

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA FAMÍLIA DAS LACASES DE  
EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GRANDIS*)**

**Mariana de Lara Campos Arcuri**

Botucatu

**2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA FAMÍLIA DAS LACASES DE  
EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GRANDIS*)**

**Mariana de Lara Campos Arcuri**

**Relatório de Iniciação Científica apresentado  
ao Departamento de Genética do Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual Paulista  
– Campus de Botucatu, como exigência do  
estágio optativo realizado no curso de  
bacharelado em Ciências Biológicas, sob  
orientação do Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia.**

Botucatu

**2016**

## RESUMO

As lacases, *p*-diphenol-O<sub>2</sub>-oxidoreductase, são enzimas que desempenham papel fundamental na oxidação de monolignóis durante a biossíntese de lignina, estando associadas com processos de crescimento e tolerância a alguns estresses abióticos, podendo 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 detoxicação celular. A literatura indica, ainda, a correlação de lacases na aclimação de condições de estresse salino em milho e tomate. As lacases são geralmente codificadas por famílias multigênicas compostas por vários membros. Empregando análises *in silico*, o presente estudo identificou 49 sequências gênicas relacionadas com lacases no genoma de eucalipto. Após análises mais minuciosas, distinguiram-se 35 sequências gênicas codificando lacases em eucalipto, as quais foram filogeneticamente distribuídas em seis subgrupos. Com base em dados de sequenciamento de transcriptoma foram observados padrões distintos de expressão para as 35 lacases identificadas, sendo algumas específicas (especialmente em raiz) e outras enriquecidas em um dado órgão/tecido. Por outro lado, alguns genes não tiveram sua expressão detectada pela técnica. Em paralelo, o padrão de expressão do gene *EgLac4* em resposta a estresses foi caracterizado por RT-qPCR. Esse gene mostrou-se responsivo aos estresses oxidativo e mecânico, especialmente em caules e em folhas.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos empregados nas análises de expressão relativa

**Tabela 2.** Relação dos genes codificando lacases em eucalipto e respectivos IDs.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Árvore filogenética gerada para a família multigênica das lacases de *Eucalyptus grandis*

**Figura 2.** Expressão (valores de RPKM) dos genes *EgLac* em raiz, folha e caule de *Eucalyptus grandis*.

**Figura 3.** Visualização do RNA total extraído a partir de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto.

**Figura 4.** Produtos de amplificação visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (\*) Bandas de tamanho esperado (1600 pb) selecionadas para a purificação.

**Figura 5.** Expressão relativa do gene *EgLac4* em amostras de raiz, folha e caule de plântulas submetidas a estresse oxidativo.

**Figura 6.** Expressão relativa do gene *EgLac4* em amostras de raiz, caule e folha de plântulas submetidas a estresse mecânico.

## SUMÁRIO

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO.....                                                                    | 6  |
| 1. Importância do Eucalipto.....                                                   | 6  |
| 2. Lacases.....                                                                    | 7  |
| 3. Ação responsiva de lacases a estresses abióticos e bióticos.....                | 8  |
| 4. Lacases em Eucalipto.....                                                       | 9  |
| METODOLOGIA.....                                                                   | 11 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                        | 17 |
| 1. Identificação dos genes.....                                                    | 17 |
| 2. Análises de expressão tecido-específica.....                                    | 19 |
| 3. Construção do cassete para superexpressão de <i>EgLac4</i> .....                | 21 |
| 4. Expressão de <i>EgLac 4</i> em resposta aos estresses oxidativo e mecânico..... | 21 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                          | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                    | 26 |

## INTRODUÇÃO

### 1. Importância do Eucalipto

Pertencente à família *Myrtaceae*, o gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, reúne mais de 700 diferentes espécies, sendo o gênero mais cultivado no mundo, distribuído em mais de 90 países. Este cultivo tende a continuar se intensificando, especialmente em países tropicais, onde seu crescimento 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 alcançou níveis massivos. A silvicultura, segundo dados da ABRAF, ocupava, em 2012, uma totalidade de 5.102.030 ha plantados, apresentando um índice de crescimento equivalente a 4,3% frente ao ano anterior. Esse fato se deve à consolidação do segmento industrial de papel e celulose que, atualmente, envolve 220 empresas distribuídas em 18 estados federativos nacionais, gerando 128 mil empregos diretos e 640 mil empregos indiretos, compondo, portanto, um importante setor na economia nacional.

Segundo dados da Bracelpa, em 2012, o Brasil ocupou o 4º lugar no ranking mundial de produção de celulose, enquanto, na produção de papel apresentou-se como 9º colocado. 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 biotecnológicos e das técnicas de melhoramento genético, às estratégias operacionais de rotação de culturas, entre outros fatores. (SASSAKI, 2008; BRACELPA, 2013; ABRAF, 2013)

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 rendimento otimizado 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*.

## 2. Lacases

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, posteriormente, já na parede celular, enzimas mediam reações de oxidação desidrogenativas de monolignóis existentes, promovendo a síntese de lignina. Dentre as enzimas descritas como envolvidas nesta etapa do processo, encontram-se as lacases (MONTEIRO *et al.*, 2004).

Geralmente, uma enzima oxidativa é uma potencial candidata ao processo de lignificação se ela estiver espacialmente relacionada com o referido processo, ou seja, associada à parede celular em diferenciação do xilema. Além disso, o fato da enzima purificada ser capaz de oxidar monolignóis, *in vitro*, ou ainda, se o *knock-out* (KO) *in planta* dos genes relacionados comprometer diretamente a síntese de lignina (RANOCHA *et al.*, 1999), constituem outros indícios importantes de seu envolvimento com a lignificação.

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, otimizando o acesso à celulose, permitindo, assim, a produção de papel.

