



MARIELI ROSSATO

**IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DA FAMÍLIA *WRKY* E O
PERFIL DE EXPRESSÃO SOB DÉFICIT HÍDRICO E
MOLÉCULAS SINALIZADORAS EM *Eucalyptus***

**LAVRAS – MG
2019**

MARIELI ROSSATO

**IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DA FAMÍLIA WRKY E O PERFIL DE EXPRESSÃO
SOB DÉFICIT HÍDRICO E MOLÉCULAS SINALIZADORAS EM *Eucalyptus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rossato, Marieli.

Identificação genômica da família *WRKY* e o perfil de expressão sob déficit hídrico e moléculas sinalizadoras em *Eucalyptus* / Marieli Rossato. - 2019.

92 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. *Eucalyptus*. 2. Déficit hídrico. 3. Família *WRKY*. I. Vilela Paiva, Luciano. II. Título.

MARIELI ROSSATO

**IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DA FAMÍLIA WRKY E O PERFIL DE EXPRESSÃO
SOB DÉFICIT HÍDRICO E MOLÉCULAS SINALIZADORAS EM *Eucalyptus***

**GENOMIC IDENTIFICATION OF THE WRKY FAMILY AND THE EXPRESSION
PROFILE UNDER WATER DEFICIT AND SIGNALING MOLECULES IN
*Eucalyptus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia para obtenção do título de Doutora.

APOVADA em 04 de fevereiro de 2019
Dra. Letícia dos Anjos Silva – UFLA
Dr. Gilvano Ebling Brondani – UFLA
PhD Anderson Tadeu Silva – UNIVERSITY OF MISSOURI
PhD. Alan Carvalho Andrade – EMBRAPA CAFÉ

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Lavras – MG
2019

*Lenir, Liceu, Daniel e Pedro
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos disponibilizados para condução dos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela ajuda, puxões de orelha e, principalmente, pela confiança a mim depositada na execução deste trabalho.

Ao Dr. Alan Carvalho Andrade, pela disponibilização do laboratório.

Aos meus pais, Liceu e Lenir, e irmão Daniel, por ser meu suporte nesta caminhada.

Ao meu esposo Pedro, todos os meus agradecimentos. Em especial, um: por ser você.

À Natália e Thiago, pelos ensinamentos e ajuda na realização dos experimentos. Gratidão imensa a vocês.

À Vanessa Stein, pelas palavras de incentivo e amizade.

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM): Lara, Natália, Flávia, Fabiana, Claudiana, Tatiane, Fernanda, Kalinka, Débora, Gabriela, Kamila, Rafaeli, Luana, Ana Livia, Chaiane, Marlúcia, Leonardo, Farley, Thiago, Renan, Wesley e Guilherme.

Aos técnicos do LCBM, Ricardo, Heliete, Jussara e Fabrício. Também à Rossilvânia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal.

À Natália, Grazielle, Regina e Karina pela acolhida e amizade.

RESUMO

As espécies do gênero *Eucalyptus* ocupam a maior parte das plantações mundiais em áreas destinadas ao setor florestal. A alta produtividade e as perspectivas futuras indicam que o mercado mundial exigirá maior demanda por produtos de madeira, o que provavelmente não será fornecido nos próximos anos. Um dos problemas mais graves que afeta a produção final é a baixa disponibilidade hídrica de alguns locais. Destaca-se então, a necessidade de aumentar as áreas de produção e acelerar os programas de melhoramento florestal. Devido a isso, objetivou-se identificar a família dos fatores de transcrição *WRKY* em *E. grandis* através de análises de bioinformática e avaliar a expressão relativa via RT-qPCR a partir da aplicação de moléculas sinalizadoras e déficit hídrico em dois clones contrastantes ao déficit hídrico de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake a fim de indicar possíveis candidatos para a engenharia genética. Análises de bioinformática foram realizadas para identificar as sequências *WRKY*. A expressão relativa de alguns genes foi quantificada em experimento com diferentes moléculas sinalizadoras (MeJa, AS, ABA e H₂O₂) e exposição a PEG6000, mimetizando estresse hídrico. Foram identificados 74 genes putativos *WRKY* no genoma de *E. grandis* que foram classificados nos grupos I, II e III, e nas subdivisões do grupo II (II-a – IIe), distribuídos nos 11 cromossomos da espécie. Análises de sintênia apresentara 16 pares de parálogos em *E. grandis* e 23 pares de possíveis ortólogos com *Arabidopsis thaliana*, além de apresentarem 5 regiões com duplicação gênica em tandem. A análise de expressão gênica através de RT-qPCR indicou que há alteração nas respostas dos genes *EgrWRKY3*, *EgrWRKY11*, *EgrWRKY15*, *EgrWRKY20* e *EgrWRKY45* de acordo com a molécula sinalizadora utilizada. A expressão relativa dos mesmos genes também apresentou alterações após a imposição do déficit hídrico, apresentando uma maior expressão de *EgrWRKY3* e *11* no clone tolerante em algum momento da análise. Além disso, a análise de rede revelou que os genes Ecgr.J00502.1 e Ecgr.D01960.1 estão correlacionados com alguns *EgrWRKY* e os resultados da expressão gênica mostraram que Ecgr.J00502.1 pode estar relacionado com as respostas ao experimento com PEG6000. Juntos, esses achados podem contribuir para a seleção de potenciais genes candidatos para fins de engenharia genética envolvendo respostas de plantas ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Eucalipto. Estresse abiótico. Fator de transcrição *WRKY*. Perfil de expressão.

