



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Identificação e caracterização molecular das lacases de eucalipto
(Eucalyptus grandis)

Mariana de Lara Campos Arcuri

Botucatu – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Identificação e caracterização molecular das lacases de eucalipto
(*Eucalyptus grandis*)

Mariana de Lara Campos Arcuri

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

BOTUCATU – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Arcuri, Mariana de Lara Campos.

Identificação e caracterização molecular das lacases de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) / Mariana de Lara Campos Arcuri. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Eucalipto. 3. Estresse vegetal. 4. Lacase. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: Estresses abióticos; Eucalipto; Expressão gênica; Lacases.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e me amparar em momentos difíceis.

Aos meus pais, pela dedicação, amor e inspiração, com quem compartilho o mérito desta conquista, “pais, os amo!”.

Ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação, dedicação e paciência.

Às pessoas que passaram por minha vida e que, de alguma forma, me auxiliaram na construção do meu ser, no entanto, em especial, ao Alexandre Bortoloto, Lê, sem o qual o caminho teria sido mais árduo, o agradeço por fazer parte da minha história.

Aos colegas que, por vezes, se tornaram professores, psicólogos, *coaches* e tantos outros profissionais durante o convívio, em particular, à Alessandra Vasconcellos, por sempre estar disposta a me ouvir e oferecer uma visão crítica e incentivadora, definitivamente, a ela devo muito de meu aprendizado e entusiasmo.

Aos demais amigos, aqui incluem-se os caninos, que por vezes souberam me confortar apenas com o olhar, muito embora constantemente, ofereceram algumas lambidas e patadas também.

Ao meu irmão e demais familiares, estendo aos familiares não sanguíneos: tios, tias e irmãs, agradeço o amparo e apoio.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Suzano Papel e Celulose pelo fornecimento de material vegetal.

RESUMO

Arcuri MLC **Identificação e caracterização molecular das lacases de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)** [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

As lacases, *p*-diphenol-O₂-oxidoreductases, são enzimas que desempenham papel fundamental na oxidação de monolignóis durante a biossíntese de lignina, estando, portanto, associadas a processos de crescimento e tolerância a alguns tipos de estresses abióticos. As lacases podem ser encontradas em bactérias, fungos, plantas e insetos. Estudos apontam que as lacases vegetais apresentam comportamento similar às de origem fúngica, atuando de forma complementar à rota de lignificação, em resposta ao estresse oxidativo, promovendo a detoxificação celular. As lacases são geralmente codificadas por famílias multigênicas. Através de análises *in silico* no genoma de eucalipto, o presente estudo identificou 54 genes codificadores de lacases (denominados *EgLAC*) que, filogeneticamente, se distribuem em seis diferentes subgrupos. Com base em dados de RNA-Seq, padrões distintos de expressão das lacases identificadas foram observados, sendo algumas enriquecidas em um dado órgão/tecido e outras com expressão não detectável pelo método. Análises de RT-qPCR de alguns genes selecionados com base em um banco de sequências expressas confirmaram, por exemplo, a expressão raiz-específica do gene *EgLAC52* bem como as expressões preferenciais em raiz e folha dos genes *EgLAC4* e *EgLAC32*, respectivamente. Em paralelo, a expressão de alguns destes genes em resposta a estresses foi investigado, e alterações na expressão relativa em resposta aos estresses oxidativo e osmótico foram constatadas, sugerindo a participação destas lacases em respostas a estresses abióticos.

Palavras-chave: Lacases, expressão gênica, estresses abióticos, eucalipto.

ABSTRACT

Arcuri MLC **The identification and characterization of laccases gene family in eucalyptus (*Eucalyptus grandis*)** [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

Laccases are *p*-diphenol-O₂-oxidoreductases encoded by multigene families widely distributed throughout the plant kingdom. They exhibit important roles in the oxidation of monolignols during lignin biosynthesis and are reported to be functionally involved in plant

development, tolerance and response to stress. Apart from plants, laccases can be also found in bacteria, fungi and insects. Here, a genome-wide survey of the eucalyptus genome revealed the presence of 88 putative laccases genes. However, after meticulous analyzes using different approaches, the redundant sequences were discarded and 54 laccases genes (referred as *EgLAC*) were retrieved. These genes were phylogenetically distributed in six different subgroups. Based on RNA-Seq data, distinct organ/tissue expression patterns of the identified *EgLAC* genes were ascertained. The vast majority showed organ/tissue-enriched expression, while certain genes exhibited no detectable expression. RT-qPCR analyzes confirmed the organ/tissue expression patterns of a representative set of genes such as, for example, the root-specific expression of *EgLAC52* and the root and leaf preferential expressions of genes *EgLAC4* and *EgLAC32*. Further expression profiling of selected *EgLAC* genes in response to oxidative and osmotic stresses revealed differences in their relative expression, with some genes being stress-induced. These results suggest that certain laccases might be implicated in abiotic stress responses.

Keywords: laccases, gene expression, abiotic stresses, gene structure, expression.

1. Introdução

1.1 Importância do eucalipto

Pertencente à família *Myrtaceae*, o gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, reúne mais de 700 diferentes espécies. Trata-se do gênero mais cultivado no mundo, sendo distribuído em mais de 90 países. Este cultivo tende a continuar se intensificando, especialmente em países tropicais, onde o crescimento do eucalipto é otimizado e a rotação de sua cultura é reduzida sem que sua produtividade seja afetada (Rockwood, 2008).

No Brasil, o gênero *Eucalyptus* foi introduzido ao final do século XIX e início do século XX, no entanto, somente em 1957 sua produção foi intensificada. A cultura do eucalipto, segundo dados da Indústria Brasileira de Árvores (IBA), ocupava, em 2015, uma totalidade de 5,6 milhões de ha plantados, o que representa 71,9% do total de área plantada com árvores no país.

Segundo dados da Bracelpa, em 2012, o Brasil ocupou o 4º e o 9º lugares no ranking mundial de produção de celulose e papel, respectivamente. A alta produtividade nacional que a cultura de eucalipto alcança e supera anualmente, atribui-se às condições propícias de clima e solo, qualidade de mão de obra e gestão do setor. Esta alta produtividade pode ser atribuída também aos avanços das técnicas de melhoramento genético e da biotecnologia, bem como às estratégias operacionais de rotação de culturas, entre outros fatores (BRACELPA, 2013; ABRAF, 2013). Em concordância com tal cenário, segundo dados da IBA, a produção de papel e celulose alcançou em 2014 a valia de 16,4 milhões de toneladas de material, representando um crescimento de 8,8% frente ao ano anterior, das quais, 14,15 milhões de toneladas correspondem à qualidade de fibra curta, obtida a partir de material lignocelulósico do eucalipto (IBÁ 2015).

Silva e colaboradores (2005) apontam, ainda, que a espécie com maior expressão em área cultivada no Brasil é *Eucalyptus grandis*, por sua alta adaptabilidade ao clima tropical predominante no país e, ainda, por seu melhor rendimento comparado a outras espécies. Paralelamente, Trugilho e colaboradores (2001) verificaram que *E. grandis* apresenta uma proporção duplicada de celulose para lignina, todavia, a polimerização de lignina é superior quando comparada com outras espécies do gênero *Eucalyptus*.

1.2 Complexidade genômica do eucalipto

Estima-se que o genoma do *E. grandis* seja composto por 640 Mb e encontra-se, majoritariamente, organizado em 11 cromossomos. Soma-se a este total 4.941 *scaffolds* não ancorados (totalizando 85 Mb) que correspondem, em geral, a sequências ricas em repetições e segmentos cromossomais derivados de regiões de heterozigosidade residual. Seu genoma é capaz de decodificar 36.376 proteínas, das quais 84% são compartilhadas com as demais Rosídeas. Esse alto grau de conservação é comprovado quando se comparam, por exemplo, os genomas de *E. grandis* e *Vitis vinífera*. Neste caso, ao se analisar 480 pares de regiões sintênicas foi observada uma colinearidade na proporção 2:1 (Myburg *et al.*, 2014).

Para compreender melhor a complexidade genômica do eucalipto, destaca-se sua evolução paleográfica ímpar, que possibilita compreender o surgimento de rosídeos derivados que originariam a ordem *Myrtales*. A ocorrência associada de eventos genômicos como a duplicação total de seu genoma ancestral e as elevadas taxas de duplicação em tandem consecutivas é anterior a qualquer outro membro do clado das rosídeas, levando a crer que esta tenha sido determinante na origem da ordem das *Myrtales*. Acredita-se que o evento de duplicação total do genoma de *E. grandis* tenha ocorrido há, aproximadamente, 109.9 milhões de anos, quando a Austrália e Antártida começaram a segregar-se da Gondwana Oriental (Myburg *et al.*, 2014).

O sequenciamento de seu genoma possibilitou verificar, ainda, que *E. grandis* apresenta a maior taxa de genes originados por duplicação em tandem (34%) quando comparados com outras espécies cujos genomas já foram sequenciados. Eventos de duplicação em tandem ocorrem usualmente em genes envolvidos com respostas a estresse, sugerindo, assim, sua contribuição para a evolução adaptativa da espécie (Myburg *et al.*, 2014).

1.3 Lacases

As lacases (*p*-diphenol O₂oxidoreductase; EC 1.10.3.2) são glicoproteínas que apresentam vasta diversidade de funções e são amplamente difusas entre os organismos, associando-se a elas importantes funções na degradação de biomassa celulósica e disponibilidade de nutrientes em fungos, lignificação de parede celular em plantas e mecanismos imunológicos em insetos. Sua atividade bioquímica é muito variável por tratar-se de uma enzima altamente promíscua, tendo afinidade por qualquer molécula derivada ou

similar a *p*-diphenol (LaFayette *et al.*, 1999). As lacases foram originalmente descritas em *Rhus vernicifera* (laca-do-Japão) (Hutterman *et al.*, 2001), planta pertencente à família *Anacardiaceae*, usualmente utilizada na produção de verniz. Nesta espécie, as lacases são expressas nos ductos secretores de resina.

As lacases foram amplamente investigadas em fungos e diversas evidências experimentais demonstram seu papel funcional na degradação de lignina, morfogênese, patogenicidade e defesa contra estresses (revisto em Giardina *et al.*, 2010). A primeira lacase bacteriana foi descrita em *Azospirillum lipoferum*, uma bactéria que pode ser encontrada associada às raízes de plantas (Faure *et al.*, 1994 revisto em Sharma *et al.*, 2007). Nesta espécie, a lacase atua na via de formação de pigmentos e na oxidação de compostos fenólicos. Outra lacase muito bem estudada é a CotA de *Bacillus subtilis* que está relacionada com pigmentação e proteção contra a luz ultra-violeta (Sharma *et al.*, 2007). Em leveduras da espécie *Cryptococcus neoformans*, as lacases têm um papel complementar como fator de virulência por serem capazes de converter Fe^{2+} em Fe^{3+} . Tal conversão gera uma deficiência nos níveis de ferro em sua forma biodisponível, conduzindo a célula hospedeira a um quadro de estresse oxidativo (Lide *et al.*, 1999 revisto em Sharma *et al.*, 2007).

Curiosamente, em análises metagenômicas de rúmen bovino, uma lacase foi isolada e caracterizada e revelou-se bem distinta filogeneticamente e funcionalmente das demais lacases já descritas (Beloqui *et al.*, 2006 revisto em Sharma, 2007). Comprovando sua profusa versatilidade funcional, em insetos, as lacases assumem, ainda, um papel importante no endurecimento da cutícula durante o processo de esclerotização do exoesqueleto (Dittmer *et al.*, 2004 revisto em Sharma *et al.*, 2007).

Em plantas, as lacases são relatadas como potencialmente envolvidas no processo de lignificação. Geralmente, enzimas oxidativas como as lacases são potenciais candidatas ao processo de lignificação caso estejam espacialmente relacionadas com o referido processo. A lignificação é um processo bioquímico que envolve a biossíntese e o transporte de monolignóis e a sua polimerização junto à parede celular. Inicialmente, enzimas intrínsecas atuam na produção de precursores bioquímicos em seus devidos compartimentos celulares, e posteriormente, já na parede celular, outras enzimas mediam reações de oxidação desidrogenativas dos monolignóis existentes, promovendo, assim, a síntese de lignina. Como mencionado, dentre as enzimas descritas como envolvidas nesta etapa do processo encontram-se as lacases (Monteiro *et al.*, 2004).