As lacases (*p*-diphenol O<sub>2</sub> oxidoreductase) são glicoproteínas que podem ser encontradas em bactérias, fungos, plantas e 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, 1999). As lacases vegetais são geralmente codificadas por famílias

multigênicas, indicando a existência de grande redundância funcional. Em *Populus sp.*, dentre 866 sequências expressas exclusivamente no xilema, 14 exibiam alta similaridade com lacases (RANOCHA *et al.*, 2002), enquanto que em *Arabidopsis thaliana*, 17 sequências similares a lacases foram identificadas (McCRAIG, 2005). Em um levantamento mais minucioso, Lu e colaboradores (2013) identificaram 49 genes codificando lacases no genoma de *Populus trichocarpa*. Da mesma maneira, um levantamento prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa identificou 14 sequências codificando lacases no genoma de *E. grandis* (FIALHO, 2013).

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. Já *Pinus taeda* apresenta uma família 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).

Do ponto de vista funcional, Zhao e colaboradores (2013) demonstraram que as lacases, em especial aquelas codificadas pelos genes *AtLAC11*, *AtLAC4* e *AtLAC17*, estão envolvidas com o processo de polimerização de lignina durante o desenvolvimento vascular de *arabidopsis*. Já em *Populus trichocarpa* demonstrou-se que a superexpressão do microRNA Ptr-MIR397, um regulador negativo de 29 lacases, reduziu o conteúdo de lignina das árvores transgênicas (LU *et al.*, 2013).

### **3. Ação responsiva de lacases a estresses abióticos e bióticos**

As lacases têm sido relatadas na literatura como estando direta ou indiretamente envolvidas em diferentes tipos de estresses. McCraig e colaboradores (2005), por exemplo, 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 o processo de regeneração celular (revisto em Mayer & Staples, 2002). Em linha com tais observações, uma lacase com elevada expressão em raízes de milho submetidas a altas concentrações de NaCl ou PEG também foi identificada, sugerindo um possível envolvimento desta nos mecanismos de tolerância aos estresses salino e osmótico (LIANG *et al.*, 2006).

Estudos com lacases fúngicas revelaram que estas são responsivas ao estresse oxidativo, detoxicando as células nas quais são expressas. Outro estudo demonstrou que a superexpressão de uma lacase de algodão específica de raiz em *A. thaliana* aumenta a tolerância da planta transgênica a determinados contaminantes orgânicos (WANG *et al.*, 2004). Adicionalmente, mutantes KO de arabisopsis com inserções em alguns genes codificadores de lacase também confirmaram o envolvimento destas no processo de tolerância aos estresses abióticos (CAI *et al.*, 2006).

#### **4. Lacases em Eucalipto**

Como parte de um projeto abrangente voltado para a identificação e clonagem de promotores com expressão tecido-específica, nosso grupo de pesquisa identificou diferentes genes candidatos com expressão específica ou preferencial em determinados órgãos/tecidos em *Eucalyptus grandis* (SASSAKI, 2008, RIBEIRO, 2009) assim como em outras espécies vegetais (BRANDALISE, 2007; HOSHINO, 2007). Algumas das sequências promotoras correspondentes foram clonadas e caracterizadas com o objetivo de um futuro emprego em programas biotecnológicos das espécies em estudo. Dentre os genes identificados em eucalipto encontra-se um que codifica uma lacase com expressão específica em câmbio (denominado *EgLac*), cujo promotor foi caracterizado funcionalmente em plantas modelo e validado como apresentando expressão específica em tecido vascular (FIALHO, 2013).

Dada a sua bem documentada implicação em processos de lignificação e potencial relação com a tolerância a determinados estresses, as lacases representam um importante alvo de estudo com grande potencial biotecnológico. Apesar dos dados disponíveis na literatura, as informações sobre as lacases 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 busca identificar e caracterizar molecularmente a família multigênica das lacases presente em *E. grandis*. Para tal, a validação do padrão de expressão tecido-específico, bem como, a regulação da expressão desses genes sob diferentes condições de estresse mecânico e oxidativo serão determinados.

## **METODOLOGIA**

### **Material vegetal**

Para a realização dos ensaios de estresse oxidativo e mecânico foram utilizadas mudas de *E. grandis* (clone SP0791) com dois meses de idade, as quais foram 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 mantidas em câmara de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados até a aplicação dos estresses. Para as análises de expressão tecido-específica, diferentes órgãos/tecidos de eucalipto foram coletados a partir de tais mudas e de árvores com aproximadamente dois anos plantadas em área de produção da empresa supracitada.

### **Análises *in silico***

A fim de determinar o número de genes codificando lacases em eucalipto, análises *in silico* foram realizadas junto ao genoma de *E. grandis* usando a ferramenta BLAST disponível no Browser v9.0 Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein *et al.*, 2012) e no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para tal, as sequências das lacases de *A. thaliana* e de *P. trichocarpa* previamente caracterizadas foram usadas como iscas. As sequências das lacases de eucalipto assim obtidas foram submetidas a análises filogenéticas subsequentes empregando o pacote MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 5.

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

O RNA total de diferentes órgãos/tecidos (raízes, folhas, caules, botão floral e câmbio vascular) de *E. grandis* foi extraído empregando a metodologia de descrita por Chang *et al.* (1993) e, posteriormente modificado 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:álcool isoamílico - 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 lavagem 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 resuspenso em 25 µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

### **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 nas mesmas. Após este tratamento, cada alíquota de RNA total foi submetida à transcrição reversa empregando-se o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* seguindo as recomendações propostas pelo fabricante (Invitrogen).

### **Análise da expressão órgão/tecido-específica usando dados de RNA-Seq**

O padrão de expressão órgão/tecido-específico dos diferentes membros da família gênica das lacases de eucalipto foi previamente determinado empregando perfis transcricionais obtidos pelo sequenciamento, usando a metodologia de 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 utilizados para inferir a sua expressão nos respectivos órgãos/tecidos.