ABSTRACT

Eucalyptus species represent most of planted forests in worldwide forestry sector. The high productivity and future perspectives indicate that world market will require higher demand for wood products, which may probably not be supplied in the next coming years. One of the most serious problems affecting final production is the low water availability of some sites. That highlights the requirement for increasing production areas and to accelerate forest tree breeding programs. The aim of this work was to identify members of *WRKY* transcription factor family in *Eucalyptus grandis*, through bioinformatics analyzes, and analyze the relative expression via RT-qPCR, from the application of signaling molecules and water deficit, in two clones contrasting with the water deficit of *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake in order to indicate possible candidates for genetic engineering. Bioinformatics analyzes were performed to identify the *WRKY* sequences. The relative expression of some genes was quantified in experiment with different signaling molecules (MeJa, AS, ABA and H₂O₂) and exposure to PEG6000, mimicking water stress. We identified 74 putative *WRKY* genes in the genome of *E. grandis* that were classified in groups I, II and III, and in subdivisions of group II (II-a-IIe), distributed across its 11 chromosomes. Synteny analysis exhibited 16 paralogs in *E. grandis* and 23 orthologs with *Arabidopsis thaliana*, besides presenting 5 regions with tandem gene duplication. Analysis of gene expression by RT-qPCR show changes in expression for *EgrWRKY3*, *EgrWRKY11*, *EgrWRKY15*, *EgrWRKY20* e *EgrWRKY45* in response to signaling molecules used. The relative expression of the same genes also presented changes after the imposition of the water deficit, presenting higher expression of *EgrWRKY3* and *11* in the tolerant clone at some point in the analysis. Furthermore, network analysis revealed that genes Ecgr.J00502.1 and Ecgr.D01960.1 are correlated with some *EgrWRKYs* and their gene expression results showed Ecgr.J00502.1 may be related to the responses to the experiment with PEG6000. Taken together, these findings may contribute to selection of potential candidate genes for genetic engineering purposes involving plant responses to water deficit.

Keywords: *Eucalyptus*. Abiotic stress. *WRKY* transcription factor. Gene expression profile.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância econômica	14
2.2	Alterações provocadas pelo déficit hídrico no eucalipto	16
2.3	Fatores de transcrição <i>WRKY</i>	20
3	METODOLOGIA	24
3.1	Identificação de proteínas <i>WRKY</i>	24
3.2	Classificação dos genes <i>EcgWRKY</i> e localização cromossômica	24
3.3	Identificação de motivos conservados em proteínas <i>EcgWRKY</i>	24
3.4	Alinhamento de sequências e análise filogenética	25
3.5	Análise de sintênia	25
3.6	Escolha dos genes avaliados	25
3.7	Desenho dos primers	26
3.8	Material vegetal	27
3.9	Experimento com moléculas sinalizadoras	27
3.10	Experimento de déficit hídrico	28
3.11	Extração de RNA total e síntese de cDNA	28
3.12	RT-qPCR	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Identificação da família de genes <i>WRKY</i> em eucalipto e classificação das sequências	30
4.2	Análise filogenética, identificação dos motivos conservados em proteínas <i>EgrWRKY</i> e localização cromossômica	35
4.3	Estudo de sintênia e duplicação dos genes <i>WRKY</i> em <i>E. grandis</i>	38
4.4	Expressão relativa responsiva a moléculas sinalizadoras e déficit hídrico	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A – Sequências caracterizadas de <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Populus</i> sp. utilizadas na construção da árvore filogenética (Continua).	81
	APÊNDICE B – Perfil de expressão dos fatores de transcrição <i>EgrWRKY</i> em RNA-seq realizado em experimento de déficit hídrico em plântulas de três clones de <i>E.</i>	

<i>camaldulensis</i> (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012). P – Petford de trópicos húmidos; K – Katherine de trópicos secos; e M – Mt.Isa de trópicos semi-áridos. Controles coletados no início do déficit hídrico e Estresse coletados após 60 dias do mesmo estresse. Valores normalizados por Log2.....	83
APÊNDICE C – Redes de co-expressão dos FTs <i>WRKY</i> . Cutoff utilizado $\geq 0,9$ (A) e $\geq 0,8$ (B). Linha contínua vermelha – correlação negativa. Linha contínua cinza – correlação positiva.....	84
APÊNDICE D – Informações gerais dos <i>primers</i> utilizados na análise de RT-qPCR	85
APÊNDICE E – Comparação das sequências putativas de aminoácidos dos <i>EgrWRKY</i> através de alinhamento pelo algoritmo <i>ClustalW</i> no programa MEGAX e organização das sequências com auxílio do Programa GeneDoc. Sequências separadas conforme distribuição dos grupos filogenéticos. Barra – indica o domínio WRKYGQK; Setas – indicam os aminoácidos presentes no domínio <i>zinc-finger like</i>	86
APÊNDICE F – Identificação dos motivos encontrados nas 74 sequências de <i>EgrWRKY</i> através da plataforma <i>SALAD database</i>	87
APÊNDICE G – Identificação do domínio conservado de Eucgr.C01940.1 e alinhamento com <i>EgrWRKY14</i> . A – Falta do domínio WRKYGQK presente em proteínas que codificam o fator de transcrição <i>WRKY</i> . B – Alinhamento das sequências	88
APÊNDICE H – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.k01169.1	89
APÊNDICE I – Imagem ilustrativa das plantas utilizadas durante o experimento de déficit hídrico com PEG6000. VM1 (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R, U e V) VM5 (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W e X). Tempos: 1h (A, B, C e D), 3h (E, F, G e H), 6h (I, J, K e L), 12h (M, N, O e P), 24h (Q, R, S e T) e 48h (U, V, W e X). Barra: 1 cm	90
APÊNDICE J – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.J00502.1.....	91
APÊNDICE L – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.D01960.1.....	92

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal totaliza cerca de 7,84 milhões de hectares de árvores plantadas no Brasil, sendo responsável por 91% da madeira produzida para fins industriais. Dessa forma contribui com o aumento do Produto Interno Bruto (PIB) do país e proporciona um crescimento da economia verde (IBÁ, 2017). As espécies do gênero *Eucalyptus* são responsáveis por ocupar cerca de 73% do total plantado no Brasil, que é destinada a empresas do setor de celulose, produção de papel, carvão vegetal, fabricação de móveis, biomassa e produção de óleos essenciais para uso farmacológico. O destaque do eucalipto frente a outras espécies florestais deve-se a sua capacidade de adaptação, rápido crescimento, alta produtividade e facilidade no manejo (SIMETTI et al., 2018).