Outros indícios importantes do envolvimento das lacases com a lignificação estão relacionados ao fato da enzima purificada ser capaz de oxidar monolignóis *in vitro*, e da síntese de lignina ser comprometida pelo nocaute (KO) *in planta* dos genes relacionados (Ranocha *et al.*, 1999). Neste contexto, demonstrou-se que a espécie *Pinus taeda* apresenta uma família gênica composta por oito lacases predominantemente expressas em tecido xilemático, sendo o mesmo padrão observado em *Populus euramericana*, onde cinco lacases expressas em tecidos xilemáticos foram identificadas (Mayer & Staples, 2002). Sato e Whetten (2006) demonstraram ainda, através de ensaios bioquímicos, que as lacases 1 e 2 de *P. taeda* estão envolvidas com a oxidação do coniferol, corroborando a participação direta destas lacases no processo de lignificação.

Em um levantamento minucioso, Lu e colaboradores (2013) identificaram 49 genes codificando lacases no genoma de *Populus trichocarpa*, enquanto que na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, 17 sequências similares a lacases foram identificadas (McCaig *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que as sequências previstas de aminoácidos das lacases de *Arabidopsis* são bem conservadas e apresentam um domínio cúprico composto por quatro átomos de Cu associados a uma sequência de histidinas e uma cisteína. Balasubramanian e colaboradores (2016) identificaram 84 proteínas com similaridade para lacases no genoma de algodão cultivado alotetraplóide (*Gossypium hirsutum*) e 44 e 46 genes codificadores de lacases em seus progenitores diplóides, *G. arboreum* e *G. raimondii*, respectivamente. Em arroz, Liu *et al.* (2017), identificaram 30 genes codificadores de lacases.

Os 17 membros da família das lacases de *A. thaliana* (*AtLAC*) encontram-se distribuídos filogeneticamente em seis subgrupos distintos (McCaig *et al.*, 2005). Dentre os diferentes membros, quinze apresentam expressão ubíqua (excetuando-se *AtLAC6* e *AtLAC16*) sendo, portanto, detectáveis em todos os órgãos/tecidos da planta. No entanto, ressalta-se que 16 destes genes apresentam notável expressão em raízes, sendo este, portanto, o órgão com maior expressão de lacases em *Arabidopsis* (Turlapati *et al.*, 2010, Cai *et al.*, 2006). Dentre os genes expressos em raízes destaca-se o gene *AtLAC2*, cuja expressão é induzida em resposta ao tratamento com NaCl e polietileno glicol (PEG) (Cai *et al.*, 2006). Este gene está funcionalmente associado ao alongamento das raízes já que plantas KO, quando submetidas à desidratação por PEG, apresentam alta redução no alongamento radicular (Cai *et al.*, 2006). Adicionalmente, em um levantamento *in silico*, Turlapati e colaboradores (2010) verificaram que o gene *AtLAC2* é o único cuja expressão é reprimida em vários tratamentos hormonais, sendo, contudo, induzido na deficiência de nitrato.

Do ponto de vista funcional, Zhao e colaboradores (2013) demonstraram que as lacases de arábido, em especial as codificadas pelos genes *AtLAC11*, *AtLAC4* e *AtLAC17*, estão envolvidas com o processo de polimerização de lignina durante o desenvolvimento vascular da planta. Os genes *AtLAC4* e *AtLAC17*, em particular, estão diretamente implicados com a lignificação dos elementos traqueais do protoxilema (Schuetz *et al.*, 2014). Estudos paralelos empregando mutantes KO de arábido para os genes *AtLAC17* e *AtLAC4* demonstraram o envolvimento das lacases na lignificação, uma vez que tais mutantes apresentaram redução de 20 e 40% em seu conteúdo de lignina. Ensaio de complementação do mutante *AtLAC17* demonstraram que o conteúdo de lignina foi reestabelecido ao seu padrão normal (Berthet *et al.*, 2011). Em outro estudo, Cesarino e colaboradores (2013) comprovaram que o gene *SofLAC* de cana-de-açúcar é capaz de restaurar o conteúdo de lignina do mutante de inserção *AtLAC17*, sem, entretanto, restaurar a taxa de polimerização de subunidades S:G. Já em *Populus deltoides*, Bryan e colaboradores (2016) demonstraram que o silenciamento do gene *PdLAC2*, além de provocar alterações na composição da parede celular, com níveis de xilose aumentados e maior conteúdo de glicose disponível, altera também a relação de subunidades S/G e, ainda, cresce a biomassa aérea dos indivíduos.

De maneira interessante, em *P. trichocarpa* demonstrou-se que a superexpressão do microRNA *Ptr-miR397a*, um regulador negativo de 29 lacases, reduziu o conteúdo de lignina das árvores transgênicas (Lu *et al.*, 2013). Em contrapartida, constatou-se que a superexpressão de *miR397b* em arábido além de promover uma redução no teor de lignina, resultou em um aumento no tamanho das sílicas e no número de sementes (Wang *et al.*, 2014).

Neste contexto, Lima e colaboradores (2005) destacam a importância das vias de deslignificação da biomassa vegetal para a indústria de papel e celulose, onde a matéria precisa ser tratada por processos que promovam a eliminação da lignina, melhorando o acesso à celulose, viabilizando assim, a produção de papel.

1.4 As lacases e sua relação com os estresses abióticos e bióticos

As lacases têm sido relatadas na literatura como estando direta ou indiretamente envolvidas com a resposta dos organismos a diferentes tipos de estresses. Estudos com lacases fúngicas, por exemplo, revelaram que estas são responsivas ao estresse oxidativo e participam da detoxicação das células nas quais são expressas (Yang *et al.*, 2012).

Em plantas, McCaig e colaboradores (2005) destacam o efeito das lacases sob os mecanismos de anti-herbivoria e de resistência a patógenos. Outros estudos apontam para a atuação de lacases na regeneração de tecidos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*), cuja atividade foi capaz de substituir a ação catalítica de peroxidases frente ao estresse mecânico, intensificando desta maneira o processo de regeneração celular (revisto em Mayer & Staples, 2002). Adicionalmente, uma lacase com elevada expressão em raízes de milho submetidas a altas concentrações de NaCl ou PEG foi identificada, sugerindo um possível envolvimento desta nos mecanismos de tolerância aos estresses salino e osmótico (Liang *et al.*, 2006).

Do ponto de vista funcional, Cho e colaboradores (2014) demonstraram que plantas de arábidoopsis com superexpressão de uma lacase de arroz (*OsCh11*) apresentam maior tolerância ao estresse salino e de seca. De maneira similar, a superexpressão de uma lacase de algodão específica de raiz em *A. thaliana* resultou em aumento de tolerância a determinados contaminantes orgânicos (Wang *et al.*, 2004). Não obstante, um estudo empregando mutantes de arábidoopsis com inserções em alguns genes codificadores de lacase demonstrou que o mutante *atlac2* apresentou inibição do crescimento das raízes em condições de estresse osmótico induzido por PEG (Cai *et al.*, 2006).

Liu *et al.* (2017) relatam que a expressão de *OsLAC10* aumenta 1200 vezes após 12 h de exposição das raízes de arroz ao tratamento com 20µM Cu. Apontam, ainda, que a superexpressão de *OsLAC10* em arábidoopsis promoveu um aumento na deposição de lignina nas raízes. As plantas com superexpressão apresentaram também maior tolerância a níveis tóxicos de cobre, sugerindo, assim, que as lacases têm um importante papel na captação do referido metal.

Corroborando ainda um possível papel das lacases na reposta aos estresses, dados recentes obtidos no nosso laboratório revelaram que o gene *EgLAC4* de *E. grandis* é responsivo ao estresse oxidativo apresentando expressão induzida em caule e folha tratados com solução com peróxido de hidrogênio (Arcuri, dados não publicados).

1.5 Lacases em Eucalipto

A disponibilidade de um genoma de referência a partir do sequenciamento completo do genoma de *E. grandis* (Myburg *et al.*, 2014) facilitou a prospecção de genes de interesse silvicultural e biotecnológico. Aproveitando-se desta ferramenta, em um projeto voltado para a identificação e clonagem de promotores com expressão tecido-específica, nosso grupo de pesquisa viabilizou a identificação de diferentes genes candidatos com expressão específica

ou preferencial em determinados órgãos/tecidos de *E. grandis* (Sasaki, 2008, Ribeiro, 2009). Dentre os genes identificados destaca-se um que codifica uma lacase com expressão específica em câmbio (denominado *EgLAC4*), cujo promotor foi caracterizado funcionalmente em plantas modelo e validado como apresentando expressão específica em tecido vascular (Fialho, 2013). Cabe ressaltar que o produto do gene *EgLAC4* apresenta alta similaridade com a proteína codificada pelo gene *AtLAC2*, cujo mutante apresenta problemas de alongamento das raízes em condição de estresse osmótico (Cai *et al.*, 2006).

Dando continuidade ao processo de caracterização dos genes *LAC* presentes no genoma do eucalipto, um estudo preliminar de prospecção *in silico* permitiu identificar diversas sequências gênicas codificando lacases, as quais foram classificadas filogeneticamente em seis diferentes subgrupos (Arcuri, dados não publicados). Apesar deste esforço inicial, as informações sobre as lacases ainda são incipientes em eucalipto, sendo os relatos dos efeitos da atividade destas na tolerância aos estresses abióticos praticamente inexistentes para esta espécie. Nesse cenário, o presente trabalho buscou identificar e caracterizar molecularmente a família multigênica das lacases de *E. grandis*. Para tal, a validação do padrão de expressão tecido-específico, bem como, o padrão de expressão desses genes sob diferentes condições de estresse osmótico e oxidativo foram determinados. Cabe ressaltar que as lacases apresentam um viés biotecnológico promissor já que sua atividade catalítica está direcionada para compostos fenólicos de complexa biodegradação. Elas apresentam ainda grande potencial de aplicação em diversos ramos industriais como farmacêutico, alimentício, têxtil, sucroenergético e, com destaque, o setor de papel e celulose (Wang *et al.*, 2015).

2. Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo empreender a identificação e caracterização molecular das lacases de *E. grandis*.

3. Materiais e métodos

3.1 Material vegetal

Para a realização dos ensaios de estresse abiótico foram utilizadas mudas de *E. grandis* (clone SP0791) com 2 meses de idade fornecidas pela empresa SUZANO PAPEL E CELULOSE e provenientes de área de produção de mudas da empresa em Itapetininga-SP.

As mudas, crescidas em tubetes, foram aclimatadas e mantidas em câmara de crescimento com temperatura (28°C) e fotoperíodo (dias longos) controlados até a aplicação dos estresses. Visando os ensaios de expressão tecido-específica, diferentes órgãos/tecidos (raízes, folhas, caules, botão floral e câmbio vascular) foram coletados a partir das mudas mencionadas acima, bem como de árvores de diferentes idades plantadas em área de produção da empresa supracitada.

3.2 Análises *in silico*

3.2.1 Identificação e nomenclatura da família multigênica das lacases em *E. grandis*

A fim de identificar os genes codificadores de lacases em eucalipto, resgatou-se os IDs das sequências das lacases putativas anotadas junto ao genoma de *E. grandis* (Myburg *et al.*, 2014), com isso, análises *in silico* foram realizadas empregando a ferramenta BLAST disponível no Browser v9.0 do Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein *et al.*, 2012) e no GenBank (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O valor do *e-value* utilizado para a seleção das sequências candidatas/putativas foi de 10^{-10} . As sequências assim obtidas foram então examinadas quanto à presença de domínios conservados e, a fim de eliminar as redundantes, submetidas a alinhamento de aminoácidos.

Para fins meramente sistemáticos, as sequências identificadas foram nomeadas ordenando-se seus *loci* alfabeticamente e, então, classificadas numericamente em ordem crescente.

3.2.2 Análises filogenéticas

As sequências deduzidas de aminoácidos das lacases de eucalipto foram alinhadas com as lacases vegetais descritas/anotadas nos genomas de *A. thaliana* e de *P. trichocarpa*. Para tal foi utilizado o programa de alinhamento múltiplo ClustalW (parâmetros padrões) disponível no pacote MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 6. Uma vez alinhadas, suas relações filogenéticas foram estabelecidas empregando o método de *Neighbour-joining* com valor de *bootstrap* de 1000 rearranjos independentes e os demais parâmetros padrões. Uma árvore filogenética reunindo um total de 120 sequências codificadoras de lacases provenientes do genoma destas três espécies foi obtida.