### **Validação da expressão órgão/tecido-específica por qPCR**

Nove genes, acrescentando-se o gene *EgLac4*, foram selecionados com base nos padrões observados nas análises *in silico* descritas no item 3.5 para posterior validação da expressão usando 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 3.4, as quais foram quantificadas com auxílio do espectrofotômetro (Nanodrop) e ajustadas para 270 ng/μl. O reagente *SYBR Green Master Mix* foi empregado conforme recomendação do fabricante (Applied Biosystems) e o equipamento *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) foi utilizado como plataforma para a qPCR.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos empregados nas análises de expressão relativa

|                 |                                        |
|-----------------|----------------------------------------|
| <i>EgLac 2</i>  | Forward 5' GTTCTTTGCATCGATGAACAA 3'    |
|                 | Reverse 5' TGAAATTGAAGGCCTTTGGGG 3'    |
| <i>EgLac 4</i>  | Forward 5' TATAGAGATGAAGAGTGAGACCC 3'  |
|                 | Reverse 5' GTGGATGCTGATGTTGTTGG 3'     |
| <i>EgLac 5</i>  | Forward 5' TCGTCCCATTATTTGCCTCATGC3'   |
|                 | Reverse 5' AATGACTCGGTGGGCCCCGGAA 3'   |
| <i>EgLac 17</i> | Forward 5' GCATTCATCGTTAAGGATGG 3'     |
|                 | Reverse 5'GCAAAC TAACAAAAATGAAA 3'     |
| <i>EgLac 18</i> | Forward 5'ACTAGCCGCAAGCTTGAACAA 3'     |
|                 | Reverse 5' TGAAATTGAAGAAGTACGGTG 3'    |
| <i>EgLac 19</i> | Forward 5' GGCAGAAGGCTTAAATAATT 3'     |
|                 | Reverse 5'TTTTCTTTCTTCAAAAAATG 3'      |
| <i>EgLac 21</i> | Forward 5' TCTAGTCCAACGCGCATGCG 3'     |
|                 | Reverse 5' ACTGAACTTGTAGTGACGGA 3'     |
| <i>EgLac 25</i> | Forward 5' TAACCCAGGGGTATGGTTCA 3'     |
|                 | Reverse 5' GGGATGTCAATCAGCACTTG 3'     |
| <i>EgLac 27</i> | Forward 5' TCTTGACGGTGAATGGGCAA 3'     |
|                 | Reverse 5'TCCGGTCCATCGGACCACGG3'       |
| <i>EgLac 35</i> | Forward 5' CTCATTTCCAAGTTAATCCA 3'     |
|                 | Reverse 5' AGGATGTTCTTAGTGCTACA 3'     |
| <i>TEF</i>      | Forward 5'TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT 3'  |
|                 | Reverse 5' TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT 3' |
| <i>tRNAs</i>    | Forward 5'AGAGGTGAAATTCCAGAAGCCCGT 3'  |
|                 | Reverse 5' CTTCCCTTTGGCTTCCGCCAATTA 3' |

O método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado no cálculo da expressão relativa. Para tal, a expressão relativa do gene alvo foi normalizada pela expressão de um gene normalizador de caráter constitutivo e expressão generalizada escolhido previamente (Transcription elongation factor s-II - TEF e Aspartyl-tRNA synthetase - tRNAs; Oliveira *et al.*, 2012). O software REST foi empregado nas análises estatísticas.

### **Indução dos estresses abióticos em *E. grandis***

A expressão do gene *EgLac4* foi avaliada em mudas de eucalipto submetidas aos estresses mecânico e oxidativo, respectivamente. No caso do estresse mecânico, as mudas de eucalipto mantidas em tubetes foram lesionadas com o emprego de pinça tanto no caule como nas folhas. As coletas foram realizadas nos tempos de 3, 6 e 12 h pós-estresse, sendo, em cada coleta, usado um número amostral equivalente a 3 mudas. Um grupo controle (não tratado) para cada tempo amostral foi coletado em paralelo (n=3). O estresse oxidativo foi induzido pela aplicação, por borrifamento, de uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 mM adicionada de Triton-X 0,1% na parte aérea das mudas em intervalos de 8 h. Outro grupo amostral recebeu aplicação de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Após três aplicações, coletas foram realizadas nos tempos 12 e 24 h pós-tratamento usando três indivíduos amostrais por coleta. Em paralelo, um grupo controle tratado com solução contendo Triton-X 0,1% em H<sub>2</sub>O, e outro sem qualquer tratamento, foram amostrados para cada tempo de coleta. As amostras coletadas foram reunidas em *pools* e mantidas a -80°C até a extração do RNA total.

### **Amplificação da região codificadora de *EgLac4***

A região codificadora do gene *EgLac4* foi amplificada por PCR convencional utilizando oligonucleotídeos específicos (Forward 5' CACCATGAGGTCTTTGTTTCTCTCAG 3' e Reverse 5' TTAAACGGTAGCATTACTTGACA 3') e cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de plântulas de eucalipto com 15 dias conforme descrito no item 3.4. A enzima *GoTaq® Colorless Mastermix* (Promega) foi empregada na reação conforme as recomendações do fabricante. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e o fragmento de interesse purificado do gel empregando o *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma Aldrich) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

### **Construção do cassete para superexpressão de EgLac4 (35S:EgLac4)**

O cassete de superexpressão será construído empregando o vetor binário pK7WG2.0. Neste vetor, a região codificadora de *EgLac* (Fialho, 2013) estará sob controle transcricional de um promotor e de um terminador 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Como o vetor pK7WG2.0 é baseado no sistema Gateway (Invitrogen), ele requer a clonagem prévia do cDNA de interesse no vetor de entrada pENTR. Este procedimento foi realizado empregando o kit *pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning* (Life Technologies).