Apesar da alta produtividade, a demanda que será exigida pelo mercado mundial nos próximos anos não será suprida, tornando-se necessário aumentar a área plantada em todos os estados (BAESSO; RIBEIRO; SILVA, 2010; TORRES et al., 2016). As empresas do setor florestal têm incentivado e financiado a implementação de florestas plantadas em áreas que estão sujeitas a déficit hídrico, aumentando a necessidade de materiais genéticos com maior tolerância a estas condições (ABRAF, 2011; OTTO et al., 2013).

O déficit hídrico é um dos principais fatores que impede uma maior produtividade das espécies de eucalipto e seus efeitos serão sentidos em maior intensidade ao longo do tempo. A disponibilidade hídrica limitada e irregular induz diferentes cascatas de respostas a nível fisiológico, bioquímico e molecular que possuem papel importante no intuito de mitigar esse estresse e manter a função celular (BHARGAVA; SAWANT, 2013; REIS et al., 2006).

Os diferentes genótipos de eucalipto apresentam inúmeras adaptações morfofisiológicas que contribuem para a tolerância ao déficit hídrico, como área foliar reduzida, regulação do fechamento estomático, ajuste osmótico, alteração nas concentrações de osmólitos, mecanismo antioxidante, mudanças na alocação de biomassa e reforço da parede celular (ARNDT et al., 2008; GUARNASCHELLI et al., 2003; HODECKER et al., 2018; MASEDA; FERNÁNDEZ, 2015; MCKIERNAN et al., 2017; MOKOTEDI, 2010; SHVALEVA et al., 2006). Mesmo com uma compreensão avançada sobre as respostas fisiológicas, pouco se sabe sobre as respostas apresentadas a nível molecular. Os dados gerados a partir de análises de transcriptoma e proteômica de diferentes espécies identificaram genes conservados com respostas funcionais ou de regulação, bem como específicos da espécie, que são regulados positiva ou negativamente durante o processo de déficit hídrico (OSAKABE et al., 2014).

Esses genes em condições de estresse osmótico, como a seca, são regulados e a ativação das cascatas de respostas são realizadas por duas vias, ABA-dependente ou ABA-independente. O déficit hídrico ocasiona um acúmulo de ABA que, posteriormente, desencadeia os mecanismos de resposta por meio de vários genes responsivos a este hormônio, ocasionando alterações fisiológicas, como fechamento estomático e síntese de osmoprotetores (AKPINAR et al., 2012). Durante a resposta ABA-dependente, o fator de ligação ABRE (*AREB/ABF*) identifica a sequência conservada no elemento de ação *cis* presente nos genes de resposta a déficit hídrico. Na atuação da rota ABA-independente, o fator de transcrição (FT) *DREB2A* (*DRE/CRT*) identifica sequências DRE presente nos promotores ativando a transcrição dos genes responsivos a estresse osmótico (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

Os mecanismos de respostas aos estresses são conservados no reino vegetal, apresentando diferenças sutis entre espécies e também genótipos, que afetam, ao final, a intensidade da resposta. Os dados gerados a partir do genoma do *Eucalyptus grandis* e dados de RNA-seq em déficit hídrico oferecem uma alternativa para a compreensão das respostas do eucalipto nessas condições ambientais (MYBURG et al., 2014; THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; VILLAR et al., 2011). Conhecer e identificar os fatores de transcrição (FTs) envolvidos na regulação da expressão gênica durante o processo de estresse têm sido um dos focos da engenharia genética.

Os FTs *WRKY*, já identificados em plantas, participam de diversos processos envolvidos no desenvolvimento vegetal, como germinação de sementes, amadurecimento de frutos, formação de raízes, tempo de floração, entre outros (YANG et al., 2018). No entanto, suas funções destacam-se pelo envolvimento na regulação da expressão gênica responsiva a estresses. Várias proteínas *WRKY* estão envolvidas na defesa contra ataques de vírus, fungos e bactérias patogênicas, mas também a estresse térmico, deficiência de nutrientes, estresse salino, frio, UV-B e déficit hídrico (WAN et al., 2018; ZHANG; WANG, 2005) .

Os *WRKYs* representam um dos principais centros de sinalização da maquinaria genética das plantas em resposta a diferentes estímulos. Devido a isso, é de suma importância identificar essa família em diferentes espécies, inclusive no eucalipto. Devido ao exposto, objetivou-se identificar a família gênica *WRKY* no genoma de *E. grandis* com abordagens de bioinformática, estudando as relações filogenéticas, o padrão de distribuição no genoma, presença de parálogos, eventos de duplicação e possíveis ortólogos com *A. thaliana*. Junto a isso, determinou-se o perfil de expressão via RT-qPCR de alguns *WRKY* submetidos a aplicação de moléculas

sinalizadoras e resposta a déficit hídrico em híbridos contrastantes de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus* e sua importância econômica

O termo florestas plantadas é definido como florestas constituídas predominantemente por árvores estabelecidas, por meio de plantio ou semeadura, de espécies nativas ou introduzidas (FAO, 2010). Estas florestas estão se tornando cada vez mais importantes no cenário global, não somente pelo fornecimento de madeira e energia, mas também por atender uma série de benefícios sociais e ambientais (BARAL; GUARIGUATA; KEENAN, 2016; PAYN et al., 2015). Atualmente, tornou-se reconhecido que políticas visando somente a agricultura e o uso da madeira proporcionam benefícios mais baixos em relação às políticas que visam os serviços ecossistêmicos (BATEMAN et al., 2013; PAYN et al., 2015). Dados recentes demonstram uma redução na utilização de recursos gerados a partir de florestas naturais em todo o mundo, ocasionando benefícios ecológicos significativos (BUONGIORNO; ZHU, 2014). Mesmo com o avanço neste cenário, as florestas plantadas são, e continuarão sendo, uma fonte essencial de biomassa para atividades industriais (PAYN et al., 2015).