3.2.3 Análise *in silico* das sequências identificadas

Com o intuito de levantar dados quanto à localização cromossômica, organização e estrutura gênica, sequências transcritas e deduzidas de aminoácidos dos genes identificados

foi empregado o *Gene Structure Display Server* (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) (Hu *et al.*, 2015). As propriedades físico-químicas das proteínas codificadas, tais como massa molecular estimada e ponto isoelétrico, foram avaliadas utilizando o *Protein Isoelectric Point Calculator* (<http://isoelectric.ovh.org/calculate.php>) (Kozlowski, 2016). Adicionalmente, as diferentes lacases de eucalipto foram inspecionadas quanto à presença de domínios conservados (IPR001117, IPR11706 e IPR11707) empregando os bancos de dados do Phytozome e Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e o *plugin* InterProScan disponível no software Geneious 10.1.3 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012), e de sítios alvos para a ação de miRNAs usando o servidor psRNATarget (<http://http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>). Os prováveis eventos de duplicação gênica foram preditos no Plant Genome Duplication Database (PGDD; <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>).

3.2.5 Seleção de genes para validação de expressão

Em paralelo, análises *in silico* foram realizadas junto ao banco de dados privado Scylla EST (Suzano Papel e Celulose) a fim de identificar as lacases potencialmente responsivas a condições de estresse. Este banco é composto por etiquetas de sequências expressas (ESTs) provenientes do sequenciamento de bibliotecas de cDNA construídas empregando mRNA extraído de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto, coletados em condições normais e sob estresses bióticos e abióticos. As bibliotecas relacionadas aos estresses abióticos foram consultadas individualmente para ocorrência de ESTs correspondentes aos genes alvos, e aqueles mais representativos foram considerados responsivos. Uma vez selecionados, oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados para posterior validação da expressão em condições de estresse osmótico e oxidativo.

O padrão de expressão órgão/tecido-específico dos diferentes membros da família gênica das lacases de eucalipto foi previamente determinado empregando perfis transcricionais obtidos por RNA-Seq de bibliotecas de raiz, caule e folha de plântulas de *E. grandis* com 4 meses de idade (Fuchs, 2013). Os valores de RPKM de cada gene alvo em dada biblioteca foram expressos em função logarítmica na base 2 e utilizados para inferir a sua expressão nos respectivos órgãos. A fim de eliminar-se valores negativos, empregou-se a técnica *pseudocount* para atenuar a interferência de tais valores na confecção dos gráficos. O software MeV (Multiple Experiment Viewer 4.9) foi empregado na confecção dos *heatmaps*. Dados de expressão disponíveis no banco do Phytozome também foram consultados e expressos em função logarítmica na base 2 e, assim, as informações

confrontadas com as obtidas no RNA-seq. A fim de eliminar-se valores negativos, empregou-se a técnica *pseudocount* para atenuar a interferência de tais valores na confecção dos gráficos. O software MeV (Multiple Experiment Viewer 4.9) foi empregado na confecção dos *heatmaps*. De acordo com os padrões de expressão observados, sete genes foram selecionados para validação por RT-qPCR empregando oligonucleotídeos gene-específicos.

3.3 Indução dos estresses abióticos em eucalipto

3.3.1 Indução de estresse osmótico

Para indução de estresse osmótico, mudas de *E. grandis* com 2 meses de idade foram transferidas dos tubetes para caixas de plástico prata fosca (23 L), com dimensões de 48 cm de comprimento x 32 cm de largura x 15 cm de altura, contendo solução nutritiva de Hoagland 75% em forma de cultivo hidropônico. Após um mês de adaptação em solução nutritiva, as mudas foram submetidas ao tratamento com PEG 8000. Para tal, as mudas aclimatadas foram transferidas para caixas de polietileno contendo solução nutritiva com adição de 215 g de PEG8000/L, visando atingir o potencial osmótico de -0,8 Mpa de acordo com Villela & Beckert (2001). As mudas foram mantidas à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ em casa de vegetação com condições controladas. As coletas dos diferentes órgãos/tecidos foram realizadas nos tempos 6, 12 e 24 h após a aplicação do estresse. As mudas correspondentes ao controle não estressado foram mantidas em solução nutritiva sem aplicação de PEG, e igualmente coletadas nos referidos tempos amostrais.

3.3.2 Indução de estresse oxidativo

Para a realização destes ensaios foram utilizadas mudas de *E. grandis* com 2 meses de idade cultivadas em solução nutritiva de Hoagland 75% conforme descrito no item anterior. Para a indução de estresse oxidativo, as mudas foram transferidas para uma nova solução de Hoagland 75% adicionada de H_2O_2 na concentração 100 mM. As amostras foram coletadas nos tempos de 6, 12, e 24 h após a aplicação do estresse e, para cada tempo amostral, foi coletado um grupo controle não estressado, mantido em solução de Hoagland 75%.

3.4 Extração de RNA total de diferentes órgãos/tecidos de *E. grandis*

O RNA total de diferentes órgãos/tecidos de *E. grandis* foi extraído empregando a metodologia de descrita por Chang *et al.* (1993) e, posteriormente modificada por

Korimbocus *et al.* (2002). Foram utilizados aproximadamente 100 mg de tecido amostral macerado em nitrogênio líquido com posterior solubilização em 600 µl do tampão de extração CTAB 2% pré-aquecido. A amostra foi então submetida à incubação por cerca de 30 min a 65°C. Um volume de 500 µl de CIA (clorofórmio:álcoolisoamílico - 24:1) foi adicionado e a solução homogeneizada. Uma centrifugação a 12000 rpm por 10 min à 4°C com posterior coleta do sobrenadante foi realizada. O passo anterior de extração da amostra com CIA foi repetido e uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. Um volume de cloreto de lítio (LiCl 5M) foi adicionado ao volume de sobrenadante coletado, e o RNA total precipitado a -20°C por, no mínimo, 12 h, com posterior centrifugação a 12000 rpm por 30 min (4°C). O sedimento foi lavado em 200 µl de TE-SDS 1%, 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol. A amostra foi precipitada durante 1 h a -20°C e, então, centrifugada a 12000 rpm por 20 min (4°C). Realizou-se uma nova lavagem do sedimento com 500 µl de etanol 70% com posterior centrifugação a 10000 rpm por 5 min (4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento submetido à secagem. O RNA total extraído foi então ressuspensão em 25 µl de H₂O tratada com DEPC.

3.5 Transcrição Reversa (RT) para síntese de cDNA

Alíquotas de 1 µg do RNA total extraído anteriormente foram tratadas com *DNaseI-RNase free* segundo as recomendações do fabricante (MBI Fermentas) visando degradar todo DNA genômico presente na amostra. Após o tratamento com DNaseI, cada alíquota de RNA total foi submetida à transcrição reversa (RT) empregando-se o kit *High Capacity* seguindo as recomendações propostas pelo fabricante (Life Technologies).

3.6 Validação da expressão órgão/tecido-específica por RT-qPCR

Seis genes, acrescentando-se o gene *EgLAC4* previamente caracterizado (Fialho, 2013), foram selecionados com base nos padrões observados nas análises *in silico* descritas acima para posterior validação da expressão tecido-específica usando RT-qPCR. Para tal, oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados usando o programa “Primer Express” (Applied Biosystems) (Tabela 1). As análises de qPCR foram realizadas empregando amostras de cDNA representativas dos diferentes órgãos/tecidos de eucalipto obtidas no item 2.5, as quais foram quantificadas com auxílio do espectrofotômetro (Nanodrop) e diluídas 10x. O reagente *SYBR Green Master Mix* foi empregado conforme recomendação

do fabricante (Applied Biosystems) e o aparelho *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) foi utilizado como plataforma para a qPCR.

Tabela 1. Oligonucleotídeos empregados nas análises de validação da expressão órgão/tecido-específica.

<i>GENE</i>	<i>Sequências dos Oligonucleotídeos</i>
<i>EgLAC2</i>	Forward5' CCTCCAAGATTGTCCACCGAATCG 3'
	Reverse 5' TAGCATCTTGCTCGCGGT 3'
<i>EgLAC4</i>	Forward5' TATAGAGATGAAGAGTGAGACCC 3'
	Reverse 5' GTGGATGCTGATGTTGTTGG 3'
<i>EgLAC30</i>	Forward5' GGGAACACCCGGTCCCTAT 3'
	Reverse 5' GCCCGGCACACGAGA 3'
<i>EgLAC32</i>	Forward5' CTGAAAAGCTTGAACCTCGCC3'
	Reverse 5' GTCATTTGGACATTTTCATCATGC 3'
<i>EgLAC38</i>	Forward5' GCCCGGCGACGAGAG 3'
	Reverse 5' GGGATGTCAATCAGCACTTG 3'
<i>EgLAC40</i>	Forward5' TCTTGACGGTGAATGGGCAA 3'
	Reverse 5' TCCGGTCCATCGGACA3'
<i>EgLAC52</i>	Forward5' CTTCAAATACCCAATGCTTAG 3'
	Reverse 5' AGGATGTTCTTAGTGCTACA 3'
<i>EgTEF</i>	Forward5' TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT 3'
	Reverse 5' TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT 3'

O método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado no cálculo da expressão relativa. Para tal, a expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão de um gene normalizador de caráter constitutivo e expressão generalizada escolhido previamente (Transcription elongation factor -II – gene *EgTEF*; Oliveira *et al.*, 2012). O software *GraphPad Prism* (www.graphpad.com) foi utilizado para as análises estatísticas e posterior confecção dos gráficos de expressão relativa (t-test;p<0,05).

3.7 Análise de expressão relativa em condições de estresse

Após análises preliminares junto ao banco de dados Scylla EST, cinco genes potencialmente responsivos a condições de estresse foram selecionados para validação. Para tal, oligonucleotídeos específicos foram desenhados (Tabela 2) e em seguida, as análises de expressão relativas em condição de estresse osmótico e oxidativo foram executadas conforme descrito no item anterior. O software *GraphPad Prism* (www.graphpad.com) foi utilizado para as análises e posterior confecção dos gráficos de expressão relativa (t-test; $p < 0,05$). O gene *EgTEF* (Oliveira *et al.*, 2012) foi usado como normalizador.

Tabela 2. Oligonucleotídeos empregados nas análises de expressão relativa em condição de estresse abiótico.

<i>GENE</i>	<i>Sequências dos Oligonucleotídeos</i>
<i>EgLAC4</i>	Forward 5' TATAGAGATGAAGAGTGAGACCC 3'
	Reverse 5' GTGGATGCTGATGTTGTTGG 3'
<i>EgLAC14</i>	Forward 5' TGATGACAAGGATGCTGCA 3'
	Reverse 5' GGAAACTGTGATGAAGATCCG 3'
<i>EgLAC35</i>	Forward 5' GAGTTTCAGTTCAGTGATTG 3'
	Reverse 5' AGTTCAGCTATGCAAGACAATT 3'
<i>EgLAC45</i>	Forward 5' CGGGCCACACTGGATC 3'
	Reverse 5' AGGAGTTGTTCCCGGGC 3'
<i>EgLAC52</i>	Forward 5' CTTCAAATACCCAATGCTTAG 3'
	Reverse 5' AGGATGTTCTTAGTGCTACA 3'
<i>EgTEF</i>	Forward 5' TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT 3'
	Reverse 5' TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT 3'

4. Resultados e discussão

4.1 Filogenia e análise das sequências identificadas

Em uma anotação inicial do genoma de eucalipto, Myburg e colaboradores (2014) identificaram 88 sequências putativas de lacases, as quais foram usadas como ponto de partida para as análises do presente trabalho. Entretanto, após a realização das análises *in silico* descritas no item 3.2.2, esse total foi reduzido para 62 sequências, das quais 8 foram adicionalmente descartadas após alinhamento e inspeção da presença do domínio conservado cobre-oxidase, o que resultou em 54 sequências gênicas codificando lacases em eucalipto. O número de genes putativos encontrados em eucalipto está próximo do total identificado em *P. trichocarpa* (49 genes), mas difere consideravelmente do total presente em *arabidopsis* (17 genes). O aumento da redundância funcional pode explicar a expansão desta família gênica em espécies lenhosas. Os genes identificados foram numerados de acordo com o ID utilizando a denominação *EgLAC* (Tabela 3).

Quanto à estrutura gênica dos genes identificados, aferida utilizando o programa GSDS (Figura 1 B), nota-se que a maioria dos genes apresenta de 5 a 6 éxons, sendo observado, em alguns casos específicos, o máximo de 7 (*EgLAC50*) e o mínimo de 2 éxons (*EgLAC43*). Observa-se, ainda, a existência de um padrão de conservação do quinto éxon que se revela comumente extenso. Este éxon codifica o domínio catalítico “multicopper” oxidase tipo I (IPR001117) das lacases.

