB52R	ATAGCCTTGCGATGACAGAC	
<i>AtMYB103</i>	EUUGHW308BF002C06.b	MYB103F	GTGGGAAGAGTTGTAGGTTG	125
		MYB103R	AGCCCATCTGTTGCCTAC	
<i>EcLIM1</i>	*	LIM1F	CGCAAAACAGAAGCCAAATC	147
		LIM1R	CCTTGTTTCGTTGAGCTGTCA	

*ESTs no Anexo II pb: pares de bases

*ESTs no Anexo II pb: pares de bases

Tabela 6: Primers usados nas análises de expressão dos genes constitutivos.

pb indica número de pares de base do fragmento a ser amplificado.

Genes constitutivos	Nome do Primer	Sequência	Fragmento (pb)
Fator de Elongação 1 α	EF1aF	CCTGTCCTTGATTGTCACACTTCC	130
	EF1aR	CCATTCCAGCATCACCGTTCTTC	
Ubiquitina C	UbqC_glo_F	TCCGTCAAAAGCGAACAGA	173
	UbqC_glo_R	CATTTCCCTCCAGATTACCC	
Ubiquitina C	UbqC_urg_F	GGACTTTCGTTTCGTTTTGGT	107
	UbqC_urg_R	GTGATTTGGGGAGGGTTTG	
Actina	ActForward	AGATGACCCAGATTATGTTTGAGACCTTC	122
	ActReverse	ACCATCACCAGAATCCAACACAATACC	
Proteína SAND	sand_F	TGGGTCACACAGGATTTTGA	130
	sand_R	CTCCCAGCAAAAAGATCTCG	
NADP-isocitrato desidrogenase	icdh_F	AGTTTGAGGCTGCTGGAATC	100
	icdh_R	CTTGCATGCCCACACATAAC	
Histona H2B	h2b_F	AACAAGAAGCCCACCATCAC	142
	h2b_R	ACAACCTTCCTCCTCGCTCAC	
α-Tubulina	atub_F	CCAGTGAACAAATGCCCTCT	92
	atub_R	TGATCAGCAACAACACAGCA	
Ribossomal 18S	18S2_F	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	71
	18S2_R	TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT	
Tubulina β	beta_Tub_xanF	GATGGGGACGCTATTGATTT	225
	beta_Tub_xanR	CTTGGGTTGATGAGTTTCAGG	

5. RESULTADOS

5.1. Trocas gasosas e potencial hídrico

5.1.1. Experimentos de baixa temperatura: A taxa de fotossíntese nos híbridos de *E. urograndis* apresentou diferenças na assimilação, mas sendo reduzida em todos os casos (Figuras 3A,4A,5A). Por outro lado, os controles de cada híbrido aumentaram os valores de assimilação ao longo do tratamento, enquanto que as plantas submetidas a estresse estão na maioria das vezes menores em relação a seus controles. O mesmo foi observado para *E. uroglobulus* (Figura 6A), mas não para *E. globulus* (Figura 7A), para o qual plantas em temperatura baixa mantiveram os níveis de fotossíntese semelhantes às plantas mantidas na temperatura ambiente.

No geral, os três clones de *E. urograndis* (Figuras 3B,4B,5B), *E. uroglobulus* (Figura 6B) e *E. globulus* (Figura 7B) também apresentaram queda na transpiração sob tratamento de frio ao longo do ensaio e, novamente, *E. globulus* apresentou comportamento semelhante entre plantas tratadas e controle (Figuras 7B). Para condutância, os três clones *E. urograndis* (Figuras 3C,4C,5C) novamente apresentaram comportamento semelhante, onde as plantas sob baixa temperatura tiveram redução ao longo do tratamento. Porém aqui, plantas controle e tratadas de *E. uroglobulus* (Figura 6C) e *E. globulus* (Figura 7C) não mostraram diferenças entre elas.

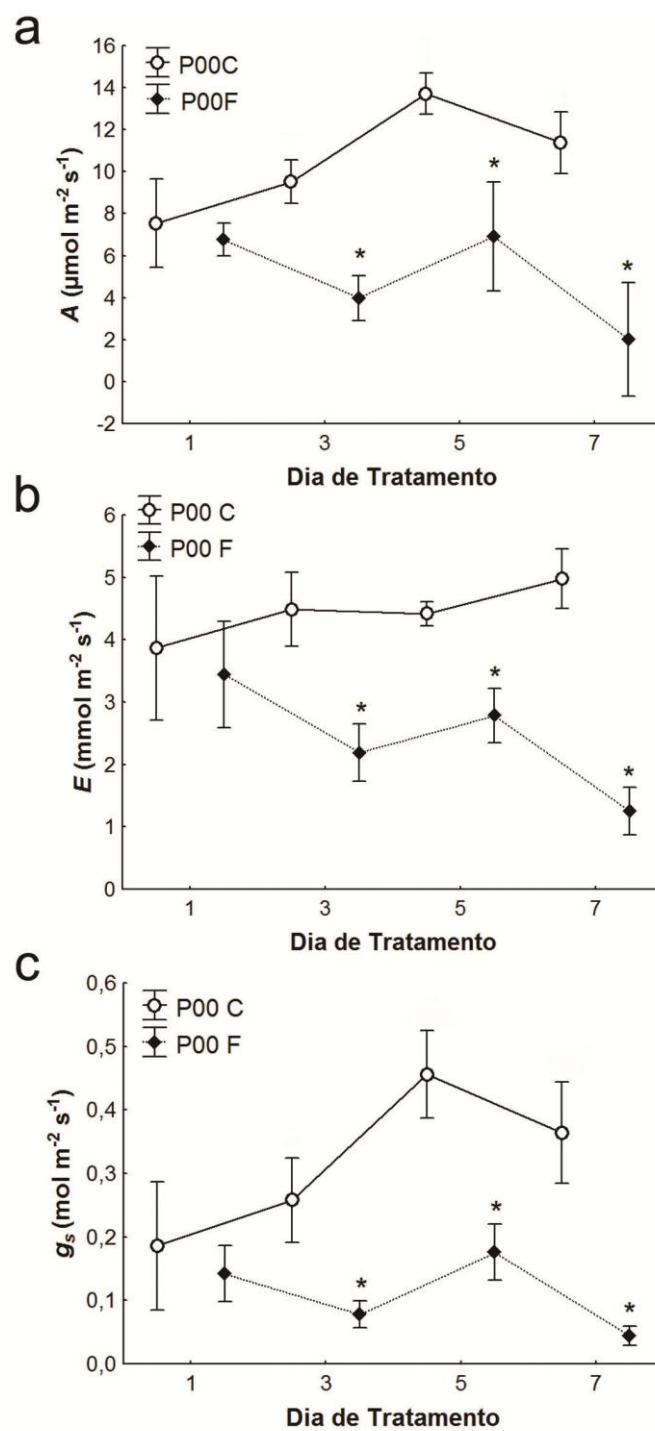


Figura 3: Trocas gasosas em *E. urograndis* P00.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em plantas expostas ao frio (F) ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

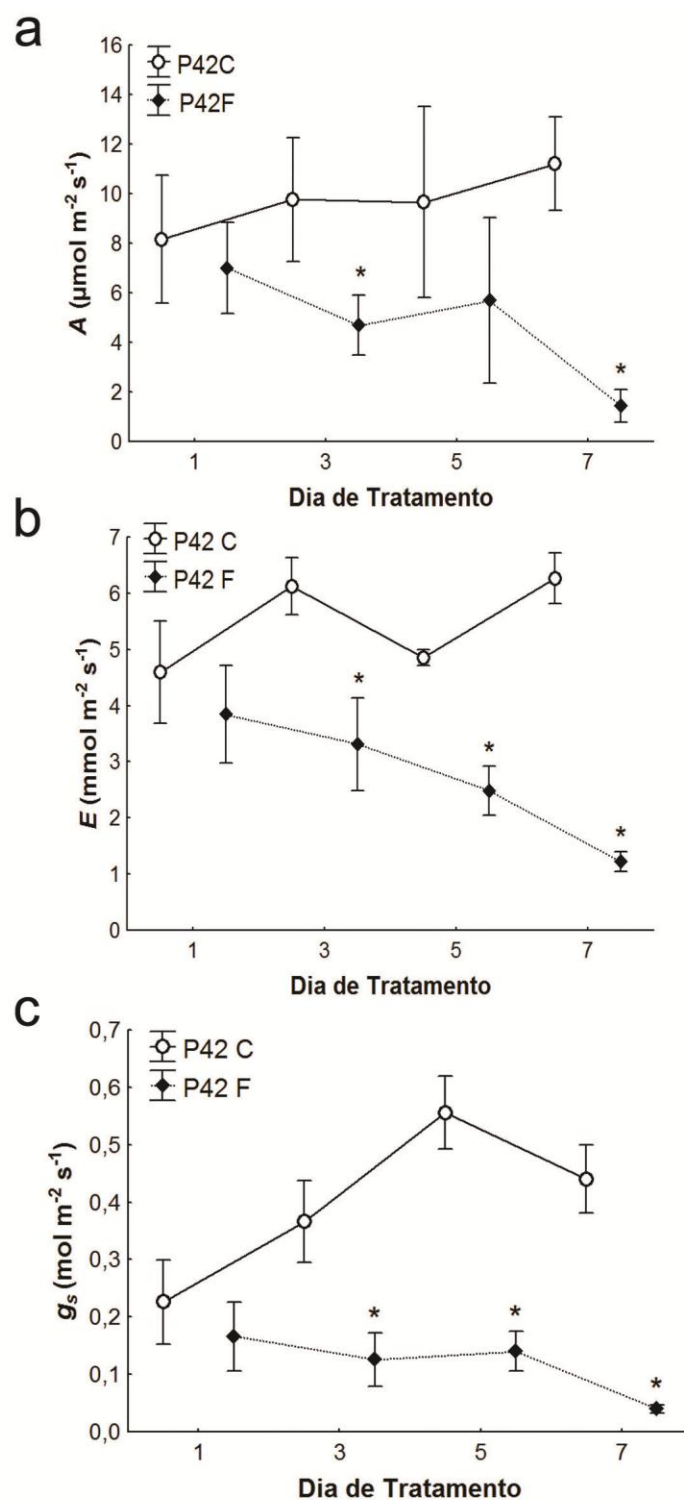


Figura 4: Trocas gasosas em *E. urograndis* P42.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em plantas expostas ao frio (F) ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

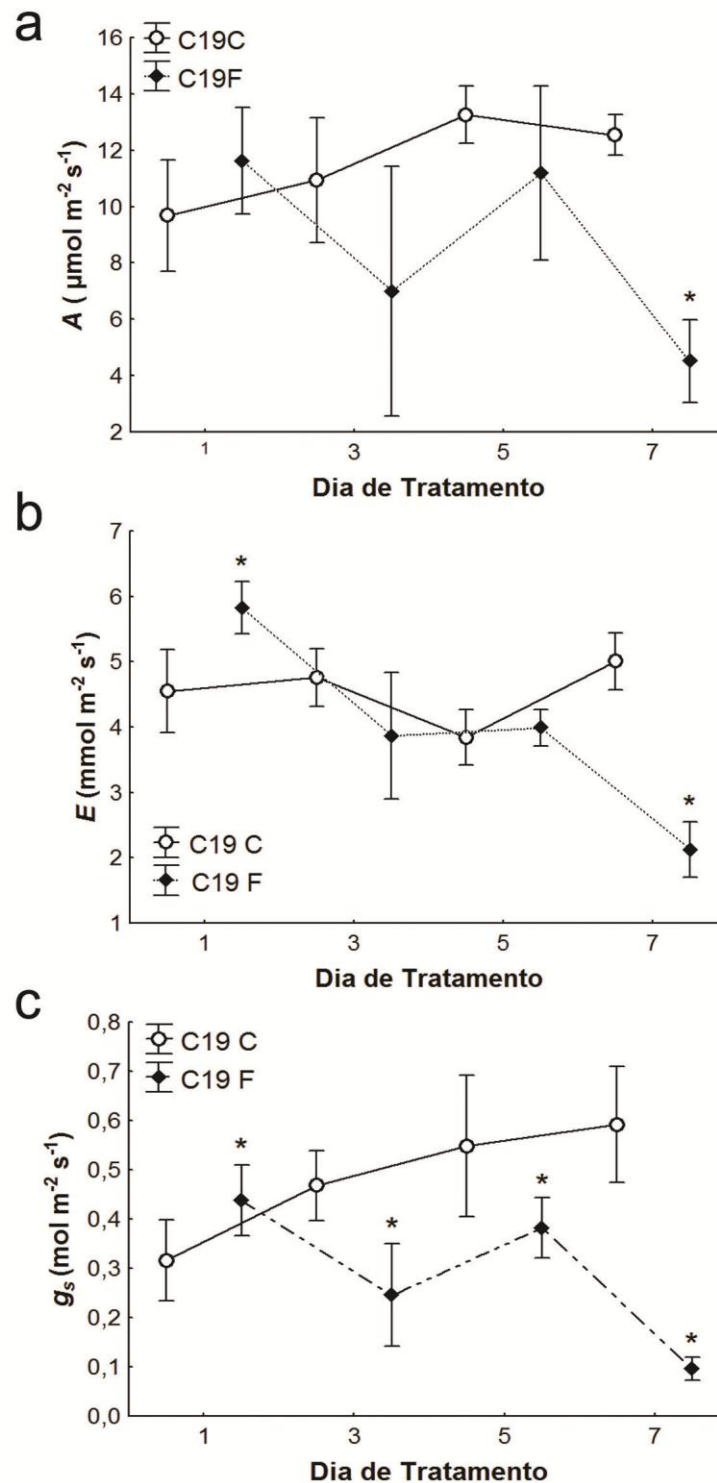


Figura 5: Trocas gasosas em *E. urograndis* C19.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em plantas expostas ao frio (F) ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