As áreas de florestas plantadas no mundo têm aumentado cerca de 4,63 milhões de hectares por ano, onde a maioria (76%) é utilizada para a produção florestal (OLIVEIRA et al., 2016). Deste total, o Brasil coopera com 2,67% de plantações florestais, sendo este setor responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais, contribuindo com 6,2% do PIB Industrial no País (IBÁ, 2017; OLIVEIRA et al., 2016). Mesmo com o cenário macroeconômico adverso nos últimos anos, a produção de celulose cresceu 8,1% em 2016, alcançando a segunda posição entre os maiores produtores desta commodity (IBÁ, 2017). O setor de papel fabricado subiu para oitavo lugar no ranking dos maiores produtores de papel, mesmo com o volume fabricado ficando estável em relação ao ano anterior (IBÁ, 2017).

Em 2016, o Brasil apresentou aumento de 0,5% em árvores plantadas, totalizando cerca de 7,84 milhões de hectares. O aumento é decorrente, exclusivamente, do crescimento de áreas plantadas com eucalipto, que ocupa cerca de 73% das plantações, localizadas, principalmente, em Minas Gerais, São Paulo e no Mato Grosso do Sul, com uma porcentagem de plantios de 24%, 17% e 15%, respectivamente (IBÁ, 2017).

O *Eucalyptus* é um gênero que pertence à família Myrtaceae que compreende cerca de 700 espécies, além de muitas variedades e alguns híbridos (LONGUE JÚNIOR; COLODETTE, 2013). Nativo da Austrália e ilhas adjacentes, este gênero passou a ser amplamente cultivado

na América do Sul, Ásia e Europa, entre outras regiões, devido ao fato de apresentarem grande adaptabilidade em diversas regiões tropicais e subtropicais (CASTRO et al., 2016; DE LA TORRE et al., 2014; MORA; GARCIA, 2000).

O eucalipto destaca-se entre os gêneros mais cultivados para a indústria devido a produção de fibras curtas que é requerida, principalmente, pelo mercado de produção de papeis e móveis, devido a suavidade, brilho e a baixa resistência à tração de suas fibras (GIRIJASHANKAR, 2011; HART; SANTOS, 2015). Junta-se a estas características o seu rápido crescimento e alta produtividade, além de apresentar homogeneidade quando clonado, sendo uma alternativa altamente viável ao uso da madeira nativa (RAMOS et al., 2011; SIMETTI et al., 2018).

O eucalipto cultivado no Brasil é utilizado na produção de carvão vegetal, biomassa, fabricação de móveis, chapas, lâminas e compensados, construção civil e na produção de óleos essenciais para usos farmacológicos (LONGUE JÚNIOR; COLODETTE, 2013; SILVA, 2009; UHLIG; GOLDEMBERG; COELHO, 2008). Dentre suas utilidades, a produção de papel e celulose apresenta-se como a maior demanda de madeira *in natura*, considerando que 34% do total de 7,84 milhões de hectares de árvores plantadas no Brasil pertencem às empresas deste segmento (MENDES; TREICHEL; BELING, 2016).

A indústria brasileira do setor florestal é reconhecida pela alta produtividade de suas áreas (volume de madeira produzida por unidade de área ao ano) e por apresentar a menor rotação do mundo (tempo do plantio até a colheita) (IBÁ, 2017). O país lidera o ranking com uma média de 35,7 m³/há/ano para os plantios de eucalipto, mas a produtividade pode chegar até a 60 m³/há/ano em alguns sítios (MENDES; TREICHEL; BELING, 2016).

Apesar das plantações florestais estarem aumentando, a oferta da madeira não está atendendo a demanda, existindo a necessidade de aumentar a área plantada em todos os estados (BAESSO; RIBEIRO; SILVA, 2010; TORRES et al., 2016). Modelos aplicados pela *WWF's New Generation Plantations* e *International Institute for Applied Systems Analysis* tem sugerido que a taxa de aumento destas florestas deve ser de 2,4% a cada cinco anos. Porém, no levantamento realizado entre 2010-2015, esse aumento foi de apenas 1,2% um resultado insuficiente para atender as demandas futuras e fornecer toda a madeira e fibras para o mundo (PAYN et al., 2015). Para melhorar esse quadro, o setor florestal espera a curto e médio prazo aumentar as áreas de plantio, consolidar novas fronteiras florestais, substituir parte da plantação de pinus por eucalipto nas regiões já utilizadas e desenvolver novos mercados (bio-refinarias e bioenergia) (ABRAF, 2012; GONÇALVES et al., 2013).

Os preços de terras em mercados consolidados (São Paulo, Paraná e Santa Catarina) têm

influenciado grandes empresas produtoras de celulose e painéis de madeira a incentivar e financiar os plantios de eucalipto em estados como o Maranhão, Piauí, Tocantins e Pará. Estes plantios estão sendo realizados em áreas sujeitas a déficit hídrico, aumentando a necessidade de materiais genéticos com maior tolerância às condições adversas de crescimento (ABRAF, 2011; OTTO et al., 2013).

Nota-se, neste caso, uma necessidade de realização de pesquisas que visem identificar os mecanismos de tolerância a seca neste gênero, visando aumentar a produtividade em regiões tradicionais, que possa vir a sofrer com períodos de restrição hídrica, e, principalmente, para a adaptação as regiões que já são conhecidas por sofrer com estes problemas (MATOS et al., 2016).