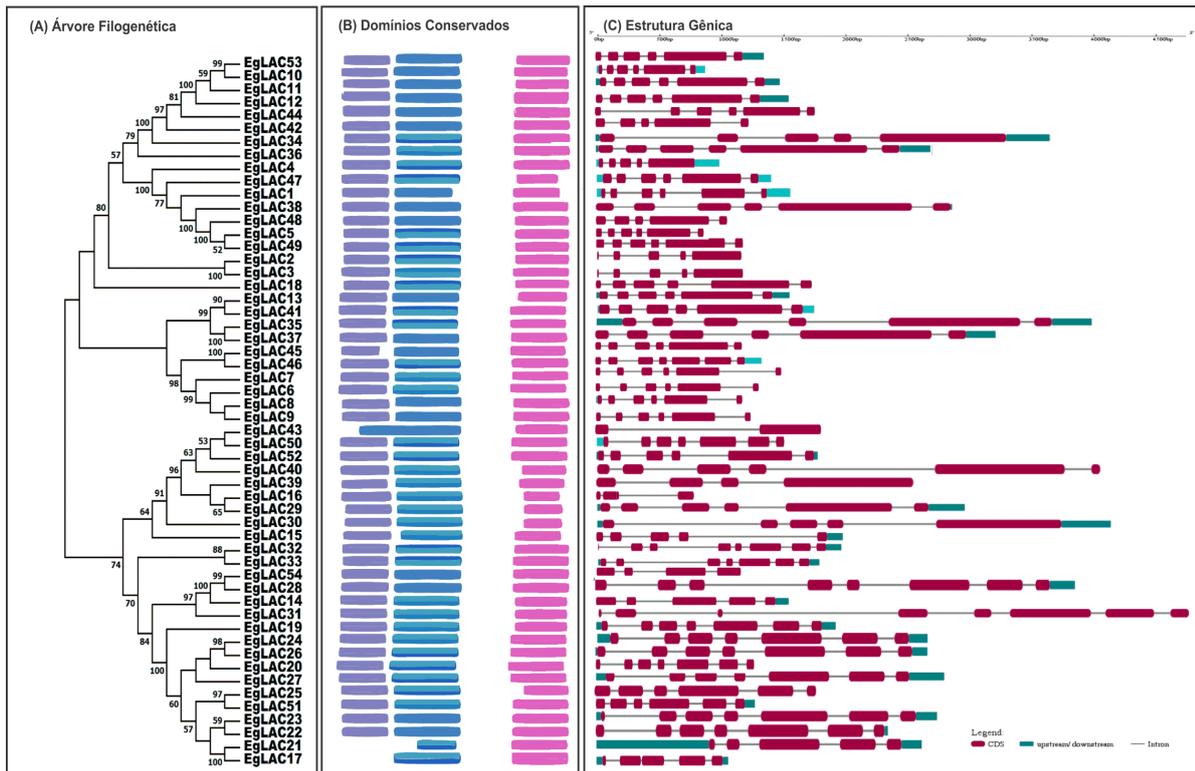


Figura 1. (A) Árvore filogenética gerada a partir das sequências deduzidas de aminoácidos das lacases de *Eucalyptus grandis* (*EgLAC*); (B) Presença de domínios conservados nas sequências protéicas das *EgLACs*. Os diferentes domínios Cu-oxidase estão apresentados em cores distintas (lilás IPR011707, azul IPR001117 e em rosa IPR011706); (C) Estrutura gênica da família multigênica das lacases em *E. grandis*.

Quando analisadas em conjunto com as sequências deduzidas de aminoácidos das lacases de *A. thaliana* (*AtLAC*) e *P. trichocarpa* (*PtrLAC*), as lacases de eucalipto foram distribuídas em seis diferentes grupos corroborando dados prévios descritos na literatura (Turlapati *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013) (Figura 2). No entanto, as *EgLACs* distribuem-se de maneira desigual entre os grupos, tendo maior representatividade no grupo I, composto por 26 *EgLACs*, e menor representatividade no grupo IV, integrado apenas por *EgLAC18*. Cabe ressaltar ainda que a relação filogenética entre membros do mesmo grupo sugere uma proximidade funcional, embora esta possibilidade ainda não esteja devidamente confirmada. Neste contexto, o chamado grupo 6 inclui lacases comprovadamente envolvidas em processos de lignificação como *AtLAC17*, *AtLAC4*, *AtLAC11* e *PtrLAC2* (Bryan *et al.*, 2016), sugerindo que as *EgLACs* incluídas neste grupo desempenhem o mesmo papel. Por outro lado, o grupo 1 inclui uma lacase implicada na oxidação de flavonóides (*AtLAC15*; Cai *et al.*, 2006).

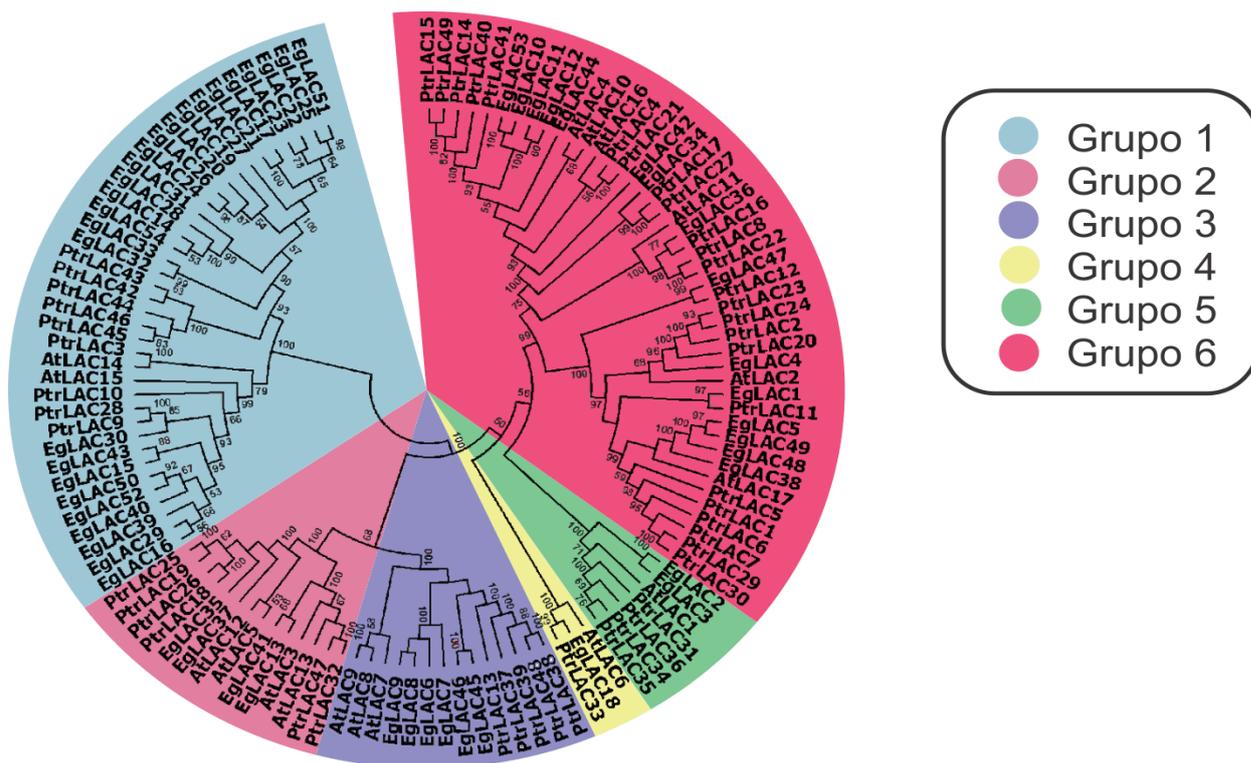


Figura 2. Árvore filogenética gerada a partir das seqüências deduzidas de aminoácidos das lacases de *E. grandis* (*EgLAC*);, *A. thaliana* (*AtLAC*) e *P. trichocarpa* (*PtrLAC*). Os diferentes grupos apresentam-se delimitados por cores distintas.

Quanto à localização cromossômica, os genes *EgLAC* se distribuem em vários cromossomos, estando, entretanto, ausentes nos cromossomos 4 e 9 (Tabela 3). Em contrapartida, verifica-se que o cromossomo 5 é o maior detentor de lacases no genoma do eucalipto, reunindo 11 dos 54 genes, seguido do cromossomo 1 com 8 seqüências codificadoras de lacases. Alguns genes *EgLAC* não tiveram a sua localização determinada, pois se encontram associados a scaffolds.

Os respectivos produtos protéicos apresentam certa uniformidade de tamanho, usualmente entre 500 e 600 aminoácidos, e massa molecular entre 60 e 64 kDa. Este fato decorre, em especial, do alto grau de conservação das referidas seqüências de aminoácidos. Por outro lado, variações nos valores de ponto isoeletrico das referidas proteínas foram observadas (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação e localização cromossômica dos genes codificadores de lacase em eucalipto e principais características das proteínas codificadas.

GENE	ID	Localização Cromossômica	Tamanho (aa)	Ponto Isoelétrico	Massa (kDa)
EGLAC1	A01282	01	571	9,13	63,06
EGLAC2	B00869	02	553	9,19	61,67
EGLAC3	B00870	02	553	6,87	61,35
EGLAC4	B02316	02	558	9,55	61,39
EGLAC5	B02428	02	585	8,57	64,68
EGLAC6	B02750	01	571	8,94	62,88
EGLAC7	B02751	01	573	6,02	62,33
EGLAC8	B02752	01	571	8,86	62,70
EGLAC9	B02753	01	573	9,11	63,28
EGLAC10	B02794	01	556	9,48	60,79
EGLAC11	B02795	01	556	9,36	60,81
EGLAC12	B02799	01	556	9,39	60,75
EGLAC13	B04003	02	556	9,4	60,76
EGLAC14	C02745	03	575	8,68	62,93
EGLAC15	C03118	03	248	7,63	28,32
EGLAC16	C03119	03	240	5,67	26,36
EGLAC17	D00739	05	373	8,46	41,42
EGLAC18	E00040	05	552	6,85	61,28
EGLAC19	E03932	05	561	5,4	62,35
EGLAC20	E03935	05	561	4,86	62,4
EGLAC21	E04215	05	424	6,63	46,97
EGLAC22	E04216	05	561	6,13	62,3
EGLAC23	E04217	05	546	5,97	60,58
EGLAC24	E04218	05	562	4,86	62,5
EGLAC25	E04219	05	519	5,66	57,65
EGLAC26	E04220	05	562	4,88	62,3
EGLAC27	E04221	05	545	4,79	59,93
EGLAC28	F02641	06	642	6,74	70,85
EGLAC29	F02650	06	553	6,52	63,12
EGLAC30	F02652	06	556	8,26	65,19
EGLAC31	F04154	06	541	6,72	60,12
EGLAC32	F04160	06	635	4,81	71,45
EGLAC33	F04163	06	598	5,01	66,88
EGLAC34	G03028	07	561	8,49	61,54

EGLAC35	G03098	07	570	7,63	62,25
EGLAC36	H03315	08	562	7,01	61,96
EGLAC37	J00166	10	570	5,25	62,41
EGLAC38	J00532	10	585	8,92	64,7
EGLAC39	J00888	10	487	6,92	54,63
EGLAC40	J00889	10	541	7,63	60,69
EGLAC41	J01857	10	575	6,09	63,41
EGLAC42	J01941	10	524	8,87	57,49
EGLAC43	J03171	10	266	7,65	29,21
EGLAC44	K02996	11	562	9,26	61,55
EGLAC45	K03008	11	573	8,99	62,76
EGLAC46	K03009	11	548	9	60,44
EGLAC47	K03111	11	589	9,9	64,96
EGLAC48	L00355	scaffold_16:11569f	545	8,65	60,15
EGLAC49	L00359	scaffold_16:43401f	585	8,78	64,72
EGLAC50	L01343	scaffold_173:3472r	560	4,91	61,88
EGLAC51	L01345	scaffold_173:2436f	527	6,11	58,68
EGLAC52	L01441	scaffold_209:43469f	563	6,8	63
EGLAC53	L01734	scaffold_327:30946r	556	9,48	60,8
EGLAC54	L02310	scaffold_774:703f	445	5,5	49,24

As taxas de substituição sinônima (Ks) e não sinônima (Ka) significativas, geradas conforme descrito no item 3.2.2, indicaram a existência de nove eventos de duplicação gênica entre os genes *EgLAC* (Tabela 4). No entanto, não foram encontrados indícios de duplicação em tandem, uma vez que os pares duplicados estão localizados em cromossomos distintos ou, quando no mesmo cromossomo (*EgLAC28* e *EgLAC31*, por exemplo), distanciam-se demasiadamente (distância superior a 100 kb). Adicionalmente, como preconizado por Li e colaboradores (2014), uma análise dos trechos de DNA a montante e a jusante (~100 kb) dos pares independentes apontados como duplicados descartou a existência de duplicação gênica decorrente de eventos de duplicação de segmentos genômicos, já que a composição gênica de tais regiões diverge consideravelmente. Segundo estes autores, a presença de cinco ou mais genes conservados, em ambas as regiões, indicaria a ocorrência de um evento de duplicação de segmento genômico ou em larga escala. Por outro lado, o fato das razões Ka/Ks serem <1 indica possível ocorrência de seleção purificadora.