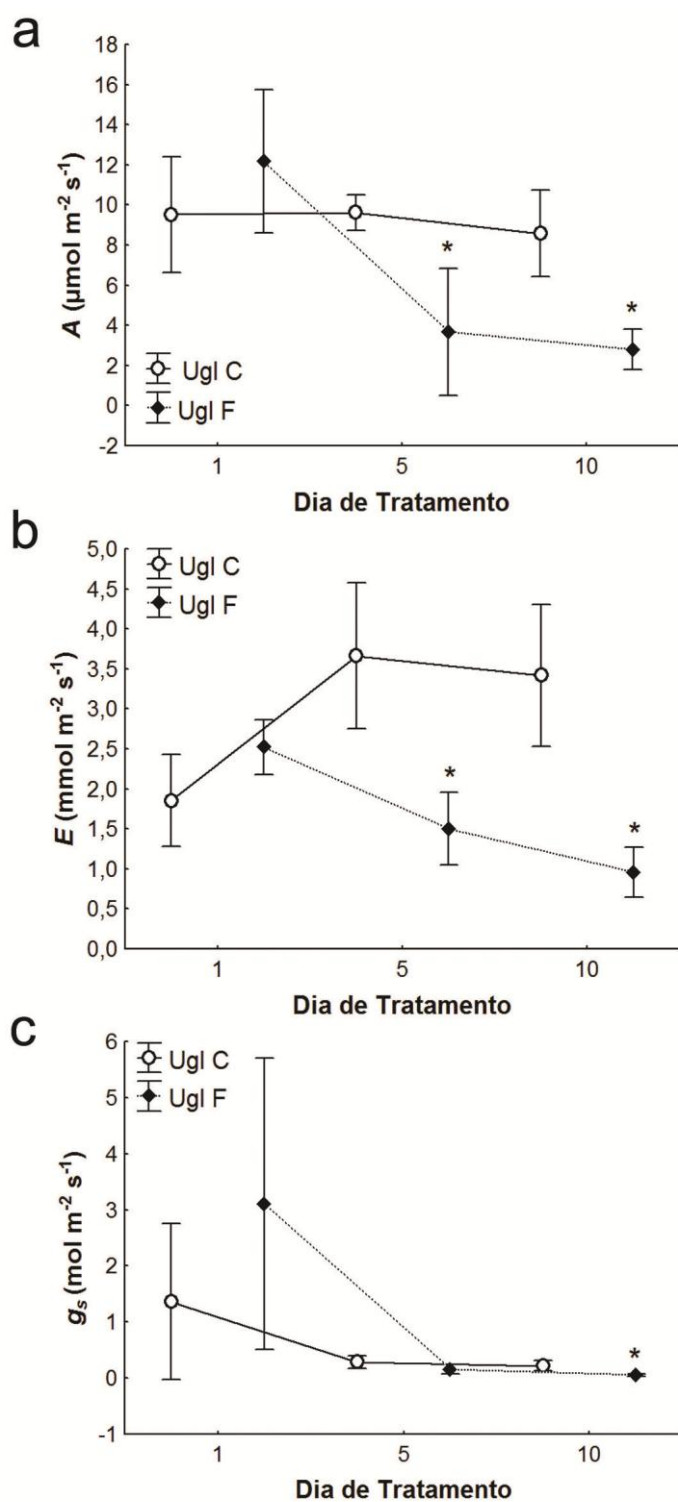


Figura 6: Trocas gasosas em *E. urolobulus*.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em plantas expostas ao frio (F) ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

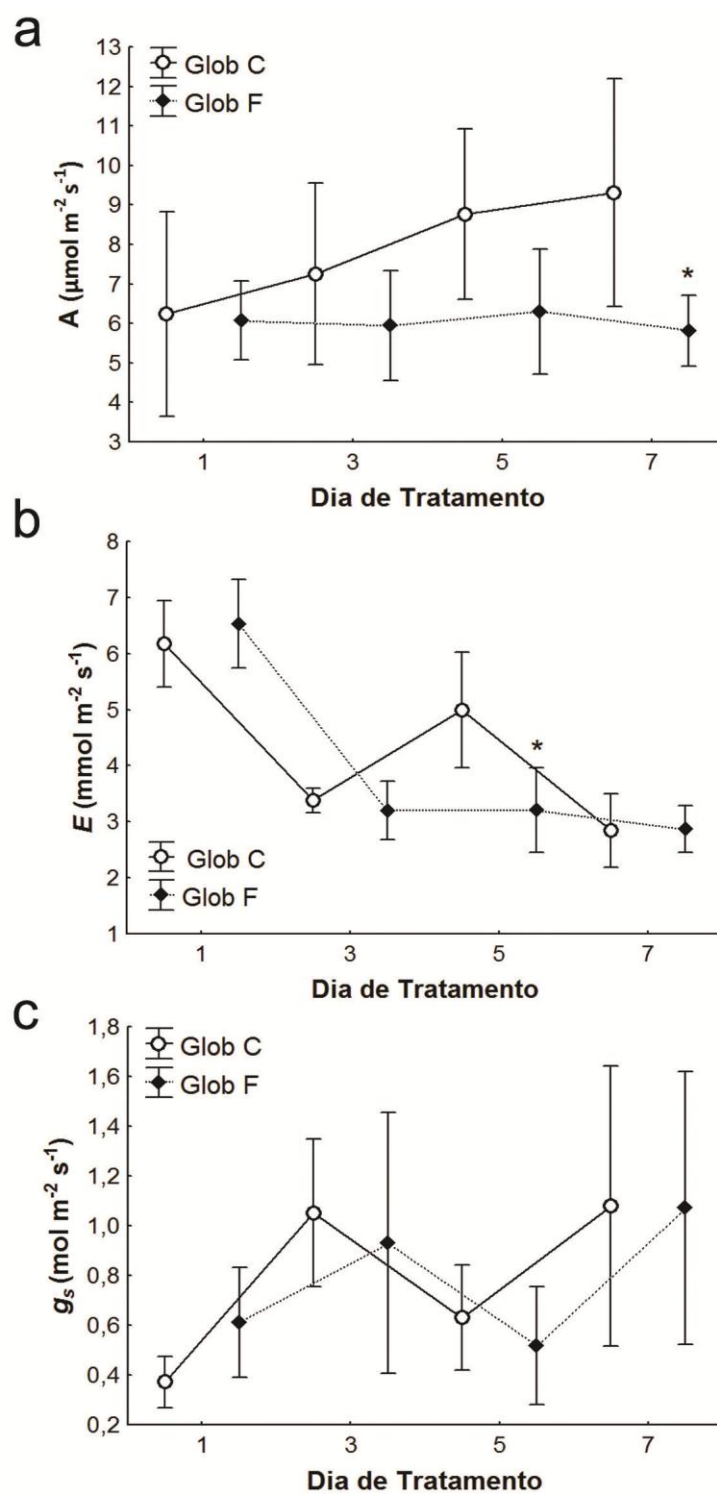


Figura 7: Trocas gasosas em *E. globulus*.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em plantas expostas ao frio (F) ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

5.1.2. Experimento de estresse hídrico

A análise do potencial hídrico (Figura 8) mostrou reduções significativas para todos os eucaliptos estressados por deficiência hídrica.

Para as medidas de trocas gasosas nos ensaios de estresse hídrico ocorreu uma resposta similar em praticamente todos os representantes de eucalipto estudados (Figura 9). As taxas de assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática apresentaram redução significativa para todos os híbridos e *E. globulus* do grupo seca.

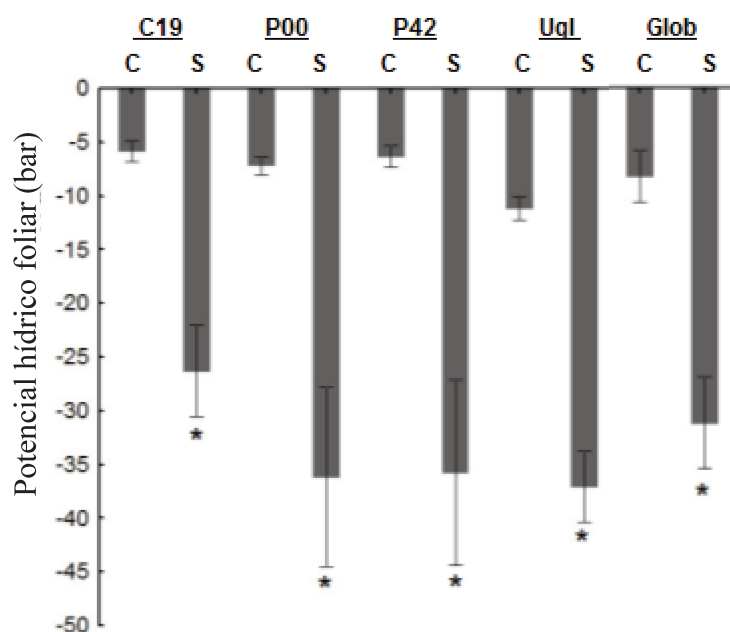


Figura 8: Potencial hídrico.

Potencial hídrico (ψ_w) foliar para *E. urograndis* (C19, P00, P42), *E. uroglobulus* (Ugl) e *E. globulus* (Glob) expostos a seca (S) e controle (C). Médias $\pm$ desvio padrão; n=5. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

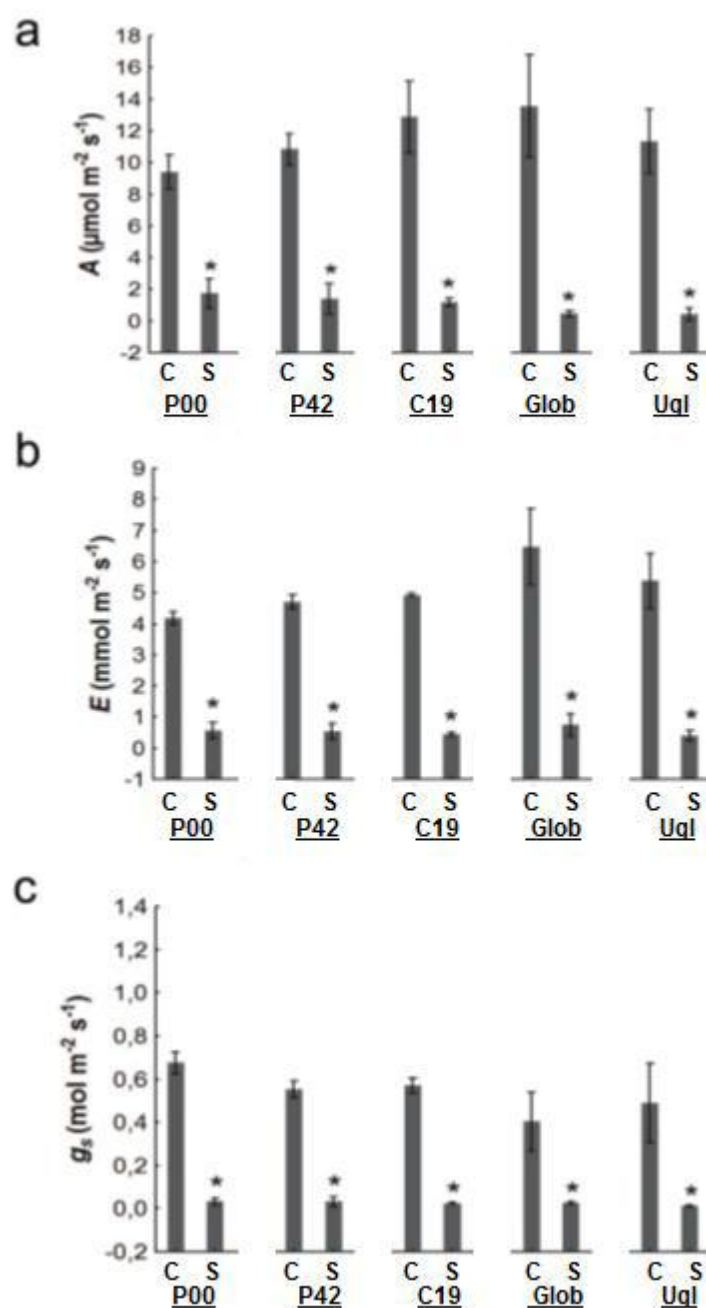


Figura 9: Trocas gasosas para o experimento de estresse hídrico.

Assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em *E. urograndis* (C19, P00, P42), *E. uroglobulus* (Uql) e *E. globulus* (Glob) expostos a seca (S), ou não (controle - C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=5$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

5.2. Dosagens de lignina

E. globulus apresentou no ensaio de baixa temperatura aumento da quantidade de lignina insolúvel, solúvel e total no ápice caulinar (Figura 10). Na região da base também foi observado aumento das porções insolúvel e total de lignina (Figura 11). Em *E. urolobulus* a fração insolúvel e total aumentaram tanto na base quanto no ápice (Figuras 10 e 11) no ensaio de baixa temperatura. Porém a lignina solúvel aumentou apenas na base (Figura 11). O estresse causado por déficit hídrico (Figuras 12 e 13) não trouxe tanta modificação ao teor de lignina quanto o de baixa temperatura.

Nos ensaios de baixa temperatura, se verificou mudanças nos híbridos *E. urograndis* C19 e P42. Na região do ápice a lignina solúvel apresentou redução no clone P42, e C19 teve redução nos níveis de lignina solúvel e total (Figura 10). Nas bases caulinares houve aumento para lignina insolúvel e total em C19 (Figura 11). Para as análises feitas no experimento de estresse hídrico destes híbridos, apenas *E. urograndis* C19 não teve alterações. *E. urograndis* P42 teve a quantidade de lignina solúvel e total para o grupo seca na região da base reduzida (Figura 13). *E. urograndis* P00 mostrou no grupo ápice seca (Figura 12) redução na lignina solúvel, assim como na lignina total para amostra de seca base (Figura 13).

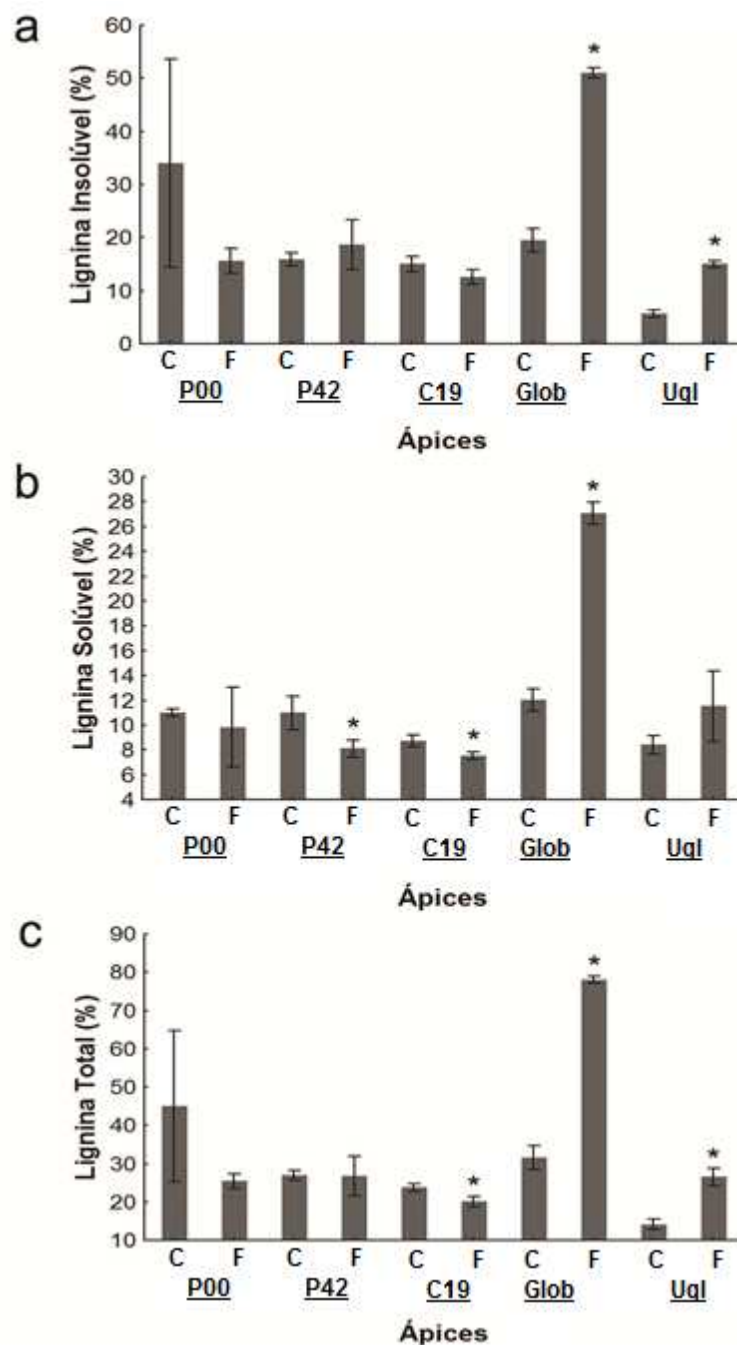


Figura 10: Dosagem de lignina pelo método Klason (KL) para o experimento de baixa temperatura na região dos ápices.

Ápices caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. urolobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C). Médias $\pm$ desvio padrão; $n=3$. Diferenças significativas com relação ao respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

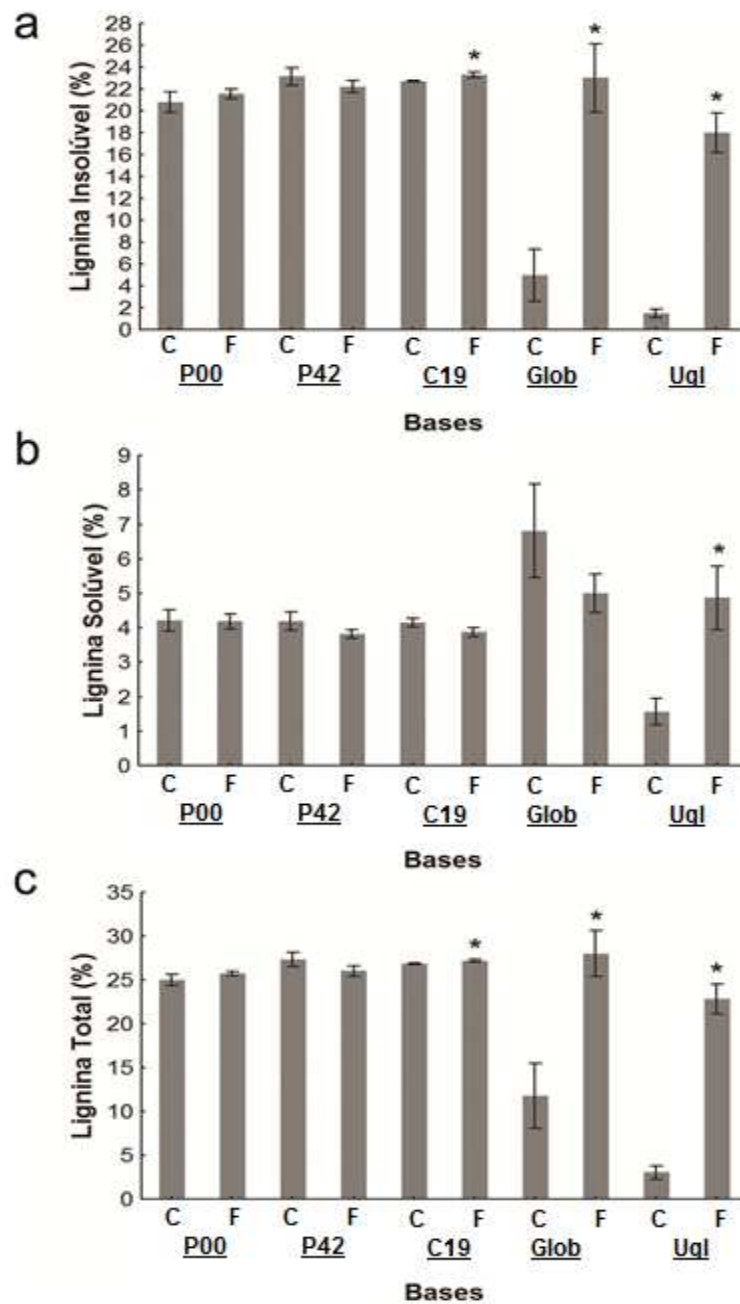


Figura 11. Dosagem de lignina pelo método Klason (KL) para o experimento de baixa temperatura na região das bases.

Bases caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C). Médias $\pm$ Desvio Padrão; n=3. Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

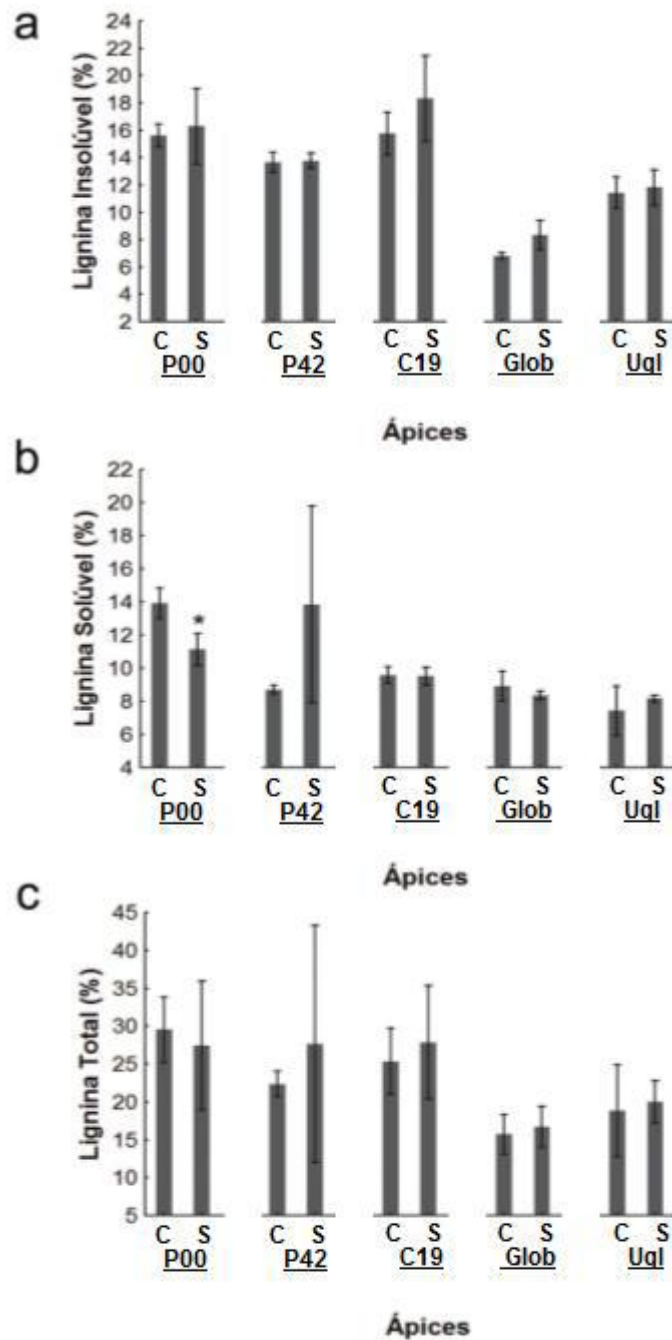


Figura 12: Dosagem de lignina pelo método Klason (KL) para o experimento de estresse hídrico na região dos ápices.