O melhoramento genético clássico tem contribuído muito com a silvicultura a fim de obter progênies com maior incremento no crescimento, produtividade, alterações das propriedades químicas e físicas da madeira, resistência a doenças e a tolerância a estresses abióticos, como seca e salinidade. Apesar disso, algumas limitações, como o longo ciclo para que as plantas atinjam a maturidade reprodutiva e fenotípica, tem dificultado a obtenção de genótipos mais produtivos (GOLLE et al., 2009).

As técnicas biotecnológicas, acrescentadas ao melhoramento genético convencional, permitem ao final, a obtenção de genótipos desejáveis. Dentre essas técnicas, a transformação genética, que consiste a introdução de um gene ou fragmento de DNA no genoma de uma célula receptora, vem se destacando em virtude de apresentar uma melhor qualidade final dos produtos. Isso deve-se a uma maior homogeneidade e direcionamento das propriedades da matéria prima, fatores altamente desejáveis para as indústrias do setor florestal (DIOUF, 2003; SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008). Porém, para se obter sucesso durante este processo de transformação, é necessário o conhecimento dos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares da resposta as condições adversas.

2.2 Alterações provocadas pelo déficit hídrico no eucalipto

O solo e o clima brasileiro foram essenciais para a grande capacidade de adaptação do eucalipto, tornando-se a principal espécie florestal utilizada no país (MENDES; TREICHEL; BELING, 2016). No entanto, a avaliação das áreas de cultivo e a redução das áreas disponíveis onde o clima é ideal, levaram as plantações de eucalipto para áreas marginais, como regiões que possuem baixa disponibilidade hídrica e baixa fertilidade do solo (MATOS et al., 2016). Entre os recursos necessários para uma alta produtividade, a água é o mais necessário e o mais

limitante, tornando-se importante conhecer os processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares do eucalipto sob diferentes condições hídricas (MATOS et al., 2016; OTTO et al., 2017). Com esses conhecimentos, é possível fazer uma definição dos grupos de clones e suas respostas climáticas para um melhor gerenciamento específico do local ao qual será inserido (SCOLFORO et al., 2017).

As alterações provocadas na planta pelo déficit hídrico dependem diretamente da taxa e intensidade do estresse, que levará inicialmente a um processo de aclimatização, e após a intensificação do estresse, a danos funcionais e deterioração da estrutura da planta (CORREIA et al., 2014). As adaptações fisiológicas e químicas, por tolerância ou evitação, como desequilíbrios redox nas reações fotossintéticas ou dissipação da temperatura nas folhas das plantas, servem para manter a função celular (SPOKEVICIUS et al., 2017).

A seca, termo meteorológico utilizado para definir uma interação combinada entre baixa precipitação, ventos secos, redução da disponibilidade de água no solo e altas temperaturas (SINGH; LAXMI, 2015), causa efeitos complexos nas plantas, visto que elas apresentam mecanismos diferentes de adaptação (FERNANDES; CAIRO; NOVAES, 2015). O fechamento estomático, onde as células-guarda recebem mensagens hidráulicas e químicas, no caso do hormônio ácido abscísico (ABA), possui o intuito de evitar a perda de água pela folha (TARDIEU, 2013). No entanto, este processo acaba aumentando a temperatura foliar e reduzindo a taxa fotossintética, afetando diretamente na produtividade das culturas (OSAKABE et al., 2014; PANTIN et al., 2013; TARDIEU, 2013). Com o fechamento estomático e baixa disponibilidade de água, ocorre redução do crescimento do tecido vegetal em expansão devido ao turgor da célula que fica reduzido, mas também devido à baixa taxa de divisão celular e extensibilidade das paredes (COSGROVE, 2005; TARDIEU, 2013). Em estresse prolongado, ocorre o adiantamento do ciclo da colheita, acelerado pelo processo de senescência (TARDIEU, 2013). No caso do eucalipto, o processo de senescência e morte da planta ocorre principalmente no estágio de muda. Este é o momento chave no ciclo de vida de espécies arbóreas, pois possuem sistema radicular pouco desenvolvido, o que limita o acesso à água em lugares mais profundos (SLOT; POORTER, 2007).

Vários fatores morfofisiológicos contribuem para o processo de tolerância ao déficit hídrico nas espécies de eucalipto, como área foliar reduzida (BATTAGLIA; CHERRY, 1998; GUARNASCHELLI et al., 2003; MOKOTEDI, 2010), regulação do fechamento estomático (ARNDT et al., 2008; MACFARLANE; WHITE; ADAMS, 2004; MCKIERNAN et al., 2017; WHITE et al., 2003), ajuste osmótico (ARNDT et al., 2008; LEMCOFF et al., 2002), alterações nas concentrações de osmólitos (ARNDT et al., 2008; MERCHANT et al., 2006; WARREN;

ARANDA; CANO, 2012), mecanismos antioxidantes (SHVALEVA et al., 2006), mudanças na alocação de biomassa (COSTA E SILVA et al., 2004; LI; WANG, 2003; MASEDA; FERNÁNDEZ, 2015) e reforço da parede celular (GUARNASCHELLI et al., 2003).

As respostas moleculares ao estresse hídrico não são totalmente compreendidas como as explanadas anteriormente, pois envolve processos complexos com muitos genes e vias de sinalização (FANG; XIONG, 2015). No entanto, compreender estes mecanismos é imprescindível para entender melhor o processo de tolerância ao déficit hídrico (NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2014). Estudos com análises transcriptômicas e proteômicas identificaram genes conservados com respostas funcionais ou de regulação, bem como sequências espécie específica com alta similaridade entre diferentes organismos, como proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), chaperonas, biossíntese de osmoprotetores entre outros (OSAKABE et al., 2014).