Tabela 4. Taxas de substituição sinônima (Ks) e não sinônima (Ka) em pares duplicados de *EgLACs*.

No	Gene 1	Gene 2	Ka	Ks	Ka/Ks
1	EgLAC1	EgLAC4	0,26	1,75	0,1486
2	EgLAC4	EgLAC47	0,25	1,52	0,1645
3	EgLAC6	EgLAC45	0,20	1,32	0,1515
4	EgLAC10	EgLAC42	0,19	1,49	0,6711
5	EgLAC10	EgLAC44	0,13	1,11	0,1171
6	EgLAC28	EgLAC31	0,18	4,24	0,0424
7	EgLAC34	EgLAC42	0,24	1,56	0,1538
8	EgLAC34	EgLAC44	0,22	1,26	0,1746
9	EgLAC35	EgLAC37	0,14	1,94	0,0721

A literatura relata que a expressão das lacases pode sofrer regulação pós-transcricional devido a atuação de miRNAs. Neste contexto, Wang e colaboradores (2014) identificaram três famílias de miRNAs capazes de regular a expressão das lacases presentes em *arabidopsis* enquanto que, Lu e colaboradores (2013) identificaram 29 lacases de *P. trichocarpa* como alvos preditos do Ptr-miR397a. Em árvores transgênicas com superexpressão do referido miRNA foi observada a regulação negativa de 17 genes codificadores de lacases e uma redução de 40% na atividade total de lacases. Como consequência, uma redução do conteúdo de lignina foi detectada. Não obstante, análises computacionais realizadas por Balasubramanian *et al.* (2016) revelaram que das 44 lacases presentes em algodão (*G. arboreum*), 22 apresentam sítios para a ação regulatória de miRNAs. Dentre estas, 18 são alvos preditos da família miR397.

Para compreender o papel dos miRNAs na regulação pós-transcricional dos genes *EgLAC*, as sequências transcritas correspondentes foram confrontadas junto ao banco de dados que reúne todas as famílias de miRNAs descritas em espécies vegetais cujo genoma já foi sequenciado (Tabela 5). Verificou-se que das 54 lacases presentes em eucalipto, 17 relevaram-se alvos putativos para a atuação de miRNAs da família miR397.

Tabela 5. Lista dos genes *EgLAC* preditos como alvos de miRNAs

GENE	SÍTIOS ALVOS	TAMANHO	INIBIÇÃO
<i>EgLAC1</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p	21 - 22	Clivagem
<i>EgLAC2</i>	miR397*, miR397a, miR397b, miR397b-5p*	20 - 21	Clivagem (* inibição da tradução)
<i>EgLAC3</i>	miR397*, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p*	20 - 22	Clivagem (* inibição da tradução)
<i>EgLAC4</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p	20 - 22	Clivagem
<i>EgLAC6</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p	20 - 22	Clivagem
<i>EgLAC7</i>	miR397, miR397b	21	Clivagem
<i>EgLAC8</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397b-5p	20 - 21	Clivagem
<i>EgLAC10</i>	miR397a-5p, miR397b-5p	21	Clivagem
<i>EgLAC11</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p	21 - 22	Clivagem
<i>EgLAC12</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397a-5p, miR397b-5p	21 - 22	Clivagem
<i>EgLAC13</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397b-5p	20 - 21	Clivagem
<i>EgLAC35</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397b-5p	20 - 21	Clivagem
<i>EgLAC42</i>	miR397a-5p, miR397b-5p	21	Clivagem
<i>EgLAC44</i>	miR397, miR397a, miR397a-5p, miR397b-5p	21 - 22	Clivagem
<i>EgLAC45</i>	miR397, miR397a, miR397a-5p, miR397b-5p	20 - 21	Clivagem
<i>EgLAC46</i>	miR397, miR397a, miR397b, miR397b-5p	20 - 21	Clivagem
<i>EgLAC53</i>	miR397a-5p, miR397b-5p	21	Clivagem

4.2 Análises de expressão tecido-específica

Análises *in silico* preliminares efetuadas junto ao banco de dados privado Scylla EST (adquirido pela Suzano Papel e Celulose) demonstraram que as lacases se distinguem amplamente entre si quanto a sua expressão. Alguns destes genes revelaram-se preferencialmente expressos em determinados órgãos/tecidos, enquanto que outros apresentaram expressão ubíqua ou sequer tiveram sua expressão detectada nos órgãos/tecidos amostrados.

A fim de aumentar o escopo de tais análises, decidimos investigar os dados de expressão gerados por RNA-seq para seis diferentes órgãos/tecidos de eucalipto disponíveis no Phytozome (Figura 3). Segundo esses dados, diversos genes têm a sua expressão enriquecida em tecidos xilemáticos como, por exemplo, *EgLAC1*, *EgLAC4*, *EgLAC10*, *EgLAC11*, *EgLAC12*, *EgLAC20*, entre outros, ou ainda, associada a tecidos vasculares. Neste caso, uma expressão em floema é observada, com destaque para o gene *EgLAC6*, cujos transcritos são detectados unicamente em amostras floemáticas enquanto que *EgLAC17* apresenta uma expressão enriquecida no referido tecido. Embora, usualmente com níveis reduzidos de expressão, diversos genes encontram-se expressos no ápice caulinar. Destacam-se, neste caso, genes cuja expressão não foi detectada em outros órgãos/tecidos, como por exemplo, *EgLAC7* e *EgLAC39*. Variações entre amostras de tecidos juvenis e adultos são observadas quando se analisa a expressão das lacases em folha. Os genes *EgLAC24* e *EgLAC30*, por exemplo, embora expressos de maneira significativa em ápice caulinar, são também enriquecidos em tecidos foliares jovens. Por outro lado, *EgLAC41* e *EgLAC51* apresentam, expressão preferencial em folhas adultas. Nota-se, ainda, que *EgLAC27* e *EgLAC50* apresentam expressão praticamente equivalente que independe do estágio de desenvolvimento da folha. Genes com padrão de expressão ubíquo, tais como *EgLAC28*, *EgLAC35*, *EgLAC36*, *EgLAC44* e *EgLAC54*, também foram observados. Em contrapartida, 11 genes não tiveram expressão detectada, indicando que os mesmos devem ser expressos em outros órgãos/tecidos que não aqueles amostrados no Phytozome ou não serem funcionais. Encontram-se, na forma de anexo (Anexo I), a tabela com os dados brutos utilizados para a confecção do gráfico apresentado a seguir.

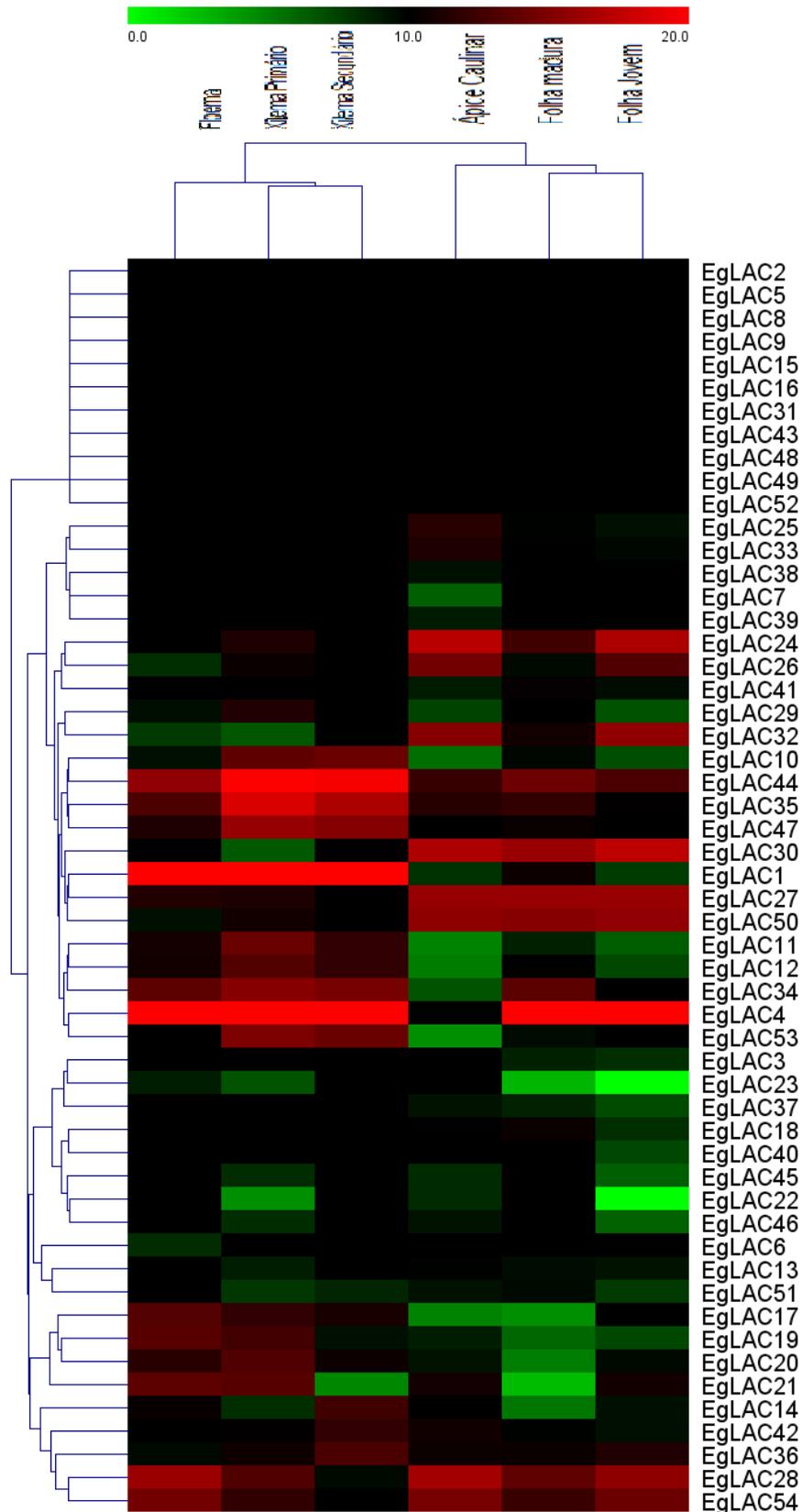


Figura 3. Expressão dos genes *EgLAC* com base em dados de RNA-seq (valores em FPKM expressos em função logarítmica na base 2) disponíveis no Phytozome.

Os dados anteriores permitem, ainda, com base na clusterização dos diferentes genes analisados de acordo com seu respectivo padrão de expressão, estabelecer dois grandes grupos de expressão. O primeiro grupo engloba genes preferencialmente expressos no sistema vascular, uma vez que a expressão dos mesmos é majoritariamente detectada nas amostras de floema e xilema (primário e secundário). O segundo grupo, cujo padrão manifesta-se mais discretamente, é composto por genes com expressão em folhas jovens e maduras e no ápice caulinar. Cabe ressaltar que este agrupamento, entretanto, não reflete as relações filogenéticas dos genes analisados.