Ápices caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S) ou em condições controle (C). Médias $\pm$ Desvio Padrão; n=3. Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

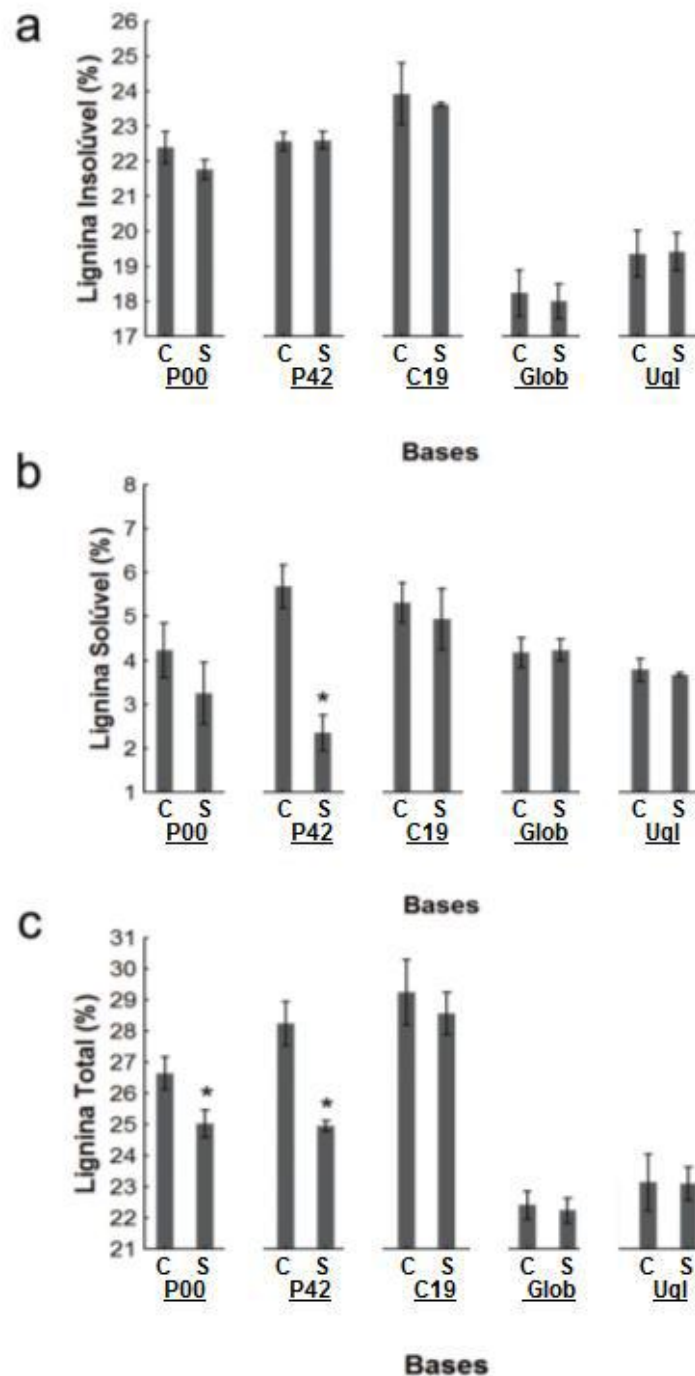


Figura 13: Dosagem de lignina pelo método Klason (KL) para o experimento de estresse hídrico na região das bases.

Bases caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S) ou em condições controle (C). Médias $\pm$ Desvio Padrão; n=3. Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle estão representadas por asteriscos de acordo com teste t Student ($p < 0,05$).

5.3. Análises de expressão

Para as análises de expressão dos fatores de transcrição foram excluídos os híbridos *E. urograndis* P00 e C19, pois o volume de análises seria muito grande. O clone P42 foi escolhido com base nas respostas bioquímicas de dosagem de lignina nos ensaios de baixa temperatura e de estresse hídrico, sendo o único que apresentou alterações significativas em ambos os tratamentos.

No experimento por estresse hídrico, para o fator de transcrição MYB103, não foi possível realizar as análises para o híbrido *E. uroglobulus* região do ápice caulinar pois as amostras estavam degradadas e não amplificaram.

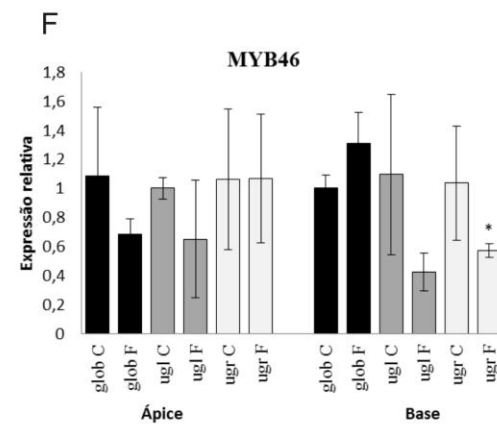
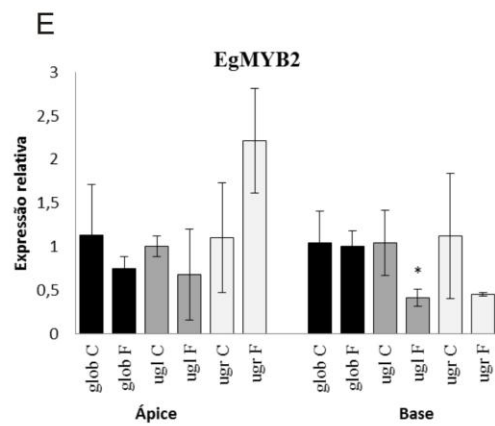
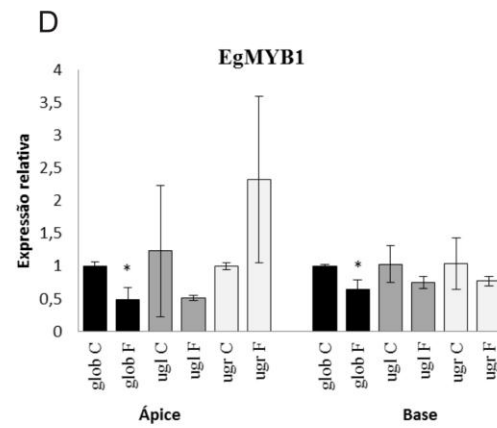
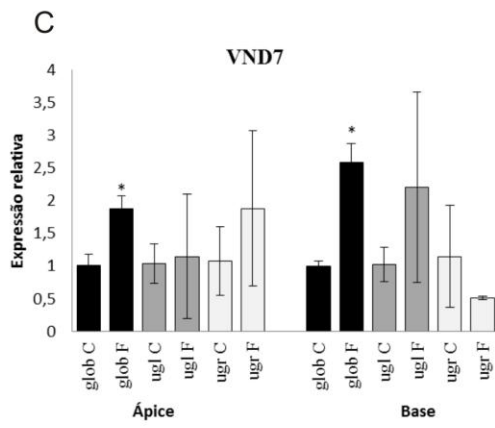
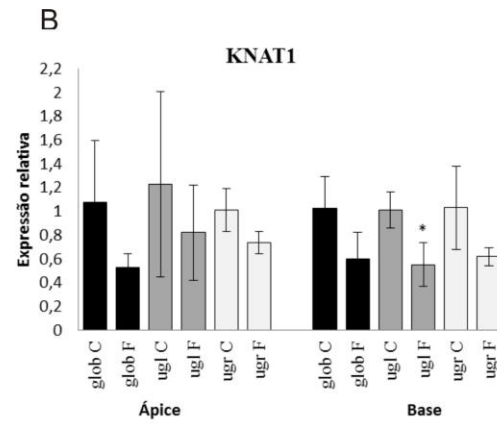
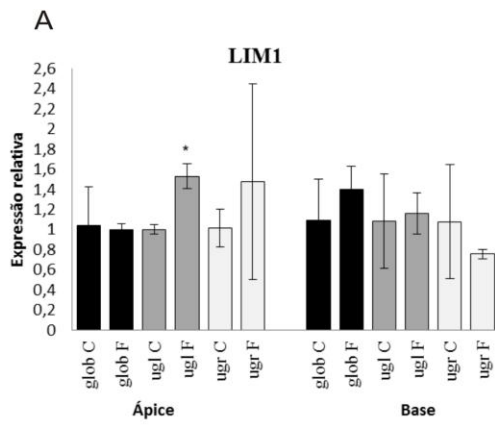
5.3.1 Experimento de baixa temperatura noturna

Ainda que as variações observadas tenham sido grandes, chama atenção nos resultados obtidos determinados padrões, mas alguns não estatisticamente significativos.

No ápice os FTs *MYB4*, *EgMYB1*, *EgMYB2*, *MYB52* e *MYB85* mostraram menos transcritos em *E. uroglobulus* no frio (ugl F) e mais transcritos em *E. urograndis* no frio (ugr F), que seus respectivos controles (Figura 14). Já na base, os FTs *MYB4*, *EgMYB1*, *EgMYB2*, *MYB52*, *MYB46*, *MYB61* e *MYB85* mostraram menos transcritos em *E. uroglobulus* no frio (ugl F) assim como menos transcritos em *E. urograndis* no frio (ugr F), que seus respectivos controles. *KNAT1* mostrou padrão semelhante entre ápice e base. *VND7*, *LIM1* e *MYB103* fugiram a estes padrões.

Em relação ao *E. globulus*, notou-se padrão semelhante ao *E. uroglobulus* para o ápice em *EgMYB1*, *EgMYB2*, *MYB52*, *MYB46*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103*. *VND7* no ápice teve padrão semelhante à *E. urograndis*. Na base, *E. globulus* assemelhou-se ao *E. uroglobulus* em *EgMYB1*, *VND7*, *KNAT1*, *MYB61* e *MYB85*.

As diferenças estatísticas observadas mostram alterações consistentes no ápice e base para o número de transcritos em *E. globulus* para os genes *EgMYB1* e *VND7*. *MYB103* fugiu aos padrões descritos anteriormente.



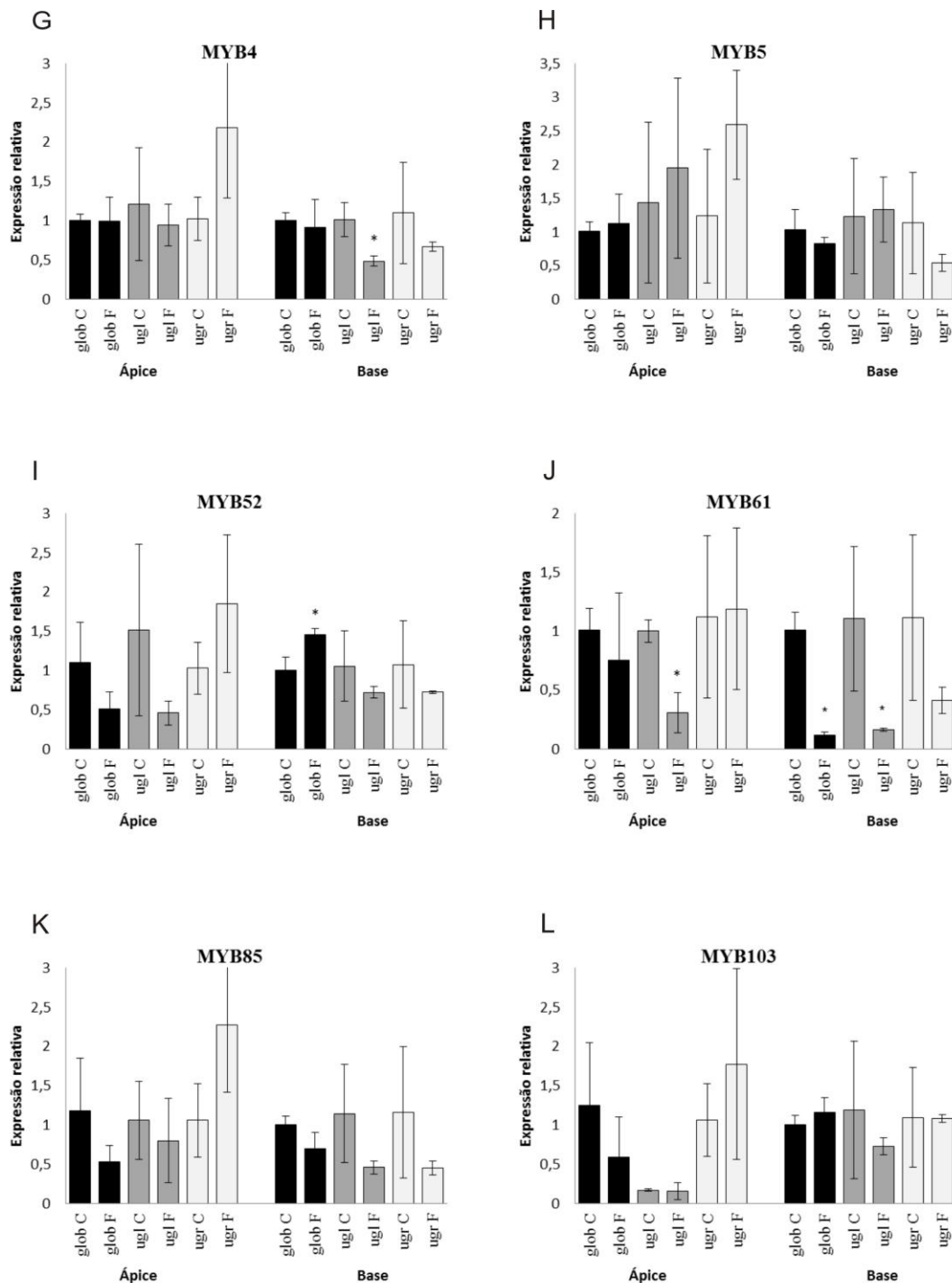


Figura 14: Expressão gênica relativa dos FTs para o experimento de baixa temperatura.