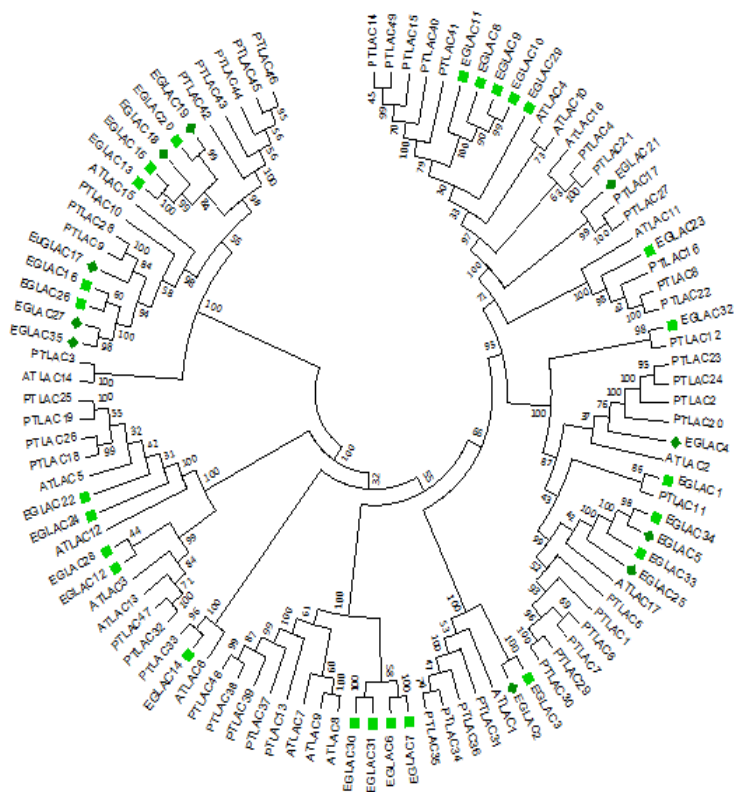
Neste caso, após a ligação do cDNA correspondente à região codificadora de *EgLac4* no vetor de entrada, células competentes da cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, preparadas conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989), foram transformadas através de eletroporação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de Select Agar em água deionizada, com pH 7,0) adicionado de 100  $\mu$ g/ml de canamicina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Identificação dos genes

Numa primeira etapa, as análises *in silico* (descritas no item 3.2) permitiram identificar 49 sequências gênicas relacionadas com lacases no genoma de eucalipto. Porém, o alinhamento de tais sequências e a inspeção da presença do domínio conservado cobre-oxidase determinaram o descarte de 14 delas, o que resultou em um total de 35 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). Esses genes foram numerados de acordo com o ID utilizando a denominação EgLac (Tabela 2).

A análise filogenética das 35 sequências identificadas revelou a distribuição destas em seis diferentes subgrupos (Figura 1), corroborando os dados descritos na literatura para lacases de outras espécies vegetais como *A. thaliana* e *P. trichocarpa* (Turlapati *et al*, 2011; Lu *et al.*, 2013). Estes subgrupos agrupam, em alguns casos, lacases com funções relacionadas.



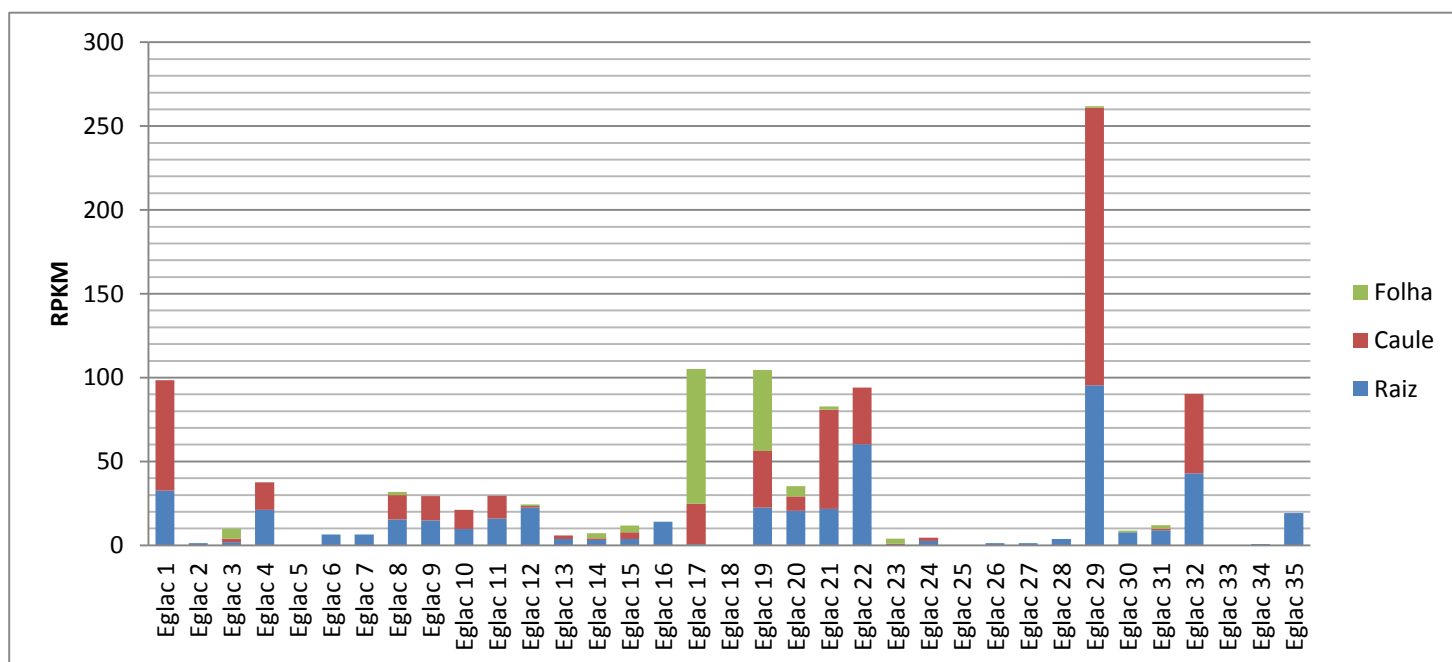
**Figura 1.** Árvore filogenética gerada a partir das sequências deduzidas de aminoácidos das lacases de *Eucalyptus grandis* (EGLAC; destacadas em verde), *Arabidopsis thaliana* (ATLAC) e *Populus trichocarpa* (PTLAC). Os dez genes selecionados para posterior validação da expressão por RT-qPCR estão representados por um losango verde.