Num segundo momento procedeu-se a análise dos dados de RNA-seq gerados por Fuchs (2014) para bibliotecas de folha, caule e raiz de plântulas jovens (Figura 4). Esses dados divergem dos anteriores quanto ao número de lacases com expressão não detectável, que foi reduzido a cinco genes (*EgLAC5*, *EgLAC31*, *EgLAC38*, *EgLAC43* e *EgLAC48*), dos quais *EgLAC5*, *EgLAC31*, *EgLAC43* e *EgLAC48* não apresentaram expressão detectável em ambos os bancos de dados investigados. Já o número de lacases com padrão de expressão ubíquo se mantém em número de membros, destacando-se *EgLAC10*, *EgLAC32*, *EgLAC33*, *EgLAC27*, *EgLAC28*, *EgLAC44*, *EgLAC50* e *EgLAC54* que apresentam elevados níveis de transcritos, no entanto, distribuídos de forma desigual entre os órgãos/tecidos amostrais, com exceção de *EgLAC27* e *EgLAC28*. Contudo, quando confrontados com dados da análise anterior, verifica-se que apenas *EgLAC10*, *EgLAC28*, *EgLAC44* e *EgLAC54* permanecem ubíquos, ou seja, com expressão generalizada em todo o conjunto amostral. Para as amostras de folha, os níveis de transcritos do gene *EgLAC16* sugerem uma aparente especificidade e um enriquecimento das expressões dos genes *EgLAC24*, *EgLAC30* e *EgLAC32*, enquanto em amostras de caule observa-se o predomínio de genes com expressão enriquecida, tais como os genes *EgLAC1*, *EgLAC34* e *EgLAC44*, apenas a expressão de *EgLAC19* sugere uma aparente especificidade pelo órgão. Já para as amostras de raiz, os dados acusam a existência de 17 lacases específicas deste órgão. No entanto, devido ao número limitado de amostras relativas a tipos de órgãos/tecidos e estágios de desenvolvimento, assume-se que esta expressão é altamente enriquecida. Cabe ressaltar que dos 17 genes *AtLAC* descritos em arabisidopsis, 16 são abundantemente expressos nas raízes (Cai *et al.*, 2006), sendo este o órgão com maior nível de expressão de lacases. Encontram-se, na forma de anexo (Anexo II), a tabela com os dados brutos utilizados para a confecção do gráfico apresentado a seguir.

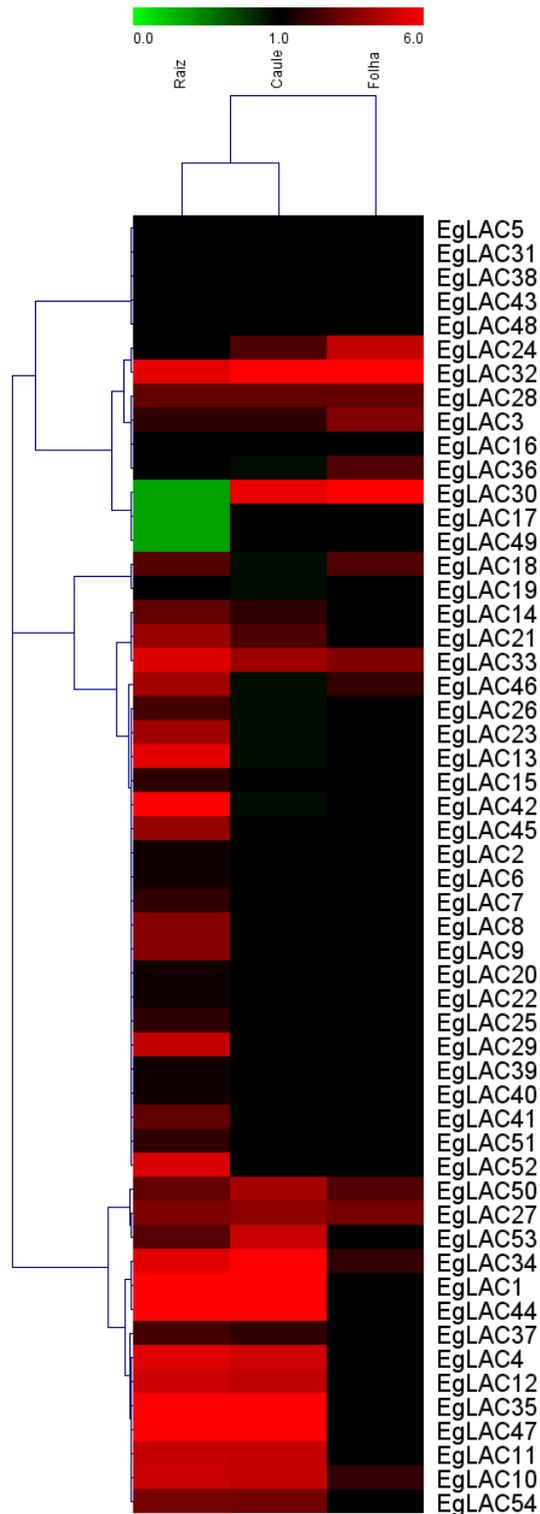


Figura 4. Expressão dos genes *EgLAC* com base nos dados de RNA-seq (valores em RPKM expressos em função logarítmica na base 2) gerados por Fuchs (2014).

A fim de validar os perfis transcricionais identificados nas análises de RNA-Seq, alguns genes foram selecionados (*EgLAC2*, *EgLAC4*, *EgLAC30*, *EgLAC32*, *EgLAC38*, *EgLAC40* e *EgLAC52*) e tiveram o seu padrão de expressão analisado por RT-qPCR em amostras de raiz, caule e folha de plântula (Figura 5). Neste caso, algumas divergências quanto ao padrão de expressão de determinados genes foram observadas. Segundo os dados de RNA-seq de Fuchs (2014), por exemplo, o gene *EgLAC2* apresenta expressão raiz-específica, o que foi confirmado pela técnica de RT-qPCR, mas neste caso, uma expressão residual em caule e folha também foi observada. Por outro lado, a expressão deste gene não foi detectada nos dados disponibilizados pelo Phytozome já que estes não incluem amostras de raiz. Já para o gene *EgLAC4*, os resultados de RT-qPCR confirmam parcialmente os perfis de expressão oriundos dos dados de RNA-seq. Segundo a validação por RT-qPCR, este gene apresenta expressão predominantemente radicular e residual em caule, mas é também detectado em folha, o que está em conformidade com os dados do Phytozome. Cabe realçar que o referido gene teve seu promotor previamente caracterizado em planta modelo, sendo validado como apresentando expressão específica em tecido vascular (Fialho, 2013). Esse dado corrobora a sua expressão aumentada em tecidos caulinares e radiculares, e residual em folhas. Os genes *EgLAC30* e *EgLAC32* têm especial destaque, pois a expressão preferencial de ambos em tecidos foliares foi validada por RT-qPCR e corroborada por todos os dados de RNA-seq inspecionados. Por outro lado, a expressão do gene *EgLAC38* não foi detectada tanto por RT-qPCR quanto pela técnica de sequenciamento de transcriptoma conduzida por Fuchs (2014), sendo, no entanto, moderadamente observada em amostras de ápice caulinar e folhas jovens segundo dados disponibilizados pelo Phytozome. A expressão do gene *EgLAC40*, por sua vez, não foi detectada nos ensaios de RT-qPCR (Figura 5), mas foi discretamente observada nos dados de RNA-seq em amostras de folha jovem (Phytozome) e raiz (Fuchs, 2014). Finalmente, o gene *EgLAC52* apresenta uma aparente especificidade por tecidos radiculares, uma vez que sua expressão não foi observada em nenhum outro órgão/tecido amostrado em ambas as técnicas.

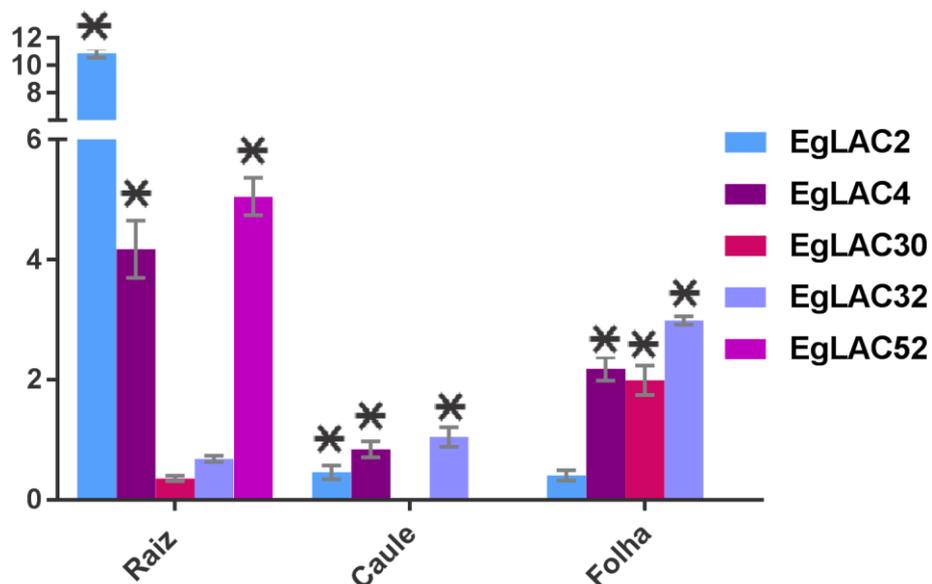


Figura 5. Expressão relativa dos genes *EgLAC30*, *EgLAC32*, *EgLAC40*, *EgLAC2*, *EgLAC4*, *EgLAC38* e *EgLAC52* em amostras de raiz, caule e folha determinada pela técnica de RT-qPCR. Um pool de cDNA de todos os órgãos/tecidos amostrados foi usado como controle. Não foi possível detectar a expressão de *EgLAC38* e *EgLAC40* e, por isso, as mesmas não estão representadas no gráfico (t-test; $p < 0,05$).

Padrões de expressão tecido-específica ou preferencial em determinados órgãos/tecidos não são exclusividade da família das lacases de eucalipto. Em arabidopsis, por exemplo, Berthet e colaboradores (2011) observaram especificidade de expressão para os genes *AtLAC4* (expresso em fibras interfasciculares, vasculares e componentes da columela) e *AtLAC17* (expresso exclusivamente em células interfasciculares). Também em arabidopsis, Turlapati e colaboradores (2011) verificaram que *AtLAC7* se revelou preferencialmente expresso em hidatódios e raízes secundárias, *AtLAC8* teve expressão detectada apenas em grãos de pólen e células do floema, e *AtLAC15* só apresentou expressão em sementes. Já em cana-de-açúcar, Cesarino e colaboradores (2013) reportam que a expressão do gene *SofLAC* ocorre preferencialmente em compartimentos esclerenquimáticos e células parenquimais de tecidos vasculares internos jovens. O fato dos genes *EgLAC* apresentarem padrões distintos de expressão tecido-específica sugere uma diversificação funcional entre eles.

4.3 Expressão relativa em resposta aos estresses oxidativo e osmótico

Considerando o número expressivo de genes *EgLAC* presentes em eucalipto, decidiu-se investigar o padrão de expressão em resposta a estresse de somente alguns deles. Neste caso, cinco genes candidatos (*EgLAC4*, *EgLAC14*, *EgLAC35*, *EgLAC45* e *EgLAC52*) potencialmente responsivos a diferentes condições de estresse foram selecionados com base nas análises *in silico* realizadas junto ao banco de dados privado Scylla EST como descrito no item 2.2. A expressão destes genes foi então investigada por RT-qPCR em plântulas de eucalipto submetidas aos estresses oxidativo e osmótico, respectivamente, conforme descrito no item 2.3. Adicionalmente, é importante salientar que os genes selecionados apresentam expressão majoritária em raiz e caule.

4.3.1 Estresse Oxidativo

Os genes investigados revelaram-se responsivos (positiva ou negativamente) ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂, sendo que padrões variáveis de expressão foram observados em caule e raiz. Para o gene *EgLAC4*, por exemplo, um aumento no acúmulo de transcritos foi observado a partir de 6 h após a indução do estresse no caule, com ligeira queda após 24 h, padrão similar ao observado em raízes porém não foi considerado significativo estatisticamente. *EgLAC14* também apresenta um acréscimo no acúmulo de transcritos, no entanto, de forma mais tardia em raiz, sendo o pico de expressão observado nos tempos de 24 h e 6 h em caule e raiz, respectivamente. Já *EgLAC35* teve a sua expressão reprimida em amostras caulinares nos tempos de 6 e 12 h após a indução do estresse, ocorrendo o mesmo em amostras radiculares, muito embora após 24 h, essa expressão seja curiosamente aumentada em amostras caulinares. Quanto ao gene *EgLAC45*, constata-se um aumento significativo da sua expressão na raiz em todos os tempos amostrais, sendo o pico observado 12 h após a indução do estresse, tempo a partir do qual verifica-se uma atenuação em sua expressão. Por outro lado, o aumento constatado em amostras de caule revelou-se mais discreto e tardio. Para *EgLAC52* não foi detectada expressão em amostras caulinares, o que corrobora com o sugerido um padrão de expressão raiz-específico observado anteriormente. No entanto, um decréscimo no acúmulo de transcritos em amostras de raiz foi observado. Cabe ressaltar que a intensa e precoce resposta nas amostras de raiz pode estar relacionada com a forma de cultivo e indução de estresse adotadas.