As siglas utilizadas correspondem a *E. globulus* (glob), *E. uroglobulus* (ugl) e *E. urograndis* P42 (ugr), submetidos a baixa temperatura (F) e a condições controle (C). Médias $\pm$ desvio Padrão; n=3. * Indica diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

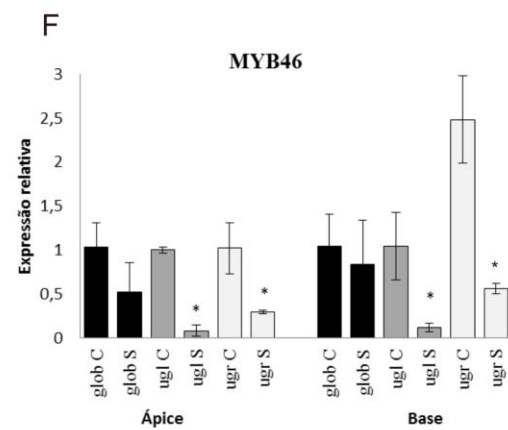
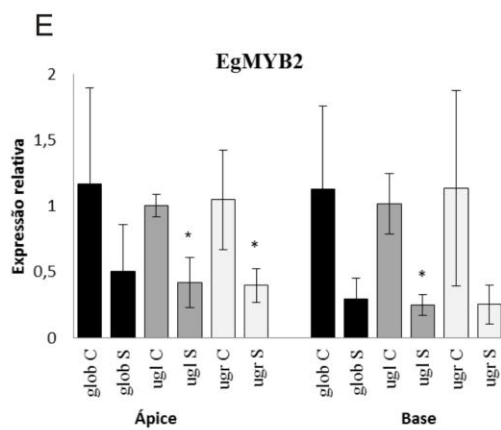
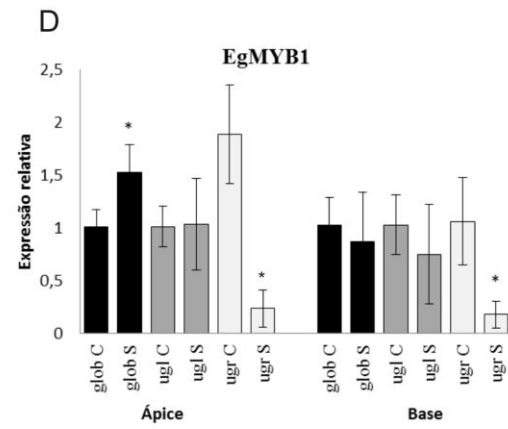
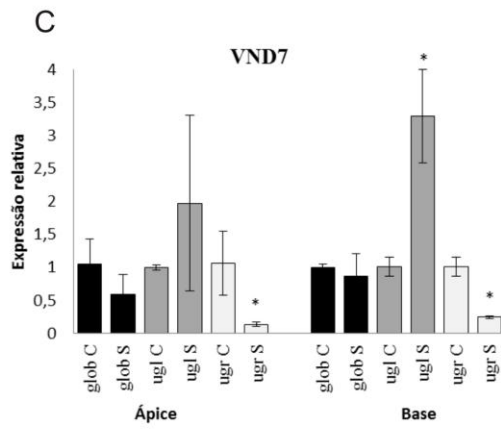
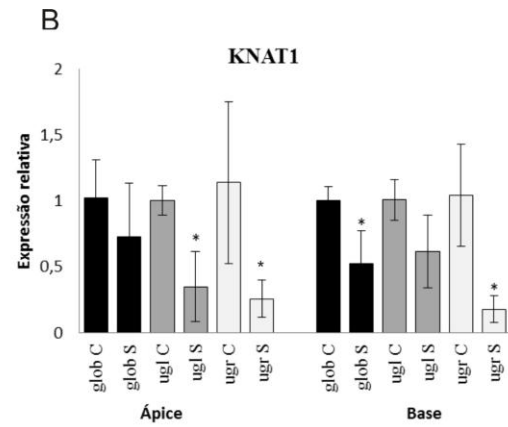
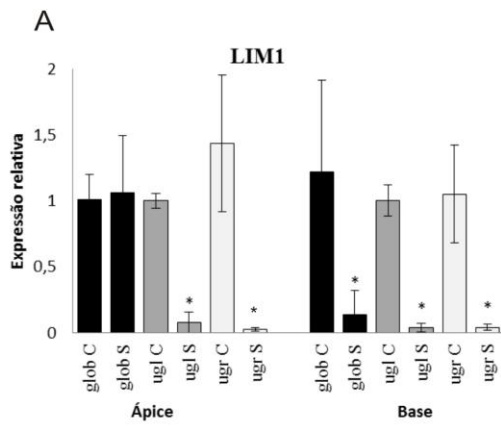
5.3.2 Experimento de estresse hídrico

O tratamento de seca afetou drasticamente a expressão de alguns FTs. Se considerarmos as tendências observadas, redução de transcritos ocorreu em ápice e base de *E. urolobulus* e *E. urograndis* para os FTs *EgMYB2*, *MYB46*, *KNAT1*, *LIM1*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103*. Ainda para *E. urolobulus*, *MYB5* e *MYB52* apresentaram padrão semelhante de expressão na base, mas não no ápice.

Para *E. globulus*, de certa forma ápice e base seguiram o padrão de expressão das outras duas espécies, ou seja redução de expressão, para *EgMYB2*, *KNAT1* e *MYB103*.

Por outro lado, a seca levou ao aumento no número de transcritos de *MYB5* nas três espécies e nos dois tecidos. A seca também causou aumento de transcritos no ápice e base de *E. urolobulus*, na base de *E. globulus* e redução na base de *E. urograndis* e no ápice de *E. globulus* para *MYB4*. No entanto, para o ápice de *E. globulus* observou-se aumento em *EgMYB1*.

As diferenças estatísticas observadas mostram alterações consistentes no ápice e base para o número de transcritos dos genes *EgMYB2*, *MYB46*, *KNAT1*, *LIM1*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103*, porém preponderantemente em *E. urolobulus* e *E. urograndis*.



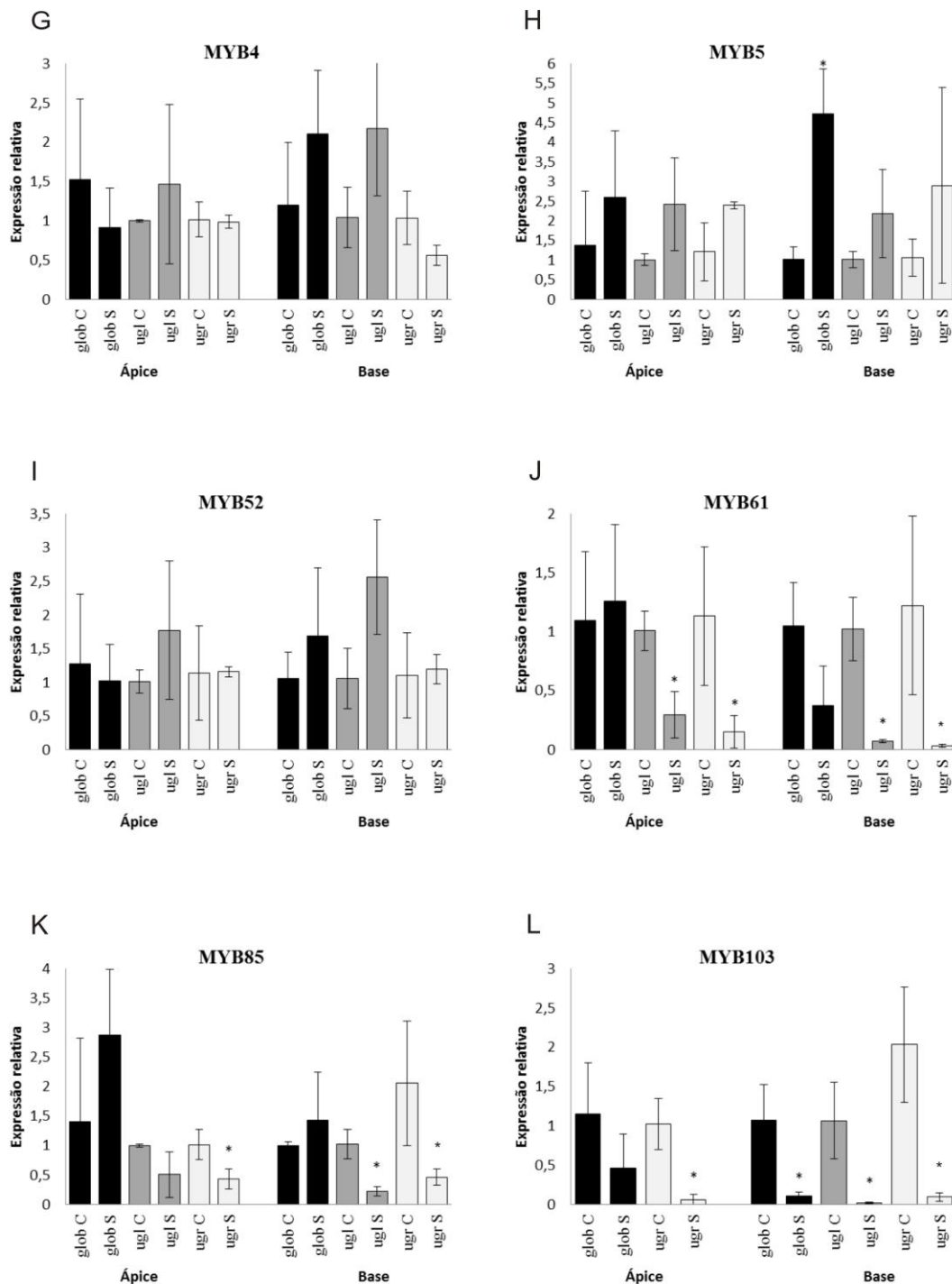


Figura 15: Expressão gênica relativa dos FTs para o experimento de estresse hídrico.

As siglas utilizadas correspondem a *E. globulus* (glob), *E. urolobulus* (ugl) e *E. urograndis* P42 (ugr), submetidos a estresse hídrico, grupo seca (S) e condições controle (C). Médias $\pm$ desvio Padrão; n=3. * Indica diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas tiveram como intuito verificar a imposição do estresse nas plantas tratadas, através da variação, na maioria dos casos, para menores taxas. Sabe-se que fatores como a redução da taxa de fotossíntese e alterações nas trocas gasosas podem afetar a biossíntese de lignina em plantas submetidas a estresse por baixa temperatura e estresse hídrico, levando ao aumento do conteúdo desse polímero em determinados órgãos das plantas (Zagoskina et al., 2005; Yoshimura et al., 2008).

Para o tratamento de baixa temperatura, *E. globulus* praticamente manteve fotossíntese, condutância estomática e transpiração semelhantes aos controles não estressados, evidenciando características próprias para esta espécie, pois naturalmente sua ocorrência se dá em ambientes mais frios (Paiva et al., 2011). Porém, os demais eucaliptos estudados mostraram redução desses parâmetros com a imposição de temperatura baixa.

Por outro lado, o estresse hídrico levou à redução desses parâmetros em todos os eucaliptos. A suspensão do fornecimento de água resultou em potenciais hídricos bastante baixos em todos os eucaliptos.

Dessa forma, os tratamentos adotados, baixa temperatura noturna e suspensão de rega foram eficientes em levar ao desenvolvimento de estresse, evidenciados por parâmetros relacionados às trocas gasosas e conteúdo de água nas plantas.

6.2. Análises de expressão e de dosagem de lignina

Para simplificar a apresentação da discussão, foram feitas figuras (Figuras 16 e 17) que ilustram os dados que foram estatisticamente diferentes, indicados nas figuras relativas ao teor de lignina e de expressão de FTs, e que foram apresentadas na seção Resultados.