Inúmeros genes são induzidos e atuam na resposta ao processo de estresse e, sob estresse osmótico, uma resposta inicial é o acúmulo de ABA (FINKELSTEIN, 2013; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Esse hormônio é sintetizado, principalmente, em tecidos radiculares e chega até a parte aérea via xilema (DAVIES; ZHANG, 1991). Nas células alvo, o ABA liga-se ao complexo receptor *PYR/PYL/RCAR* [*PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1)/ PYR1-LIKE (PYL)/ REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (RCAR)*] e este complexo interage e inibe as proteínas fosfatase tipo 2C do grupo A (*PP2Cs*), que atuam como reguladores negativos da sinalização induzida por ABA (ZHANG et al., 2017b). Na ausência de ABA, a rota está inibida devido a desfosforilação das proteínas *SnRK2s* (*SNF1 – related protein kinase 2*) por *PP2Cs* (JOSHI et al., 2016). Após a formação do complexo *PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C*, os *PP2Cs* se desvinculam da proteína *SnRK2*, ativando a cascata responsiva ABA-dependente (ZHANG et al., 2017b).

SnRK2 é responsável por fosforilar e modular FTs, como o fator de ligação com o motivo ABRE (*AREB/ABF*) que, estruturalmente, possui quatro locais de fosforilação por *SnRK2* que regulam a expressão gênica responsiva a ABA (FUJITA; YOSHIDA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012). O ABRE identifica uma sequência conservada (ACGTGG/TC) presente nos promotores dos genes de resposta ao déficit hídrico (JOSHI et al., 2016).

O processo de desidratação também ativa uma rota ABA-independente onde FTs identificam na grande parte a sequência DRE (*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT – TACCGACAT*) presente na sequencia promotora de genes induzidos por desidratação (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013). O FT *DREB2A* é o gene chave na expressão

gênica não induzida por ABA (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Em condições normais, ele é responsável por induzir a expressão de inúmeros genes que codificam proteínas responsivas ao processo de estresse causando assim, consequências adversas ao crescimento das plantas (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Devido a este processo, ele é fortemente regulado por *GRF7* (*GROWTH-REGULATING FACTOR7*), um repressor de genes responsivos ao estresse osmótico (KIM et al., 2012). Outra via de inibição da ação do *DREB2A* é a sua degradação pela via ubiquitina-proteossoma. A proteína *DRIP1* (*DREB2A-INTERACTING PROTEIN1*) e seu homólogo *DRIP2* regulam negativamente a expressão responsiva ao déficit hídrico, devido a uma ubiquitina E3 ligase que possui um domínio RING de interação com *DREB2A*. Apesar da presença de mRNA de *DREB2A* em condições normais de crescimento, *DRIP1* e *DRIP2* direcionam essa molécula a proteólise pelo proteossoma 26S (QIN et al., 2008). Entretanto, acredita-se que a sua degradação e ativação pode ser regulada por proteínas ainda não identificadas (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

A rede transcricional em resposta ao estresse osmótico é, de forma cooperativa, regulada pelas vias ABA-dependente e independente, porém o conhecimento sobre essa interação ainda é limitado (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). A subclasse III de *SnRK2* deve ser o ponto central desse *crosstalk* devido ao fato de que esta quinase pode regular a expressão de *AREB/ABF* e *DREB2A* (SINGH; LAXMI, 2015; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

Apesar da compreensão das respostas moleculares de forma geral nas plantas, pouco se sabe sobre as bases moleculares destas características em eucalipto, sendo um ponto chave para melhorar a tolerância de espécies de interesse ao déficit hídrico via engenharia genética (SPOKEVICIUS et al., 2017). A superexpressão de uma pirofosfatase vacuolar tipo I (*EVPI*), que transporta H^+ através da membrana vacuolar, isolada de *E. globulus* em *Arabidopsis thaliana* resultou em um aumento da tolerância à seca e ao sal em mutantes, apresentando maior quantidade de pelos radiculares nas raízes (GAMBOA et al., 2013). Outros genes regulados pelo déficit hídrico tem sido identificados através de análises de bioinformática e expressão gênica, como por exemplo *AP2/ERF* (CAO et al., 2015), desidrina (*DHN*) (FERNÁNDEZ et al., 2012; NAZ et al., 2015), *C2H2-type zinc finger* (*ZFP*) (WANG et al., 2014b), *calcium-dependent protein kinase* (*CPK*), *DRE-binding protein 2* (*DREB2*), *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3* (*NCED3*) e *pyrabactin resistance1* (*PYR1*) (MARTINS et al., 2018).

A publicação do genoma de *Eucalyptus grandis* (MYBURG et al., 2014) e de dados de RNA-seq em déficit hídrico (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; VILLAR et al.,

2011) ofereceram os primeiros passos para a compreensão das respostas do eucalipto às alterações ambientais (SPOKEVICIUS et al., 2017). Os FTs tem sido um dos principais focos da engenharia genética quando se visa a tolerância ao déficit hídrico. As famílias gênicas de *AP2/ERF*, *NAC*, *MYB*, *MYC* e *bZIP* já são conhecidas por estarem intimamente envolvidas na regulação da expressão gênica responsiva ao déficit hídrico, sendo que as famílias *AP2/ERF* (CAO et al., 2015), *NAC* (HUSSEY et al., 2015) e *MYB* (SOLER et al., 2015) já foram identificadas no genoma de *E. grandis*. A família de FT *WRKY* tem se destacado por participar diretamente nas respostas a estresses bióticos em plantas (BAKSHI; OELMÜLLER, 2014; RUSHTON et al., 2010). Porém, estudos mais recentes têm revelado sua importância durante as respostas de estresse abiótico, incluindo déficit hídrico (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2015; JIANG et al., 2017a; LI et al., 2017a).