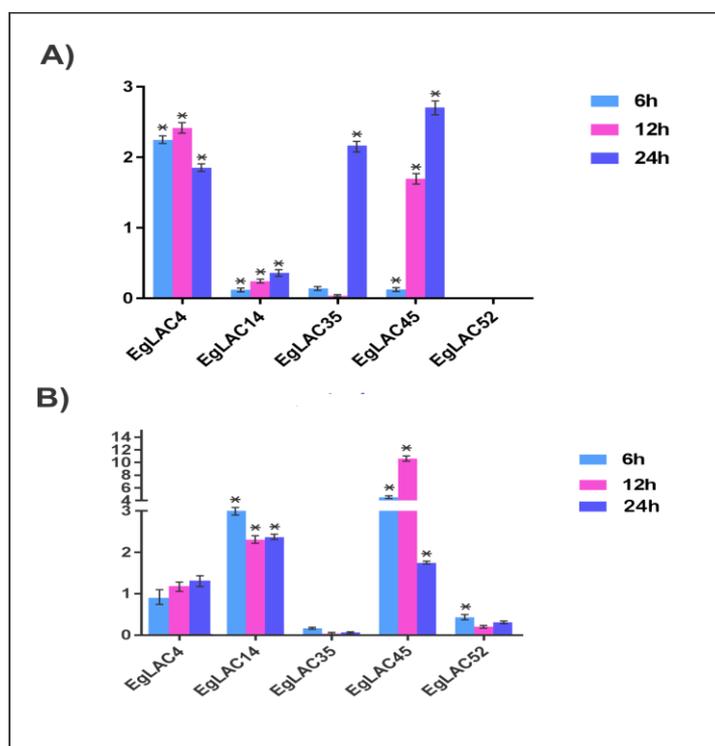


Figura 4. Expressão relativa dos genes *EgLAC4*, *EgLAC14*, *EgLAC35*, *EgLAC45* e *EgLAC52* em amostras de caule (A) e raiz (B) de plântulas de eucalipto submetidas a estresse oxidativo. As amostras foram coletadas 6, 12 e 24 h após a aplicação do estresse (t-test; $p < 0,05$).

4.3.2 Estresse Osmótico

Em condições de estresse osmótico induzido por PEG, os genes investigados revelaram-se responsivos e, em sua maioria, regulados positivamente. De forma similar ao observado nas amostras submetidas ao estresse oxidativo, variações espaço-temporais na expressão dos genes alvos foram observadas. Quando a expressão do gene *EgLAC4* é analisada, observa-se em caule uma indução de sua expressão em todos os tempos amostrais. Por outro lado, o oposto é verificado nas amostras de raiz onde um menor acúmulo de transcritos é observado. O gene *EgLAC14*, por sua vez, apresenta um pico de expressão nos tempos de 12 e 24 h após a aplicação do estresse osmótico em raiz e caule, respectivamente, sendo observada uma redução de sua expressão em raiz a partir de 12 h. Já *EgLAC35* manifesta um perfil de expressão relativa altamente divergente em amostras de raiz e caule, sendo esta quase não detectável em todos os tempos amostrais em amostras caulinares enquanto que, em raiz, apesar de discreta sua expressão é crescente com pico de expressão

registrado 24 h após o tratamento. Quanto ao gene *EgLAC45* observa-se um aumento de sua expressão em ambos os órgãos, sendo esta mais intensa em raiz, com pico de expressão em 12 h. Por fim, o gene *EgLAC52* teve sua expressão fracamente detectável em raiz, com nível máximo de expressão sendo verificado 6 h após a aplicação do estresse. A partir deste tempo amostral, uma redução não significativa de sua expressão foi constatada.

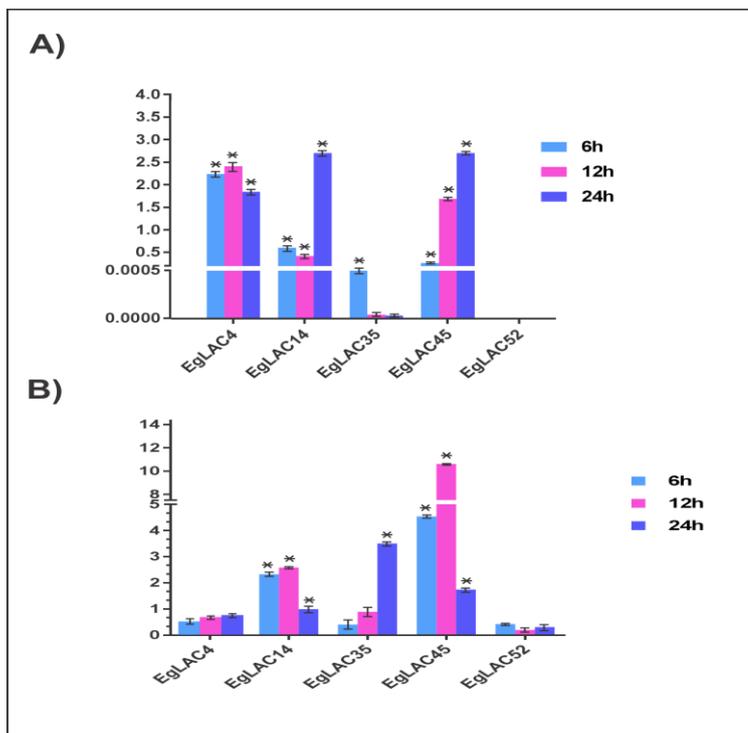


Figura 5. Expressão relativa dos genes *EgLAC4*, *EgLAC14*, *EgLAC35*, *EgLAC45* e *EgLAC52* em amostras de caule (A) e raiz (B) de plântulas de eucalipto submetidas a estresse osmótico. As amostras foram coletadas 6, 12 e 24 h após a aplicação do estresse (t-test; $p < 0,05$).

Os resultados apresentados acima corroboram dados disponíveis na literatura que relatam a indução da expressão de lacases em diversas espécies vegetais. Em arábida, Cai *et al.* (2016) demonstraram que 12 dentre os 17 genes *AtLAC* são responsivos ao estresse salino aplicado na raiz. O gene *AtLAC2*, por exemplo, é induzido em resposta ao estresse salino e osmótico. Em tomate, Wei *et al.* (2000), descrevem a indução na expressão de lacases em raízes em resposta à adição de 170 mM de NaCl ao meio. Por outro lado, em milho, o gene *ZmLAC1* mostrou-se responsivo ao estresse salino, mas sua expressão não foi alterada em resposta ao estresse osmótico induzido por PEG (Liang *et al.*, 2006). Em contrapartida, Shen *et al.* (2013) observaram a indução da expressão de lacases em milho na

presença exacerbada de chumbo, levando-os a concluir que as mesmas respondem ao estresse ocasionado pela acumulação de metais pesados. Como prova do envolvimento das lacases na resposta das plantas aos estresses, Cho *et al.* (2014) verificaram que a superexpressão de um precursor de lacase de arroz (OsCh11) aumentou a tolerância de arabidopsis a condições de estresse salino e ocasionado por seca. De maneira similar, em arroz, Liu e colaboradores (2017) registraram uma maior tolerância a níveis tóxicos de cobre em plantas que superexpressavam *OsLAC10*.

5. Conclusões

A família das lacases em *E. grandis* é composta por 54 genes que se apresentam distribuídos em nove cromossomos.

Padrões distintos de expressão tecido-específica foram detectados para os genes identificados com base em dois perfis transcriptômicos gerados por RNA-seq. Foram observadas lacases enriquecidas em um dado órgão/tecido, ubíquas ou, ainda, com expressão não detectável. A validação por RT-qPCR revelou a expressão específica de *EgLAC52* em raiz. Em paralelo, alterações na expressão relativa de algumas lacases em resposta aos estresses oxidativo e osmótico foram constatadas, sugerindo a participação destas em mecanismos responsivos a estresses abióticos.

6. Anexos

ANEXO I

GENE	FOLHA MADURA	FLOEMA	ÁPICE	XILEMA PRIMÁRIO	XILEMA SECUNDÁRIO	FOLHA JOVEM
EGLAC1	1.48	15.199	0.258	327.818	536.607	0.2
EGLAC2	0	0	0	0	0	0
EGLAC3	0.403	0	0	0	0	0.272
EGLAC4	1.641	4.652	0.925	178.341	142.224	1.673
EGLAC5	0	0	0	0	0	0
EGLAC6	0	0,301	0	0	0	0
EGLAC7	0	0	0,077	0	0	0
EGLAC8	0	0	0	0	0	0
EGLAC9	0	0	0	0	0	0
EGLAC10	0,83	0,643	0,048	14,454	19,159	0,12
EGLAC11	0,406	1,913	0,027	18,719	3,829	0,081
EGLAC12	0	1,677	0,033	9,856	3,857	0,139
EGLAC13	0,722	0	0,939	0,451	0	0,584
EGLAC14	0,037	1,261	1,01	0,279	5,878	0,646
EGLAC15	0	0	0	0	0	0
EGLAC16	0	0	0	0	0	0
EGLAC17	0,021	10,082	0,028	3,743	1,933	0
EGLAC18	1,397	0	0,617	0	0	0,285
EGLAC19	0,058	11,192	0,454	6,295	0,641	0,145
EGLAC20	0,032	2,997	0,583	9,058	1,543	0,79
EGLAC21	0,006	13,213	1,796	11,267	0,025	1,72
EGLAC22	1,056	0	0,319	0,02	0	0,001
EGLAC23	0,007	0,452	0	0,103	0,995	0,001
EGLAC24	5,917	0	159,382	2,318	0,958	108,278
EGLAC25	0,941	0	2,969	0	0	0,634
EGLAC26	0,766	0,276	23,955	1,395	0	9,437
EGLAC27	61,241	2,667	61,051	2,352	0	63,43
EGLAC28	14,181	69,914	84,487	8,995	0,779	49,918
EGLAC29	0	0,688	0,166	2,634	0	0,113
EGLAC30	64,935	0	120,194	0,088	0	176,908
EGLAC31	0	0	0	0	0	0
EGLAC32	1,76	0,205	38,763	0,095	0	50,456
EGLAC33	0	1,082	2,431	0	0	0,82
EGLAC34	12,56	13,129	0,103	42,169	26,131	0
EGLAC35	4,21	8,585	2,811	386,888	119,008	1,109
EGLAC36	1,374	0,763	1,46	1,627	8,006	2,627
EGLAC37	0,389	0	0,584	0	0	0,127
EGLAC38	0	0	0,616	0	0	0,957
EGLAC39	0	0	0,482	0	0	0
EGLAC40	0	0	0	0	0	0,144

EGLAC41	1,174	0	0,493	0	0	0,753
EGLAC42	0,932	0	1,675	1,111	3,867	0,673
EGLAC43	0	0	0	0	0	0
EGLAC44	20,205	50,398	4,662	1019,43	880,324	7,807
EGLAC45	0	0	0,303	0,3	0	0,074
EGLAC46	0	0	0,593	0,296	0	0,066
EGLAC47	1,28	2,507	0	61,835	37,299	0
EGLAC48	0	0	0	0	0	0
EGLAC49	0	0	0	0	0	0
EGLAC50	41,011	0,62	48,677	1,723	0	54,267
EGLAC51	0,791	0	0,602	0,225	0,36	0,205
EGLAC52	0	0	0	0	0	0
EGLAC53	0,757	1,045	0,021	32,199	18,571	0
EGLAC54	4,907	23,657	27,413	3,995	1,057	19,347