6.2.1. Tratamento de baixa temperatura noturna

Em condições de estresse por baixa temperatura (Figura 16), no ápice e na base o teor de lignina insolúvel aumentou em *E. globulus*, mas houve também aumento de lignina solúvel no ápice.

O aumento de lignina em *E. globulus* no ápice e base foi acompanhado pelo aumento de transcritos de *VND7*, cuja expressão está associada especificamente nos vasos do xilema (Zhong et al., 2008) e ao qual também é atribuída a função de controlar FTs relacionados com o programa de morte celular (Yamaguchi et al., 2011). O FT *EgMYB1*, repressor da síntese de enzimas específicas da via de lignina, apresentou queda de sua expressão tanto no ápice quanto na base caulinar. Este FT é preferencialmente expresso no xilema secundário de caules e raízes de árvores de *Eucalyptus*, e regula negativamente os genes *EgCCR* e *EgCAD2*, ambos de *E. gunnii* (Legay et al., 2007). Outros FTs que tiveram expressão significativamente alterada foram notados apenas na base do caule de *E. globulus*. *MYB52*, que é um FT de ativação, também teve sua expressão aumentada nesta espécie. Pouco se sabe acerca de sua ação gene específica, mas estudos recentes com mutantes tem mostrado seu papel na cascata de regulação de parede celular secundária (Zhong et al., 2008). *MYB61* mostrou redução do número de transcritos e tem sido indicado como um FT ativador da via de biossíntese de lignina (Zhao and Dixon, 2011). Sabe-se que mutantes *det* têm maiores níveis de expressão de *MYB61*, o que coincide com a deposição ectópica de lignina, mas o modo de ação deste FT permanece desconhecido (Newman et al., 2004). Porém, o que se notou é que houve acúmulo de lignina nos tecidos de *E. globulus*. Não é possível afirmar qual fator de transcrição estaria desempenhando maior controle, mas sendo *VND7* um controlador “master switch” de vários FTs da família MYB (Gray et al., 2012), é esperado que mudanças em sua expressão promovessem variação do conteúdo de lignina. No entanto, é interessante notar que, ao mesmo tempo em que os ativadores *VND7* e *MYB52* tiveram suas expressões aumentadas, *EgMYB1*, um repressor, teve sua expressão diminuída.

O tratamento de baixa temperatura levou a alterações dos níveis de lignina em ápices e bases de *E. urolobulus* de maneira semelhante ao *E. globulus*. Ou seja, houve aumento de lignina insolúvel no ápice e base. No ápice, *LIM1* teve sua expressão aumentada, enquanto *MYB61* (ativador) reduziu no ápice e na base. O primeiro TF é um regulador positivo dos genes codificando para as enzimas PAL, 4CL e CAD em tabaco (Kawaoka and Ebinuma, 2001). *EcLIM1*, isolado de *Eucalyptus camaldulensis*, também apresenta o mesmo papel regulador, mas controlando a expressão de PAL, C4H e 4CL (Seite, 2007). Assim, no ápice uma maior expressão de *LIM1* poderia explicar o aumento de lignina. Na base dessa espécie outros três genes tiveram sua expressão alterada por baixa temperatura. *KNAT1* e *MYB4*, ambos repressores, e *MYB2*, um ativador, tiveram suas expressões reduzidas. O FT *EgMYB2* é regulador chave na formação de

parede celular secundária a também pode ativar *EgCCR* e *EgCAD2* (Goicoechea et al., 2005). Adicionalmente, sugere-se que *EgMYB2* poderia induzir a expressão de *MYB4*. Desta forma, estando *EgMYB2* com menor expressão, consequentemente *MYB4* também estaria com menor expressão, como observado para esta situação. Por outro lado, mutantes de *Arabidopsis* para o FT BREVIPEDICELLUS (BP/KNAT1) apresentaram aumento de deposição de lignina nos mutantes (*bp*) e redução da lignificação em plantas superexpressando este gene (Mele et al., 2003). KNAT1 parece controlar negativamente vários genes da biossíntese de lignina, como *CCoAOMT*, *COMT*, *4CL*, *C4H* e *PAL1*, sugerindo que o controle se dê pela regulação de várias enzimas na formação dos monolignóis. Logo, é coerente o aumento de lignina observado, estando este FT com a expressão reprimida.

FRIO	Ápice			Base		
	glob	ugl	urg	glob	ugl	urg
LIM1		↑				
KNAT1					↓	
VND7	↑			↑		
EgMYB1	↓			↓		
MYB46						↓
EgMYB2					↓	
MYB4					↓	
MYB5						
MYB52				↑		
MYB61		↓		↓	↓	
MYB85						
MYB103						
Klason Solúvel	↑		↓		↑	
Klason Insolúvel	↑	↑		↑	↑	
Klason Total	↑	↑		↑	↑	

Figura 16: Resumo das análises de expressão gênica e dosagem de lignina para o experimento de baixa temperatura.

Flechas para cima coloridas representam aumento de expressão e para baixo, redução da expressão. A cor azul representa função ativadora do FT e nuances da cor vermelha, função inibidora. A tonalidade escura representa *E. globulus*, a tonalidade média representa *E. urolobulus* e a tonalidade clara representa *E. urograndis* P42. Flechas de cor preta referem-se a maior ou menor quantidade de lignina.

Em relação à *E. urograndis*, não se observou alteração coerente entre lignina e expressão de nenhum FT. A redução de lignina solúvel no ápice não foi acompanhada de nenhuma alteração significativa de expressão, da mesma forma que a diminuição de expressão em *MYB46*, não foi seguida de alteração de lignina na base (Figura 16).

6.2.2 Tratamento de estresse hídrico

Apesar do tratamento de estresse hídrico ter gerado as maiores alterações significativas de expressão de FTs, pouco variou o teor de lignina (Figura 17). Apenas *E. urograndis* teve diminuição de lignina solúvel na base do caule. Estresses normalmente afetam a expressão gênica e no caso de lignina, tem sido demonstrado que a variação no conteúdo desse polímero depende não só do tipo e intensidade do estresse, mas também do tecido e órgão analisados (Moura et al., 2010). Ainda, dependendo do estresse é possível que haja alteração da expressão de genes, porém sem alteração do conteúdo de lignina, como relatado por Moura et al., (2010). Provavelmente a alteração gênica afetaria a constituição da lignina, mas não seu conteúdo (Lapierre et al., 1999).

Nas análises de expressão chama atenção o fato de que a maior parte das alterações foi de diminuição do número de transcritos e, ao mesmo tempo, os FTs que tiveram aumento do número de transcritos foram repressores (*EgMYB1* e *MYB5*). Porém, ao contrário desses genes, *KNAT1*, também um repressor de genes da biossíntese de lignina, teve sua expressão reduzida. E o FT *VND7*, um “master switch”, foi uma exceção por ser o único ativador que teve aumento da expressão.

Curiosamente, assim como foi observado no tratamento de baixa temperatura, *E. globulus* foi o genótipo que menos teve alteração na expressão de FTs. Por outro lado, *E. urograndis* foi o que apresentou maior alteração.

A redução do teor de lignina solúvel nas bases de *E. urograndis* P42 foi acompanhada da redução da expressão dos FTs de função ativadora *VND7*, *LIM1*, *MYB46*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103*, no entanto, houve redução também dos genes repressores da via de lignina *KNAT1* e *EgMYB1*. Deste modo, todos os genes estão com a expressão reprimida, o que é coerente com a redução do teor de lignina nesta região.

Embora os demais eucaliptos não tenham apresentado diferenças significativas para o teor de lignina, ao contrário da expressão gênica dos fatores de transcrição, podemos observar algumas

semelhanças no nível de expressão de FTs específicos para os três genótipos, por exemplo, *LIM1*, *KNAT1*, *EgMYB2* e *MYB46*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103* sempre estão com a expressão reduzida.

SECA	Ápice			Base		
	glob	ugl	urg	glob	ugl	urg
LIM1		↓	↓	↓	↓	↓
KNAT1		↓	↓	↓	↓	↓
VND7			↓		↑	↓
EgMYB1	↑		↓		↓	↓
MYB46		↓	↓		↓	↓
EgMYB2		↓	↓		↓	
MYB4						
MYB5				↑		
MYB52						
MYB61		↓	↓		↓	↓
MYB85			↓		↓	↓
MYB103			↓	↓	↓	↓
Klason Solúvel						↓
Klason Insolúvel						↓
Klason Total						↓

Figura 17: Resumo das análises de expressão gênica e dosagem de lignina para o experimento de estresse hídrico.

Flechas para cima coloridas representam aumento de expressão e para baixo, redução da expressão. A cor azul representa função ativadora do FT e nuances da cor vermelha, função inibidora. A tonalidade escura representa *E. globulus*, a tonalidade média representa *E. urolobulus* e a tonalidade clara representa *E. urograndis* P42. Flechas de cor preta referem-se a maior ou menor quantidade de lignina.

No geral, os diferentes FTs apresentaram expressão semelhante nos três genótipos, exceto *MYB85*, *VND7* e *EgMYB1*. O FT *MYB85* diminuiu a expressão em *E. urolobulus* e *E. urograndis* mas, não alterou em *E. globulus*. Novamente, *E. globulus* não teve mudanças no níveis de transcritos de *VND7*, ao contrário do observado para *E. urolobulus*, que apresentou aumento e *E. urograndis* que apresentou diminuição. E ainda, *EgMYB1* não alterou a expressão

em *E. globulus*, porém *E. urolobulus* teve aumento e *E. urograndis* reduziu a expressão. Visto que VND7 é um regulador chave na formação de parede secundária e MYB85 atua diretamente nas enzimas da via de biossíntese de lignina, as variações destes fatores podem estar relacionadas com a redução do conteúdo de lignina em *E. urograndis* pois, apenas neste genótipo coincidiu a redução de lignina e da expressão destes FTs.

Este trabalho se baseou apenas nos fatores de transcrição para discutir as variações que ocorreram na resposta aos estresses abióticos, mas vale ressaltar que fatores epigenéticos também podem atuar neste tipo de regulação. Os fatores epigenéticos alteram padrões de expressão gênica através de metilação do DNA, modificação de histona, sRNA e localização dos genes dentro do núcleo, por exemplo (Rapp and Wendel, 2005). Estes mecanismos reconhecidamente controlam a expressão gênica em nível temporal e espacial, no entanto, não foram motivo de estudo nesta pesquisa.

7. CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas podemos concluir que o estresse por baixa temperatura resulta em variações nos teores de lignina muito mais do que o estresse hídrico e que em nível de expressão, há maior variação dos FTs em plantas submetidas ao estresse hídrico comparado ao estresse por baixa temperatura noturna.

E. globulus submetidos ao frio apresentam aumento do teor de lignina e de transcritos do ativador de síntese da parede secundária *VND7*. Porém, não há alteração do teor de lignina em resposta ao estresse hídrico. Já em relação à expressão, aumentam os inibidores *MYB5* e *EgMYB1*, por outro lado, reduz os transcritos dos ativadores de síntese *LIM1* e *MYB103* e do inibidor de síntese de lignina *KNAT1*.

E. urolobulus submetidos à baixa temperatura apresentam aumento do teor de lignina assim como aumento da expressão de *LIM1*, um ativador específico. Na seca, não houve alteração do teor de lignina, no entanto foi expressiva a redução dos transcritos dos FTs *LIM1*, *EgMYB2* e *MYB46*, *MYB52*, *MYB61*, *MYB85* e *MYB103*, todos ativadores da via de biossíntese de lignina. No entanto, *VND7* é o único ativador da parede secundária que teve aumento de expressão.

E. urograndis apresenta menor quantidade de lignina apenas na região do ápice nas plantas tratadas com baixa temperatura, porém na base há redução de *MYB46*, um ativador chave na síntese de parede secundária e de lignina. Já no tratamento de seca, todos os FTs sofrem redução da expressão, inclusive *VND7* e *MYB85*, ativadores de início da via.

Dito isto, podemos verificar dados inéditos sobre a resposta de eucaliptos e fatores de transcrição relacionados à biossíntese de lignina, evidenciando possíveis candidatos para estudos mais aprofundados que podem variar e possivelmente modificar o teor e conteúdo de lignina, servindo como base para outros trabalhos.