2.3 Fatores de transcrição *WRKY*

As proteínas *WRKY* foram identificadas como uma das 10 maiores famílias de FTs presente em plantas (SINGH; FOLEY; OÑATE-SÁNCHEZ, 2002), que possuem em sua estrutura um ou dois domínios altamente conservados de um heptapeptídeo *WRKYGQK* dentro de uma região conservada com cerca de 60 aminoácidos e um motivo de *zinc-finger like* C_2H_2 (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H) ou C_2HC (C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C) (C – cisteína; H – histidina; e X – qualquer aminoácido) (EULGEM et al., 2000). De acordo com a semelhança na sequência e nas relações filogenéticas, os FT *WRKY* são divididos em três grupos: I, II e III, sendo o grupo II subdividido em IIa, IIb, IIc, IId e IIe (EULGEM et al., 2000). As proteínas do grupo I possuem dois domínios *WRKY*, um na região N-terminal e outro na região C-terminal, com um *zinc-finger like* C_2H_2 cada; as proteínas do grupo II e grupo III possuem somente um domínio *WRKY* na região N-terminal, mas diferem pelo *zinc-finger like* presente nas sequências: no grupo II é o C_2H_2 e no grupo III, C_2HC (EULGEM et al., 2000; ZHANG; WANG, 2005). A sequência do domínio *WRKY* dos grupos II e III são mais semelhantes a C-terminal do domínio presente no grupo I, indicando que estes três grupos compartilham o principal domínio de ligação ao DNA e o domínio presente em N-terminal do grupo I aumenta a afinidade com o gene alvo (MOHANTA; PARK; BAE, 2016). Ainda sobre sua estrutura, é possível identificar que em algumas proteínas desta família, a sequência de aminoácidos *WRKY* são substituídas por *WRRY*, *WSKY*, *WVKY* ou *WKKY* (RUSHTON et al., 2010; XIE et al., 2005).

Durante o processo de regulação gênica, o domínio conservado *WRKY* é responsável pela ligação à *W-box* (TTGACC/T) no elemento de ligação *cis* do gene alvo (EULGEM et al.,

2000). Porém, além da ligação a *W-Box*, *WRKY* pode ligar-se ao sítio SURE (responsivo ao açúcar – TAAAGATTACTAATAGGAA) (SUN et al., 2003) e a PRE4 (responsivo a agente patogênico – TGCGCTT) (CAI et al., 2008). No entanto, a ligação a *W-box* é indispensável para a atuação das proteínas *WRKY* e, mesmo sendo essencial, para que o FT identifique o promotor alvo, as sequências adjacentes também determinam parcialmente a especificidade ao local de ligação (CIOLKOWSKI et al., 2008; RUSHTON et al., 2010).

Após a identificação destes FTs, inúmeros estudos estabeleceram os diferentes processos aos quais essas proteínas estão envolvidas, como por exemplo, germinação de sementes (DUAN et al., 2018; JIANG; YU, 2009; LUO et al., 2013; SCARPECI et al., 2013), floração (LI; WANG; YU, 2016), amadurecimento de frutos (WANG et al., 2017b), formação de raízes (GRUNEWALD et al., 2012; SONG; JING; YU, 2010; SUTTIPANTA et al., 2011; ZHANG; PENG; GUO, 2008), senescência foliar (HAN et al., 2014; JING et al., 2009; LI et al., 2017b), biossíntese de antocianinas (DUAN et al., 2018) e metabólitos secundários (AMATO et al., 2017; SINGH et al., 2017).

No entanto, os *WRKY* são notavelmente conhecidos pela atuação na regulação de processos desencadeados por estresse, principalmente bióticos. Os trabalhos relatam atuação positiva no processo de resistência a patógenos necrotróficos (KARIM et al., 2015; LAI et al., 2008) e biotróficos (DUAN et al., 2015), regulação negativa (KIM et al., 2008; KIM; FAN; CHEN, 2006; XING et al., 2008) ou positiva (LI et al., 2010; PENG et al., 2012; ROBATZEK; SOMSSICH, 2002) de genes relacionados a patogênese (PRs) e expressão desencadeada por hormônios como ácido salicílico (AS) (ATAMIAN; EULGEM; KALOSHIAN, 2012; SHIMONO et al., 2007; WANG et al., 2017a) e ácido jasmônico (AJ) (KLOTH et al., 2016; WANG et al., 2017a, 2012) durante a resposta a estresse biótico.

Em comparação ao progresso nas pesquisas relacionados a estresses bióticos, os estudos das suas funções no estresse abiótico são menos conhecidas (HE et al., 2016a). Os dados gerados até o momento demonstram que esses FTs estão intimamente relacionados com as respostas geradas ao estresse térmico (LI et al., 2010, 2011), deficiência de nutrientes (DAI; WANG; ZHANG, 2016; WANG et al., 2014a), estresse salino (HU et al., 2013; JIANG; DEYHOLOS, 2009; SCARPECI et al., 2013), estresse por frio (GEILEN et al., 2017; ZHOU et al., 2008) e UV-B (WANG et al., 2007).

Além dos estresses colocados acima, os *WRKY* estão envolvidos na regulação positiva e negativa geradas a partir do déficit hídrico. A superexpressão de *SIWRKY39* aumentou a resistência a seca, aumentando o acúmulo de prolina e diminuindo os teores de dialdeído malônico (MDA), ocasionando uma proteção celular maior em plantas transgênicas de tomate

(SUN et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos em tabaco superexpressando *TaWRKY44*, que resultaram também em uma maior teor relativo de água (RWC), açúcares solúveis, e maior atividade antioxidante, com alta atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (APX) (WANG et al., 2015). *OsWRKY11* atua diretamente na expressão de genes responsivos a seca, como as desidrinas *RAB21*, *DH1* e *DIP1*. Linhagens *knockout* foram prejudicadas durante o processo de seca e apresentaram baixa expressão destes genes (LEE et al., 2018). As plantas que superexpressaram *AtWRKY57* apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico devido a menor perda de água e maior acúmulo de ABA. Esse FT regula positivamente *RD29A*, gene induzido por estresse abiótico e que atua na sinalização a jusante dos FTs *WRKY*, *NCED3* e *ABA3*, atuantes na biossíntese de ABA (JIANG; LIANG; YU, 2012). No entanto, dados de superexpressão de *AtWRKY53* mostraram plantas hipersensíveis a seca, indicando que o fechamento estomático foi prejudicado nesta linhagem pela redução no conteúdo de H₂O₂ e que a facilidade da abertura estomática foi promovida pela degradação do amido nas células guarda (SUN; YU, 2015).