. **Tabela 2.** Relação dos genes codificando lacases em eucalipto e respectivos IDs.

| <i>Classificação</i> | <i>ID</i>             |
|----------------------|-----------------------|
| <i>EgLac 1</i>       | <i>Eucgr.A01282.1</i> |
| <i>EgLac 2</i>       | <i>Eucgr.B00869.1</i> |
| <i>EgLac 3</i>       | <i>Eucgr.B00870.1</i> |
| <i>EgLac 4</i>       | <i>Eucgr.B02316.1</i> |
| <i>EgLac 5</i>       | <i>Eucgr.B02428.1</i> |
| <i>EgLac 6</i>       | <i>Eucgr.B02752.1</i> |
| <i>EgLac 7</i>       | <i>Eucgr.B02753.1</i> |
| <i>EgLac 8</i>       | <i>Eucgr.B02794.1</i> |
| <i>EgLac 9</i>       | <i>Eucgr.B02795.1</i> |
| <i>EgLac 10</i>      | <i>Eucgr.B02796.1</i> |
| <i>EgLac 11</i>      | <i>Eucgr.B02799.1</i> |
| <i>EgLac 12</i>      | <i>Eucgr.B04003.1</i> |
| <i>EgLac 13</i>      | <i>Eucgr.C02745.1</i> |
| <i>EgLac 14</i>      | <i>Eucgr.E00040.1</i> |
| <i>EgLac 15</i>      | <i>Eucgr.F02641.1</i> |
| <i>EgLac 16</i>      | <i>Eucgr.F02650.1</i> |
| <i>EgLac 17</i>      | <i>Eucgr.F02652.1</i> |
| <i>EgLac 18</i>      | <i>Eucgr.F04154.1</i> |
| <i>EgLac 19</i>      | <i>Eucgr.F04160.1</i> |
| <i>EgLac 20</i>      | <i>Eucgr.F04163.1</i> |
| <i>EgLac 21</i>      | <i>Eucgr.G03028.1</i> |
| <i>EgLac 22</i>      | <i>Eucgr.G03098.1</i> |
| <i>EgLac 23</i>      | <i>Eucgr.H03315.1</i> |
| <i>EgLac 24</i>      | <i>Eucgr.J00166.1</i> |
| <i>EgLac 25</i>      | <i>Eucgr.J00532.1</i> |
| <i>EgLac 26</i>      | <i>Eucgr.J00888.1</i> |
| <i>EgLac 27</i>      | <i>Eucgr.J00889.1</i> |
| <i>EgLac 28</i>      | <i>Eucgr.J01857.1</i> |
| <i>EgLac 29</i>      | <i>Eucgr.K02996.1</i> |
| <i>EgLac 30</i>      | <i>Eucgr.K03008.1</i> |
| <i>EgLac 31</i>      | <i>Eucgr.K03009.1</i> |
| <i>EgLac 32</i>      | <i>Eucgr.K03111.1</i> |
| <i>EgLac 33</i>      | <i>Eucgr.L00355.1</i> |
| <i>EgLac 34</i>      | <i>Eucgr.L00359.1</i> |
| <i>EgLac 35</i>      | <i>Eucgr.L01441.1</i> |

## 2. Análises de expressão tecido-específica

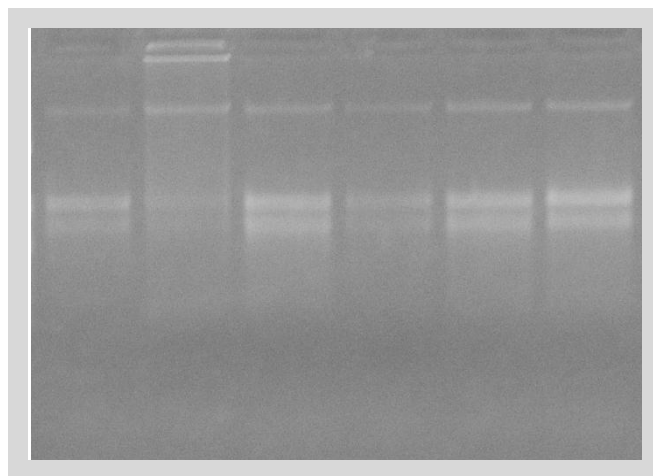
Uma análise prévia do padrão de expressão dos genes *EgLac* (Tabela 2) em diferentes órgãos/tecidos foi realizada empregando dados de transcriptoma obtidos a partir do sequenciamento de bibliotecas de raiz, folha e caule de eucalipto usando RNA-Seq (Fuchs, dados não publicados). Para tal foram utilizados os valores de RPKM de cada gene alvo em dado órgão/tecido. Essa análise revelou padrões distintos de expressão dos genes investigados (Figura 2), sendo alguns deles tecido-específicos (*EgLac6*; *EgLac7*; *EgLac16*; *EgLac35* – todos específicos de raiz) e outros enriquecidos em determinados órgãos/tecidos (*EgLac1*; *EgLac29*; *EgLac32* – enriquecidos em caule). Por outro lado, alguns genes sem expressão detectável ou com expressão ubíqua (*EgLac19*, por exemplo) também foram observados. Padrões de expressão divergentes também foram descritos para os diferentes membros desta família em *A. thaliana* (Turlapati et al., 2011) e *P. trichocarpa* (Lu et al., 2013).