8- REFERÊNCIAS

- Andersen CL** (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* **64**: 5245-5250
- Baucher M, Monties B, Montagu MV, Boerjan W** (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 125-197
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519-546
- Bok-Rye L, Kil-Yong K, Woo-Jin J, Jean-Christophe A, Alain O, Tae-Hwan K** (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**: 1271-1271
- Boudet A-M** (2000) Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 81-96
- Caldana C, Scheible W-R, Muller-Roeber B, Ruzicic** (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods* **3**: 1-9
- Campbell MM, Sederoff RR** (1996) Variation in lignin content and composition (mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants). *Plant Physiol* **110**: 3-13
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113-116
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, Hamdi S** (2006) Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **140**: 499-511
- Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T** (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **156**: 1364-1374
- Donaldson LA** (2002) abnormal lignin distribution in wood from severely drought stressed pinus radiata trees. *IAWA Journal* **23**: 161-178
- Fan L, Linker R, Gepstein S, Tanimoto E, Yamamoto R, Neumann PM** (2006) Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol* **140**: 603-612
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J** (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant Journal* **43**: 553-567
- Grattapaglia D** (2004) Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genet Mol Res* **3**: 369-379
- Grattapaglia D, Kirst M** (2008) Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytol* **179**: 911-929
- Gray J, Caparrós-Ruiz D, Grotewold E** (2012) Grass phenylpropanoids: Regulate before using. *Plant Science* **184**: 112-120
- Grotewold E** (2008) Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: Are we there yet? *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 138-144

- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307-321
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98
- Hatfield R, Fukushima RS** (2005) Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Science* **45**: 832-839
- Hausman JF, Evers D, Thiellement H, Jouve L** (2000) Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Reports* **19**: 954-960
- Janas KM, Cvikrová M, Palagiewicz A, Eder J** (2000) Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 587-593
- Janas KM, Cvikrová M, Palagiewicz A, Szafranska K, Posmyk MM** (2002) Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science* **163**: 369-373
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C** (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J* **19**: 6150-6161
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T** (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* **33**: 511-518
- Kawaoka A, Ebinuma H** (2001) Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. *Phytochemistry* **57**: 1149-1157
- Kawaoka A, Nanto K, Ishii K, Ebinuma H, Seite U** (2006) Reduction of lignin content by suppression of expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. *Silvae Genetica* **55**: 269-277
- Kullan AR, van Dyk MM, Hefer CA, Jones N, Kanzler A, Myburg AA** (2012) Genetic dissection of growth, wood basic density and gene expression in interspecific backcrosses of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *BMC Genet* **13**: 60
- Ladiges PY, Udovicic F, Nelson G** (2003) Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography* **30**: 989-998
- Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, Briere C, Seguin 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
- Li X, Weng JK, Chapple C** (2008) Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J* **54**: 569-581
- Lisboa SA, Evtuguin DV, Neto CP, Goodfellow BJ** (2005) Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. *Carbohydrate Polymers* **60**: 77-85
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402-408
- McCarthy RL, Zhong R, Ye Z-H** (2009) MYB83 is a direct target of *snd1* and acts redundantly with *myb46* in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1950-1964

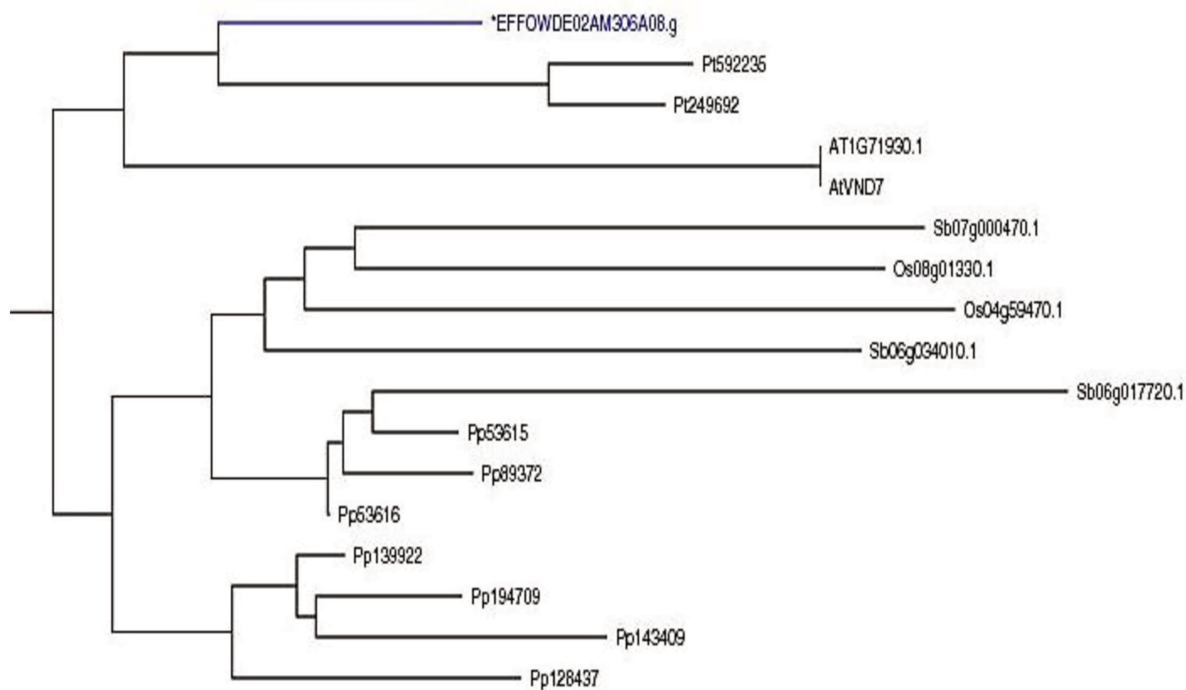
- Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S** (2003) The knotted1-like homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev* **17**: 2088-2093
- Moura JC, Araújo P, Brito MS, Souza UR, Viana JO, Mazzafera P** (2012) Validation of reference genes from *Eucalyptus spp.* under different stress conditions. *BMC Res Notes* **5**: 634
- Moura JC, Bonine CA, Viana JO, Dornelas MC, Mazzafera P** (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J Integr Plant Biol* **52**: 360-376
- Newman LJ, Perazza DE, Juda L, Campbell MM** (2004) Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant Journal* **37**: 239-250
- 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
- Ohman D, Demedts B, Kumar M, Gerber L, Gorzsas A, Goeminne G, Hedenstrom M, Ellis B, Boerjan W, Sundberg B** (2012) MYB103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin. *Plant J* **73**: 63-76
- Paiva JA, Prat E, Vautrin S, Santos MD, San-Clemente H, Brommonschenkel S, Fonseca PG, Grattapaglia D, Song X, Ammiraju JS, Kudrna D, Wing RA, Freitas AT, Bergès H, Grima-Pettenati J** (2011) Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis genes from deep-coverage BAC libraries. *BMC Genomics* **12**: 137
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Bevan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sederoff RR, Campbell MM** (2003) Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant Journal* **36**: 743-754
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**: 62-66
- Rapp RA, Wendel JF** (2005) Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* **168**: 81-91
- Ratcliffe OJ, Riechmann JL** (2002) *Arabidopsis* transcription factors and the regulation of flowering time: a genomic perspective. *Curr Issues Mol Biol* **4**: 77-91
- Riechmann JL, Ratcliffe OJ** (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 423-434
- Rogers LA, Dubos C, Cullis IF, Surman C, Poole M, Willment J, Mansfield SD, Campbell MM** (2005) Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* **56**: 1651-1663
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**: 1-12
- Villar E, Klopp C, Noirot C, Novaes E, Kirst M, Plomion C, Gion JM** (2011) RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. *BMC Genomics* **12**: 538
- Wang H, Zhao Q, Chen F, Wang M, Dixon RA** (2011) NAC domain function and transcriptional control of a secondary cell wall master switch. *Plant J* **68**: 1104-1114

- Wang HZ, Dixon RA** (2012) On-off switches for secondary cell wall biosynthesis. *Mol Plant* **5**: 297-303
- Yamaguchi M, Mitsuda N, Ohtani M, Ohme-Takagi M, Kato K, Demura T** (2011) VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J* **66**: 579-590
- Yang L, Wang CC, Guo WD, Li XB, Lu M, Yu CL** (2006) Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 390-395
- Yoshimura K, Masuda A, Kuwano M, Yokota A, Akashi K** (2008) Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol* **49**: 226-241
- Zagoskina NV, Olenichenko A, Klimov SV** (2005) The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO₂ exchange and phenolic compound formation. *Russian Journal of Plant Physiology* **52**: 320-325
- Zhao Q, Dixon RA** (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends in Plant Science* **16**: 227-233
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye Z-H** (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2763-2782
- Zhong R, Richardson EA, 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, Richardson EA, Ye Z-H** (2007) Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta* **225**: 1603-1611
- Zhong R, Ye Z-H** (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 564-572
- Zhong R, Ye ZH** (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal Behav* **4**: 1028-1034

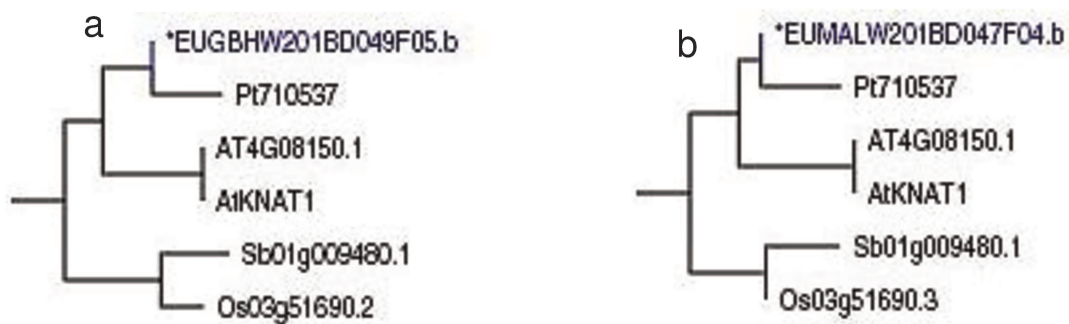
ANEXO I

Árvores filogenéticas de sequências dos fatores de transcrição prováveis ortólogos em eucalipto.