ANEXO II

GENE	RAIZ	CAULE	FOLHA	GENE	RAIZ	CAULE	FOLHA
EGLAC1	32,67144	65,79186	0	EGLAC28	3,843699	3,870109	4,018546
EGLAC2	1,281233	0	0	EGLAC29	14,09356	0	0
EGLAC3	1,921849	1,935055	6,027819	EGLAC30	0,640616	24,18818	80,37091
EGLAC4	21,14034	16,44796	0	EGLAC31	0	0	0
EGLAC5	0	0	0	EGLAC32	22,42158	33,86345	48,22255
EGLAC6	1,281233	0	0	EGLAC33	20,49973	8,707746	6,027819
EGLAC7	1,921849	0	0	EGLAC34	21,78096	59,01916	2,009273
EGLAC8	6,406165	0	0	EGLAC35	60,21795	33,86345	0
EGLAC9	6,406165	0	0	EGLAC36	0	0,967527	3,013909
EGLAC10	15,37479	14,51291	2,009273	EGLAC37	2,562466	1,935055	0
EGLAC11	14,73418	14,51291	0	EGLAC38	0	0	0
EGLAC12	16,01541	13,54538	0	EGLAC39	1,281233	0	0
EGLAC13	22,42158	0,967527	1,004636	EGLAC40	1,281233	0	0
EGLAC14	3,843699	1,935055	0	EGLAC41	3,843699	0	0
EGLAC15	1,921849	0	1,004636	EGLAC42	50,6087	0,967527	0
EGLAC16	0	0	1,004636	EGLAC43	0	0	0
EGLAC17	0,640616	0	0	EGLAC44	95,45185	165,4472	1,004636
EGLAC18	3,203082	0,967527	3,013909	EGLAC45	7,687397	0	1,004636
EGLAC19	0	0,967527	0	EGLAC46	8,96863	0,967527	2,009273
EGLAC20	1,281233	0	0	EGLAC47	42,9213	47,40884	0
EGLAC21	8,328014	2,902582	0	EGLAC48	0	0	0
EGLAC22	1,281233	0	0	EGLAC49	0,640616	0	0
EGLAC23	8,96863	0,967527	1,004636	EGLAC50	3,843699	9,675273	3,013909
EGLAC24	0	2,902582	14,06491	EGLAC51	1,921849	0	0
EGLAC25	1,921849	0	0	EGLAC52	19,21849	0	0
EGLAC26	2,562466	0,967527	0	EGLAC53	3,203082	15,48044	0
EGLAC27	5,765548	6,772691	5,023182	EGLAC54	5,124932	4,837636	1,004636

7. Referências bibliográficas

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas Anuário Estatístico 2013 (Ano base 2012).

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel Dados do setor (setembro/2013).

BALASUBRAMANIAN, V. K. et al. – Genome-wide identification of multifunctional laccase gene family in cotton (*Gossypium spp.*); expression and biochemical analysis during fiber development. **Nature**, DOI: 10.1038 (2016)

BELOQUI, A. et al. (2006) Novel polyphenol oxidase mined from metagenome expression library of Bovine Rumen: Biochemical properties, structural analysis and phylogenetic relationship. *J Biol Chem* v. 281, p.22933–2294 em SHARMA, K. K., KUBAD, R. C. - Laccase: enzyme revisited and function redefined. **Indian Journal Microbiol.**, v 48, p 309-316, Setembro 2008

BERTHET S. et al - Disruption of *LACCASE4* and *17* results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. **Plant Cell**.2011;23(3):1124–37.

BRANDALISE, M, SEVERINO, F. E., MALUF, M.P. AND MAIA, I.G. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. **Plant Cell Rep.** 28:1699–1708, 2009.

BRYAN, A. C. et al. - Knockdown of a laccase in *Populus deltoides* confers altered cell wall chemistry and increased sugar release, **Plant Biotechnology Journal** v. 14, p. 2010–2020, 2016.

CAI, X.; DAVIS E. J.; BALLIF, J.; LIANG, M.; BUCHMAN, E.; HAROLDSEN, V.; TORABINEJAD, J.; WU, Y.- Mutant Identification and Characterization of laccase gene family in *Arabidopsis*, **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 2563 – 2569, 2006.

CESARINO I., ARAUJO P., MAYER J.L.S., VICENTINI R., BERTHET S., DEMEDTS B., et al - Expression of SofLAC, a new laccase in sugarcane, restores lignin content but not S:G ratio of *Arabidopsis lac17* mutant. **J Exp Bot.** 2013;64(6):1769–81.

CHEN, E.L.; CHEN, Y. A.; CHEN, L. M.; LIU, Z. H. - Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *PlantPhysiol. Biochem.* 40, 439–444 – 2002 .Em: MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; VIANA, J. O. F.; DORNELAS, M. G.;

MAZZAFERA, P.- Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants, **Journal Of Integrative Plant Biology**, 52 (4): 360–376, 2010

CHO H.Y., LEE C., HWANG S.G., PARK Y.C., LIM H.L., JANG C.S.- Overexpression of the *OsCh11* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic Arabidopsis. **Gene**. 2014;552(1):98–105.

DITTMER, N. T. *et al.*, Characterization of cDNA encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm,

Manduca sexta, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* v. 34, p. 29–4, 2004 em SHARMA, K. K., KUBAD, R. C. - Laccase: enzyme revisited and function redefined. **Indian Journal Microbiol.**, v 48, p 309-316, Setembro 2008

FAURE ,D. *et al.*, Bouillant ML and Bally R (1994) Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl Environ Microbiol* v. 60, p.3413–3415, 1994 em SHARMA, K. K., KUBAD, R. C. - Laccase: enzyme revisited and function redefined. **Indian Journal Microbiol.**, v 48, p 309-316, Setembro 2008

FIALHO, L.C – Identificação e caracterização de promotores com padrão de expressão ubíquo e específico de câmbio de eucalipto. **Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.**

FUCHS, M. C. P. ,Caracterização gênica para uma anomalia de eucalyptus em fase inicial de desenvolvimento, **Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.**

GIARDINA, P. *et al.* – Laccases: a never ending story. **Cell Mol. Life Sci**, v. 67, p.369-385, 2012

HOSHINO, A. A.. I Isolamento e Caracterização de Promotores Tecido-específicos a partir das Informações do SUCEST (“Sugarcane Expressed Sequence Tags”). 143f. **Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.**

HUTTERMAN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A.. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55, 387–394, 2001. Em: MAYER, A. M & STAPLES, R. C. - Laccase: new functions for an old enzyme, **Phytochemistry** 60, 551 -565, 2002.

IBÁ- Relatório anual Indústria Brasileira de Árvores 2015 (ano base 2014)

LAFAYETTE, P. R.; ERIKSSON, K. E. L.; DEAN, J. F. D. – Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*), **Plant Molecular Biology**, 1999 May, v.40, p 23 -35.

LIANG, M.; HAROLDSEN, V.; CAI, X.; WU, Y. Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. **Plant Cell Environ.**, 2006 May;29(5):746-53.

LIDE, L. et al. – Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun*, v. 67, p. 6034–6039, 1999 em SHARMA, K. K., KUBAD, R. C. - Laccase: enzyme revisited and function redefined. **Indian Journal Microbiol.**, v 48, p 309-316, Setembro 2008

LIMA, P. S. - Clonagem, expressão heteróloga e Caracterização Molecular de um Gene de Lacase de *Pycnoperus sanguineus.*, 74p., **Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, UnB**, Brasília, 2009.

LIU, Q. et al. – Comprehensive analysis of rice laccase gene (*OdLAC*) Family and ectopic expression. Of OsLAC10 enhances tolerance to copper stress in Arabidopsis.,**International Journal of Molecular Sciences**, DOI: 10.3390, 2017

LU, S.; LI, Q.; WEI, H.; CHANG, M. J.; TUNLAYA-ANUKIT, S.; KIM, H.; LIU, J.; SONG, J.; SUN, Y. H., YUAN, L.; YEH, T. F.; PESZLEN, I.; RALPH, J.; SEDEROFF R. R.; CHIANG, V. L.. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. 2013 Jun 25;110(26):10848-53.

MAYER, A. M & STAPLES, R. C. - Laccase: new functions for an old enzyme, **Phytochemistry** 60, 551 -565, 2002.

MC CRAIG, B. C.; MEAGHER, R. B.; DEAN, J. F. D.- Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*, **Planta**, v. 221, p. 48-57, 2005.

MONTEIRO, M. B. O; PEREIRA, R. P.W; ABREU, H. S. – Bioquímica da Lignificação de Células Xilemáticas, **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.2, p. 48 – 57, 2004

van de MORTEL, J.; VILLANUEVA, L. A.; SCHAT, H.; KWEKKEBOOM, J.; COUGHLAN, S.; MOERLAND, P. D.; van THEEMAAT, E. V. L.; KOOMNEEF, M.; AARTS, G. M. - Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress

response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyper accumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiol.** 142, 1127–1147- 2006.

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; VIANA, J. O. F.; DORNELAS, M. G.; MAZZAFERA, P.- Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants, **Journal Of Integrative Plant Biology**, 52 (4): 360–376, 2010

MYBURG, A. A., *et al.* - The genome of *Eucalyptus grandis*, **Nature**, DOI:10,1038, 2014.

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. S.; MARGIS, R.; FRAZZON, F.; PASQUALI - Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in *Eucalyptus* Species - **Plant Cell Physiol.**53(2): 405–422 (2012)

PEREIRA, J. L. – Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus*, 100p., **Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Brasília**, Brasília, 2007

RANOCHA, P.; MCGOUGALL, G.; HAWKINS, S.; STERJIADES, R.; BORDERIES, G.; CABANES-MACHETEAU, M.; BOUDET, A-M; GOFFNER, D. – Biochemical characterization, molecular cloning and a expression of laccases – a divergent gene family – in Poplar, **Eur. J. Biochem.**, 1999, Jan, v.259(1-2), p. 485 -495

RANOCHA, P., *et al.* – Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in Poplar, **Plant Physiol.**, 2002, May, v. 129(1), p. 144 -155.

RIBEIRO, C. L.; SASSAKI, F. T.; SOPRANO, A. S.; MAIA, I. G. – Characterization of a Promoter Root-Especific of *Eucalyptus* – **Anais XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2009.

ROCKWOOD, D.L., RUDIE, A.W., RALPH, S.A., ZHU, J.Y., WINANDY, J.E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops, **Int. J. Mol. Sci.**, v.9, p.1361-1378, 2008.

RODRIGUES, M.I. Estudos Funcionais do gene *EgTIP2* que codifica uma aquaporina de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*). 84p., **Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2013.

SASSAKI, F. T. Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do banco forests (eucalyptus genome sequencing project consortium). 111p. **Dissertação (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2008.

SCHUETZ, M. et al. – Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. **Plant Physiology**, v 166, p. 790-807, 2014.

SHARMA, K. K., KUBAD, R. C. - Laccase: enzyme revisited and function redefined. **Indian Journal Microbiol.**, v 48, p 309-316, Setembro 2008

SHEN Y., ZHANG Y. Z., CHEN J., LIN H.J., ZHAO M.J., PENG H.W., *et al.*- Genome expression profile analysis reveals important transcripts in maize roots responding to the stress of heavy metal Pb. **Physiol Plant**. 2013;147(3):270–82.

SILVA, J.C.; MATOS, J.L.M.; OLIVEIRA, J.T.S.; EVANGELISTA, W.V. - Influência da idade e da posição ao longo do tronco na composição química da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ExMaiden, **Revista Árvore**, v.29, n.3, p. 455 – 460,2005.

TRUGILHO, P. F.; LIMA, J. T.; MORI, F. A.; LINO, A. L. - Avaliação de clones de *Eucalyptus* para a produção de carvão vegetal.,**Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p. 107 -114, 2001.

WANG, C. –Y. et al. - MiR397b regulates both lignin contents and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v 12, p 1132-1142 2014.

WANG, G.D.; LI, Q. J.; LUO, B.; CHEN, X.Y. - Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. **Nat Biotechnol**. 2004 Jul;22(7):893-7.

WANG J., GENG J., JIA W., CHANG S., LI S., LI Y., - Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement - - **Biotechnol Biofuels** (2015) 8:145

WANG, Y. *et al.* - LACCASE5 Is Required for Lignification of the *Brachypodium distachyon* Culm¹, **Plant Physiology**, v.168, p. 192-204, maio 2015

YANG, Y.; FAN F.; ZHUO, R.; MA, F.; GONG. Y.; WAN, X.; JIANG. M.; ZHANG, X.; - Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Pichia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H₂O₂-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system.,**Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, p. 5845 – 5854, 2012.

ZHAO, Q.; NAKASHIMA, J.; CHEN, F.; YIN, Y.; FU, C.; YUN, J.; SHAO, H.; WANG, X.; WANG, Z. Y.; DIXON, R. A.; LACCASE Is Necessary and Non redundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. **Plant Cell.**, 2013 Oct;25(10):3976-87.