**Figura 2.** Expressão (valores de RPKM) dos genes *EgLac* em raiz, folha e caule de *Eucalyptus grandis*.

Dez destes genes (discriminados na Figura 1) foram selecionados de acordo com o padrão de expressão observado na Figura 2 para posterior validação da expressão por RT-qPCR. Dentre eles destacam-se os genes com expressão pouco ou não detectável nos dados de RNA-Seq (*EgLac2*; *EgLac5*; *EgLac18*; *EgLac25*; *EgLac27*) e aqueles com expressão enriquecida em caule (*EgLac21*), folha (*EgLac17*), e raiz (*EgLac35*). Um gene com aparente expressão ubíqua (*EgLac19*) também foi selecionado. Cabe ressaltar que o gene *EgLac4*, cuja expressão foi investigada anteriormente pelo nosso grupo (Fialho, 2013), também foi incluído nesta análise. Segundo dados prévios, este gene apresenta expressão enriquecida em caule, com expressão residual em raiz, dado que foi corroborado pelas análises de expressão baseadas em dados de RNA-Seq aqui descritas (Figura 2).

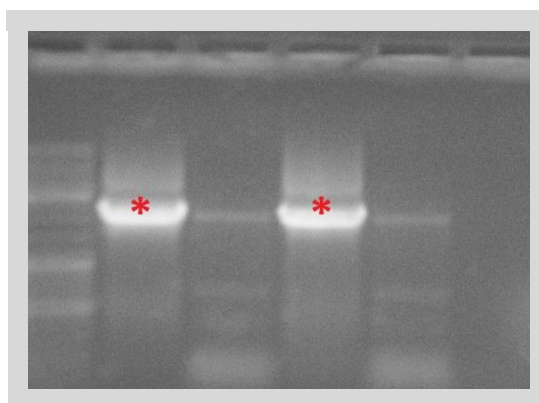
Oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados para as 10 sequências selecionadas (Figura 1). Em paralelo foi realizada a extração de RNA total dos diferentes órgãos/tecidos coletados visando tal validação (Figura 3). As análises de expressão encontram-se em andamento.



**Figura 3.** Visualização do RNA total extraído a partir de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto. Na sequência da esquerda para a direita: raiz, caule, folha, fruto, botão floral e câmbio de *Eucalyptus grandis*. Gel de agarose 1% marcado com brometo de etídio.

### 3. Construção do cassete para superexpressão de *EgLac4*

Para a construção do cassete de expressão visando a superexpressão de *EgLac4*, a região codificadora do referido gene foi amplificada por PCR convencional empregando oligonucleotídeos gene-específicos e cDNA oriundo de plântula de *E. grandis*. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 4), e o fragmento de interesse purificado do gel, obtendo-se um rendimento de 35 ng/μL. Uma vez purificado, o fragmento foi ligado ao vetor de entrada *pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO® Cloning* (Life Technologies) para posterior recombinação com o vetor binário de destino pK7WG2.0 usando a metodologia Gateway.