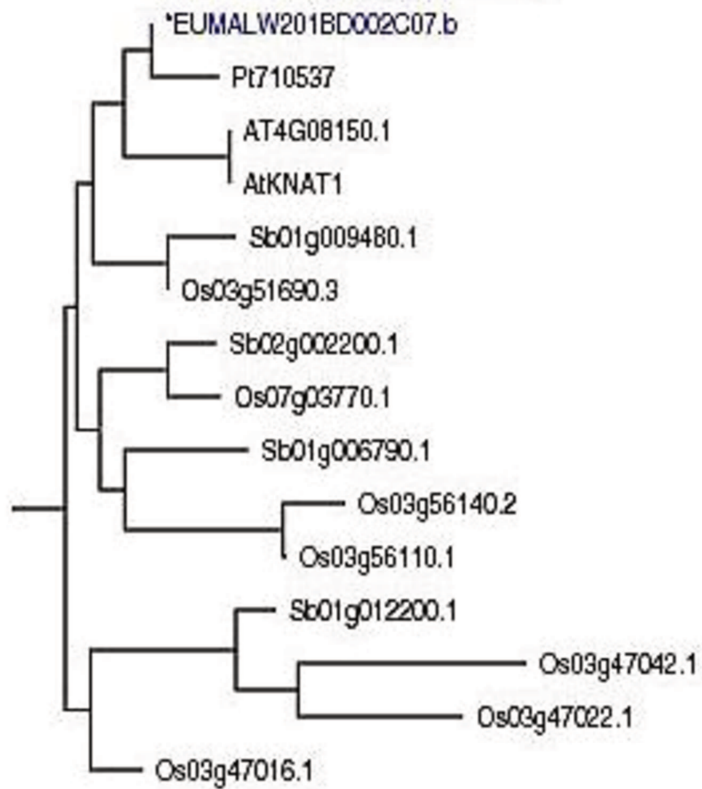
VND7



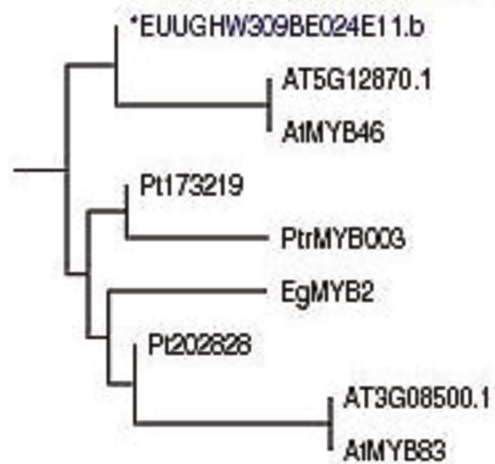
BP/KNAT1



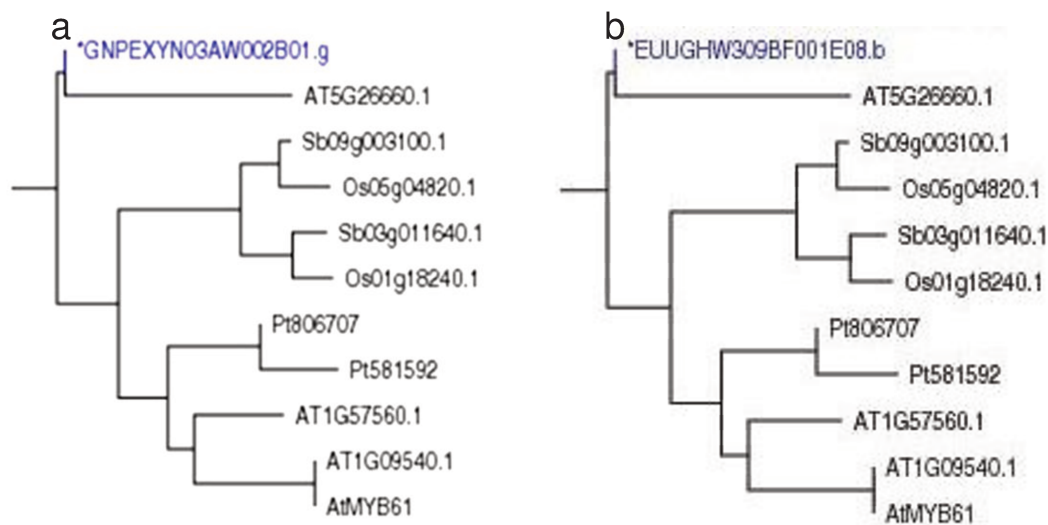
C



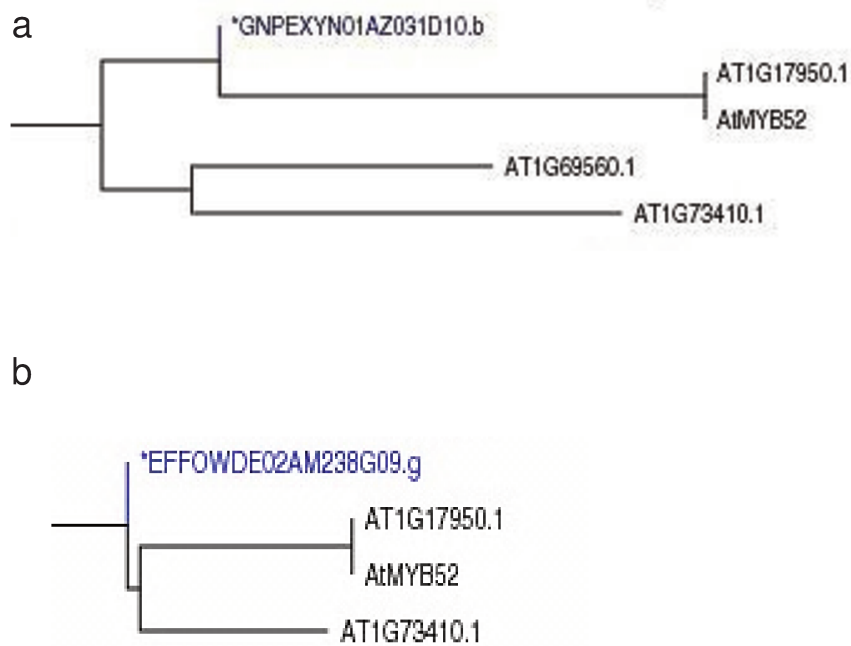
MYB46



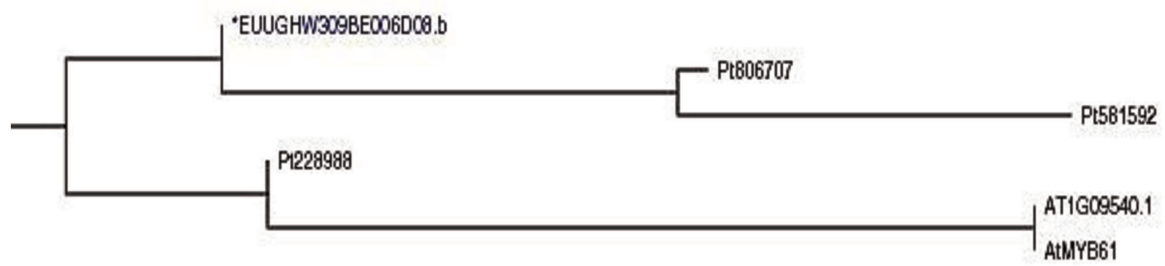
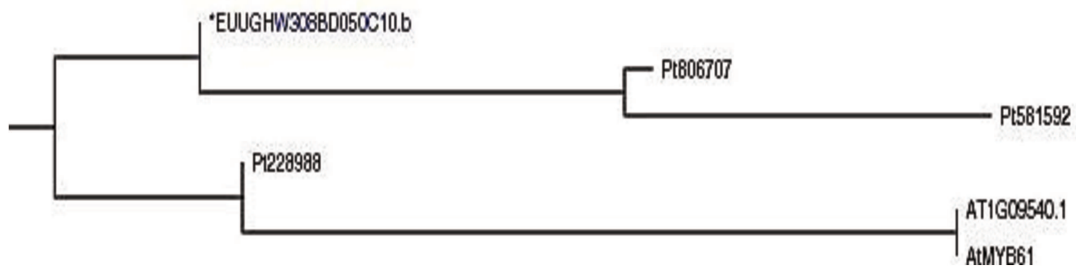
MYB4



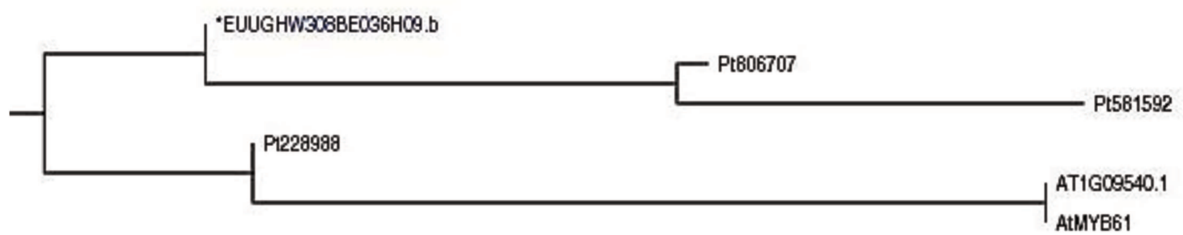
MYB52



MYB61



C

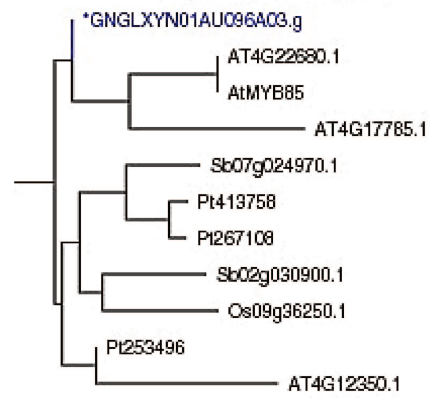


MYB85

a

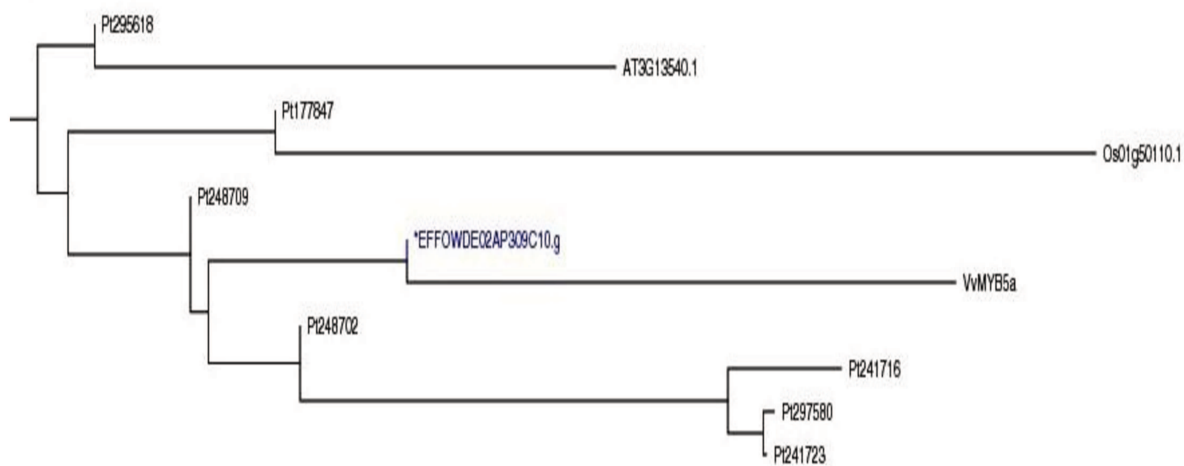


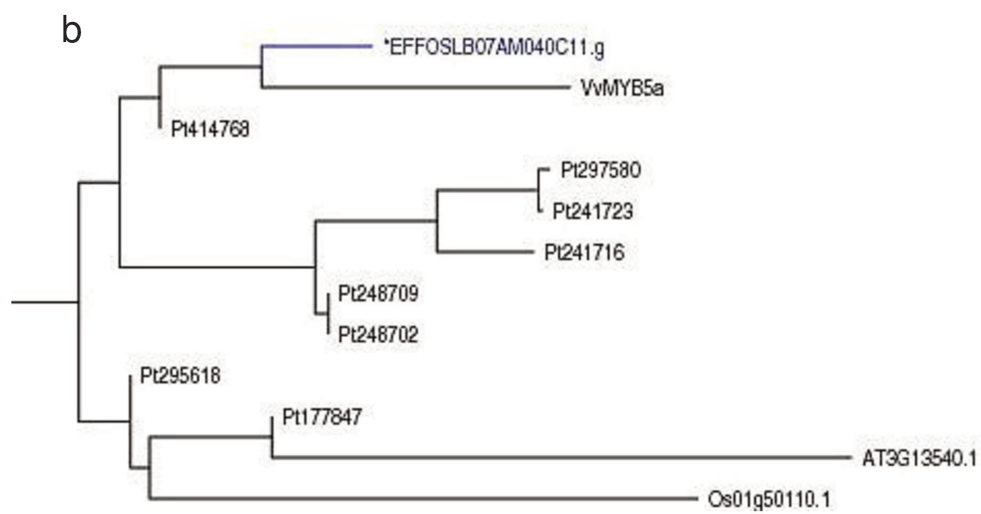
b



MYB 5

a





ANEXO II

ESTs utilizadas no alinhamento e formação dos contigs para os FTs MYB1 e LIM1 de eucalipto:

EgMYB1

GNGLXYN02AW030G04.g; EUUGHW301BF024B04.b; GNURXYN01AV006C04.b;
GNGLXYN02AW026G12.g; GLXYN01BA125C08.b; EUGBHW201BD036H05.b;
EUGBHW201BD041B10.b; GNGLXYN02AW024C04.g; GNGLXYN02AW002C12.g;
EFFOLVA02AB275H05.b; GNURXYN01AV083F01.

EcLIM1

EUUGHW105BD021H11; EUGBHW201BD074D11; GNGLXYN01AU026B06;
EUGBHW202BD023G02; EUGBHW201BD021C07; EUMALW201BD002G08;
EUGBHW202BD003D09; GNSPFXX02BA069D02; EFFOWDE02AJ221A06 ;
EUGBHW201BD065F05; EUGBHW201BD066D03; EUMALW201BD071G02;
GNGRXYN06BA003H03; EUMALW201BD070A12; EUMALW202BD007G05;
GNSPFXX02BA075H10; GNGRXYN06BA004D05; EUGBHW201BD071A12;
EUGBHW201BD061C12; EUGBHW201BD065B03; EUGBHW202BD033D11;
EUMALW202BD013B04; EUMALW201BD021G11; EUUGHW202BD021H12;
GNGLXYN01AU091D05; GNSPFXX02AW067F11; EUMALW202BD007D11;
EUGBHW201BD074D08; EUGBHW201BD034G12; EUGBHW201BD040A11;
EUGBHW201BD025G01; EUGBHW201BD050C11; EUGBHW202BD020H12;
EUUGHW104BD023F12; GNSPFXX02AW003F10; GNSPFXX02AW035C07;
EUUGHW307BF002D05; EUGBHW202BD020C12; EUGBHW202BD017G07.