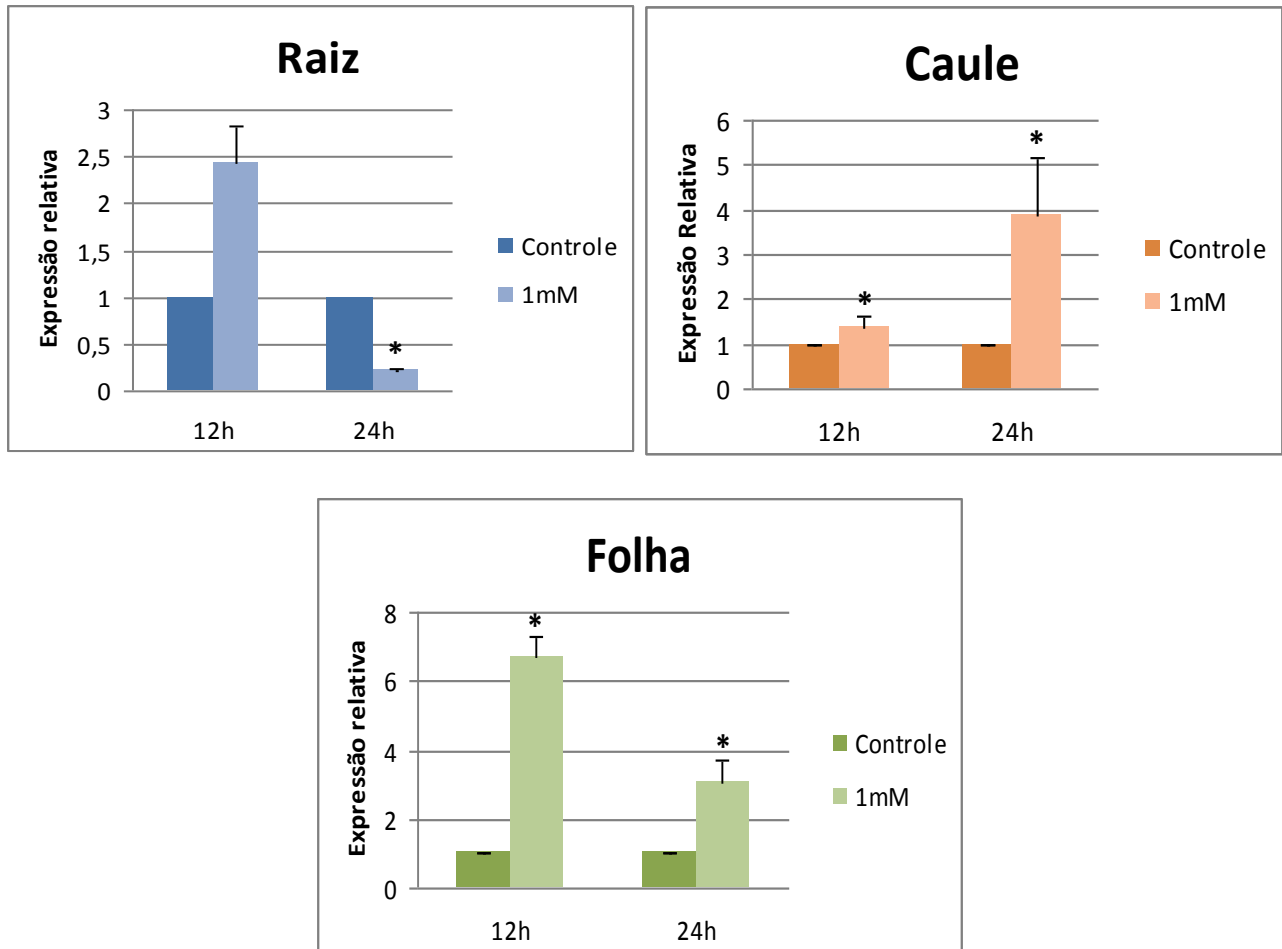


**Figura 4.** Produtos de amplificação visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (\*) Bandas de tamanho esperado (1600 pb) selecionadas para a purificação.

### 4. Expressão de *EgLac 4* em resposta aos estresses oxidativo e mecânico

O padrão de expressão do gene *EgLac4* foi investigado em plântulas de eucalipto submetidas aos estresses oxidativo e mecânico, respectivamente. Quando submetidas ao estresse oxidativo, um aumento significativo da expressão relativa do gene alvo foi detectado em caule e folha quando comparado ao controle tratado com solução de Triton-X 0,1% em H<sub>2</sub>O (Figura 5). Em caule, um aumento gradual da expressão relativa foi observado, com maior acúmulo de transcritos após 24 h. Por outro lado, em folhas, o pico de expressão ocorreu no tempo de 12 h sendo uma redução no

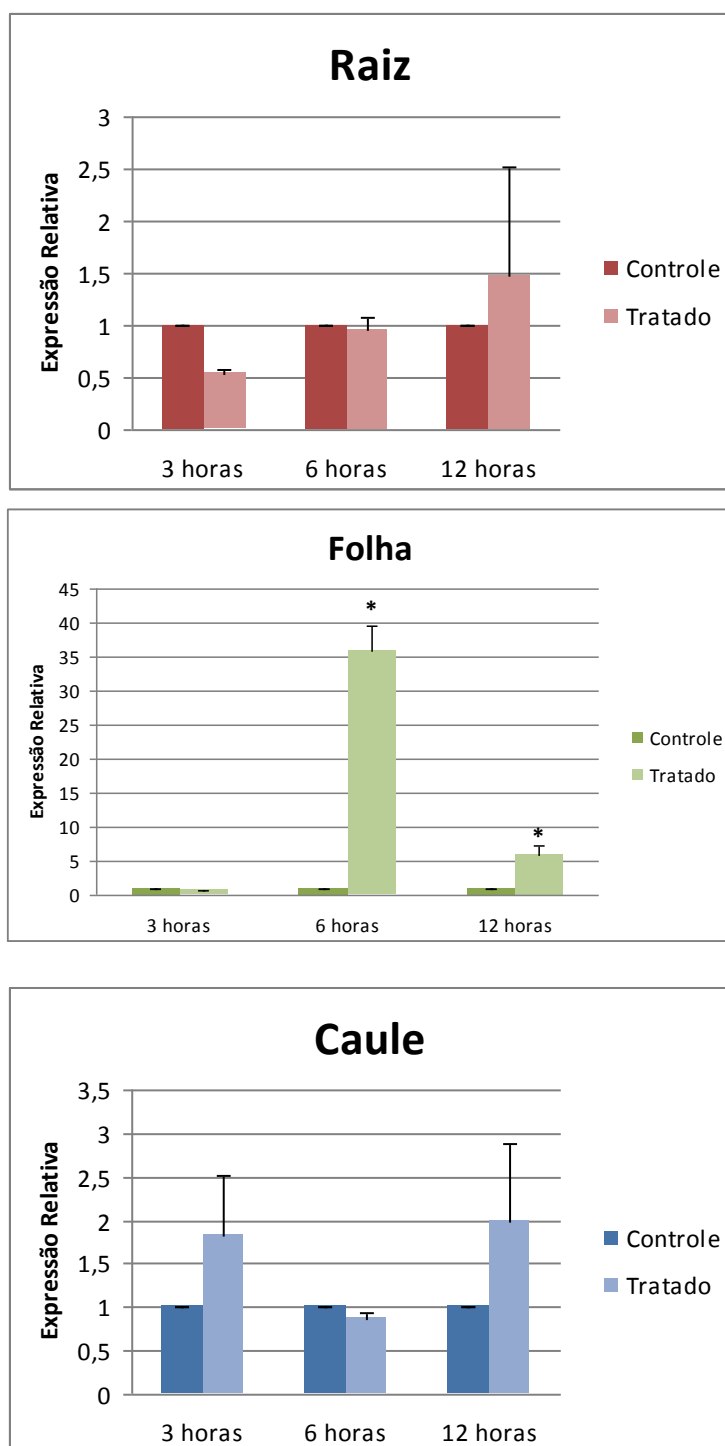
acúmulo de transcritos observada após 24 h. Já em raiz, o maior acúmulo de transcritos foi detectado após 12 h, porém este não foi considerado estatisticamente significativo. Em contrapartida, após 24 h, a expressão em raiz foi significativamente reprimida. De maneira geral, os resultados obtidos indicam que a expressão do gene *EgLac4* é modulada positivamente em resposta ao estresse oxidativo.



**Figura 5.** Expressão relativa do gene *EgLac4* em amostras de raiz, folha e caule de plântulas submetidas a estresse oxidativo. Controle = grupo tratado com solução de Triton-X 0,1% em H<sub>2</sub>O; 1 mM = grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM mais Triton-X 0,1%. As amostras foram coletadas a 12 e 24 h após a aplicação do estresse. Para efeito de cálculo, a expressão no grupo controle foi adotada como sendo igual a 1. (\*) corresponde a  $p < 0,05$ .

No que se refere ao estresse mecânico, embora alguma oscilação na expressão relativa do gene alvo em amostras tratadas de raiz e caule tenha sido observada (Figura 6), essa variação não se mostrou significativa em nenhum dos tempos de coleta analisados. Já em folhas, a expressão relativa do gene alvo foi altamente induzida após 6 h de realização da injúria quando comparada ao grupo controle não estressado. Após o referido pico de expressão, a expressão do gene alvo foi reduzida, mas ainda continuou elevada se comparada ao controle. Cabe ressaltar que em ambos os casos a aplicação do estresse ficou restrita à parte aérea das plântulas.

Os dados obtidos indicam que o gene *EgLac4* é responsivo aos estresses testados, sendo sua expressão modulada diferencialmente de acordo com o órgão/tecido analisado. Curiosamente, uma alta expressão deste gene foi observada em folhas estressadas. Resultados prévios demonstram que *EgLac4*, em condições normais, não apresenta expressão detectável em folha. A elevada expressão observada em folha em condição de estresse indica uma regulação específica deste gene neste órgão em condições de estresse. Cabe salientar que diferentes dados da literatura sugerem uma correlação positiva entre a expressão de genes envolvidos nas vias de lignificação e a indução de estresses abióticos. Liang *et al.* (2006), por exemplo, descrevem uma alta indução da expressão de uma lacase (*ZmLac1*) em raiz de milho submetida a estresse salino. Esse gene, por outro lado, não foi responsivo ao estresse osmótico. Adicionalmente, o padrão de expressão das lacases também está associado às condições nutricionais da planta, já que o enriquecimento com zinco eleva, por exemplo, os níveis de expressão do gene *AtLac7* em *A. thaliana* (van de MORTEL *et al.*, 2006).



**Figura 6.** Expressão relativa do gene *EgLac4* em amostras de raiz, caule e folha de plântulas submetidas a estresse mecânico. As amostras foram coletadas 3, 6 e 12 h após a aplicação do estresse. Para efeito de calculo, a expressão no grupo controle não tratado foi adotada como sendo igual a 1. (\*) corresponde a  $p < 0,05$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que o presente projeto permitiu identificar, no genoma de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), 35 sequências gênicas codificadoras de lacases e que, posteriormente, a análise filogenética das mesmas revelou a distribuição destas em seis diferentes subgrupos conforme já havia descrito na literatura para outras espécies vegetais.

Em paralelo, se observou padrões distintos de expressão tecido-específica para os 35 genes identificados com base em perfis transcritômicos de raiz, caule e folha, apontando expressão de lacases tecido-específicas ou tecido-enriquecidas e, ainda, lacases com expressão não detectável pela técnica. Dados estes curiosos que deverão ser investigados e validados futuramente.

Além disso, o gene *EgLac4* revelou-se ser responsivo aos estresses oxidativo e mecânico, especialmente em caule e folha.

No intuito de caracterizar molecularmente a família multigênica codificadora de lacases, o presente trabalho revelou-se satisfatório, contemplando dados de análise filogenética à dados de expressão relativa, nunca antes descritos para a espécie vegetal estudada. Resultados estes, além de curiosos, importantes e de grande potencial biotecnológico.

## 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).

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.

CAI, X.; DAVIS E. J.; BALLIF, J.; LIANG, M.; BUCHMAN, E.; HAROLDSSEN, V.; TORABINEJAD, J.; WU, Y. Mutant identification and characterization of laccase gene family in *Arabidopsis*, **J. Exp. Bot.**, 57, 2563 – 2569, 2006.

CHEN, E.L.; CHEN, Y. A.; CHEN, L. M.; LIU, Z. H. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. **Plant Physiol. Biochem.**, 40, 439–444, 2002.

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.**

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.

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**, 40, 23 -35, 1999.

LIANG, M.; HAROLDSEN, V.; CAI, X.; WU, Y.. Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. **Plant Cell Environ.**, 29, 746-753, 2006.

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.

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.** 110, 10848-10853, 2013.

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*, 221, 48-57, 2005.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da Lignificação de Células Xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, 11, 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 hyperaccumulator *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, 360–376, 2010,

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. S.; MARGIS, R.; FRAZZON, F.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. **Plant Cell Physiol.** 53, 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.**, 259, 485 -495, 1999.

RANOCHA, P.; CHABANNES, M.; CHAMAYOU, S.; DANOUN, S.; JAUNEAU, A.; BOUDET, A-M; GOFFNER, D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in Poplar. **Plant Physiol.**, 129, 144 -155, 2002.

RIBEIRO, C. L.; SASSAKI, F. T.; SOPRANO, A. S.; MAIA, I. G. Caracterization of a Promoter Root-Especific of *Eucalyptus*. In: **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.**, 9, 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.

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 Ex Maiden. **Revista Árvore**, 29, 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**, 7, 107 -114, 2001.

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.**, 22, 893-897, 2004.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system. **Appl. Environ. Microbiol.**, 78, 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 Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. **Plant Cell.**, 25, 3976-87, 2013.