Papeis importantes dos FTs *WRKY* foram identificados na sinalização de ABA. Em linhagens *knockout* de *AtWRKY40* ou *AtWRKY40/AtWRKY18* alteraram a expressão de um grande número de genes que atuam na resposta a ABA, como *ABF4*, *AB11*, *AB12*, *AB14*, *AB15*, *DREB1A*, *DREB2A*, *MYB2*, *PYL2/RCAR13*, *PYL2/RCAR11*, *RAB18*, *PYL2/RCAR9*, *PYL2/RCAR7*, *SnRK2.2* e *SnRK2.3*, indicando que atuam em respostas primárias a sinalização de ABA (RUSHTON et al., 2012; SHANG et al., 2010).

Os estudos têm demonstrado que os *WRKY* representam um dos principais centros de sinalização da maquinaria genética das plantas em resposta a múltiplos estímulos, incluindo estresse biótico e abiótico (RUSHTON et al., 2012). Os FT *WRKY* foram identificados em mais de 30 espécies, incluindo *A. thaliana* (DONG; CHEN; CHEN, 2003), *Coffea arabica* L. (RAMIRO et al., 2010), *Zea mays* (WEI et al., 2012), *Oryza* sp. (XIE et al., 2005; XU et al., 2016), *Solanum tuberosum* (ZHANG et al., 2017a) e *Populus* sp. (HE et al., 2012; MA et al., 2015). Recentemente, Fan et al. (2018) classificou os *WRKY* em eucalipto, apresentando também sua expressão em resposta a diferentes hormônios vegetais e estresses de frio e salinidade. No entanto, ainda há informações a serem geradas a partir de análises de bioinformática e outros estresses.

A identificação e a caracterização dos genes que codificam proteínas dentro do eucalipto, incluindo os FTs *WRKY*, permite a compreensão e a descoberta de características silviculturais controladas, que podem ser direcionados a melhoria da cultura (EDWARDS; BATLEY, 2010). Atualmente, a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados

genômicos gerados a partir do sequenciamento do DNA dos organismos. É utilizada para adquirir, processar, armazenar, distribuir, analisar e interpretar as informações contidas nessas regiões (ONG et al., 2016). Durante o processo inicial de identificação de famílias gênicas, estas análises são utilizadas para realizar classificação genômica, alinhamentos múltiplos, análises de filogenia gênica e composição de motivos conservados (AYADI et al., 2016).

Juntamente com os dados genômicos, os dados a nível do transcriptoma tem-se mostrado altamente informativos na compreensão das respostas ômicas durante o processo de adaptação e mitigação das mudanças nas condições de cultivo, inclusive no eucalipto (SPOKEVICIUS et al., 2017). É necessário entender as redes de interações entre os FTs *WRKY* e os genes que são expressos durante as mudanças no seu desenvolvimento, causados, no caso, pelo déficit hídrico. As redes de regulação transcricional foram uma das primeiras construções a serem utilizadas na biologia molecular, onde baseia-se na interação entre genes reguladores e genes a jusante nos eventos de sinalização (BELOSTOTSKY; ROSE, 2005; YUAN et al., 2008). Os estudos destacam o potencial uso destas redes para expor a regulação a nível de sistema nos processos biológicos, descobrindo assim, os principais FTs envolvidos nesse processo e proteínas que estão correlacionadas a estes FTs (YUAN et al., 2008).

3 METODOLOGIA

3.1 Identificação de proteínas *WRKY*

Os nomes (*locus* do gene) dos membros da família *WRKY* pertencentes a *E. grandis* foram recuperados da base de dados *Plant Transcription Factor Database (PlantTFDB)* (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/family.php?sp=Egr&fam=WRKY>) (GUO et al., 2008) e suas sequências foram obtidas dentro do genoma disponível no banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) usando o *locus* do gene como entrada na ferramenta *Keyword search*. A fim de identificar novas sequências e validar as identificadas no *PlantTFDB*, realizou-se BLASTp (*Basic local alignment search tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) utilizando o domínio conservado de sequência de *A. thaliana* já caracterizada (*AtWRKY6*) como sendo membro desta família. Todas as proteínas identificadas foram submetidas à análise de presença e localização dos domínios conservados WRKYGQK na plataforma *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (SCHULTZ et al., 2000) ou *Pfam* (<http://pfam.xfam.org/>) (EL-GEBALI et al., 2018). Para análise de presença de *zinc-finger like* C₂H₂ (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H) ou C₂HC (C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C), as sequências foram alinhadas pelo algoritmo *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e analisadas posteriormente. Todas as sequências genéticas não redundantes que codificam os domínios *WRKY* completos e possuem a presença de um dos domínios *zinc-finger like* foram consideradas como genes putativos *WRKY*.

3.2 Classificação dos genes *EcgWRKY* e localização cromossômica

As proteínas caracterizadas foram nomeadas conforme distribuição nos cromossomos presente no genoma do eucalipto (ALMEIDA et al., 2017; BI et al., 2016; GOEL et al., 2016; MYBURG et al., 2014). A distribuição das sequências de *EgrWRKY* nos cromossomos foi obtida no banco de dados *Phytozome* v2.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) usando o *locus* do gene como entrada na ferramenta “*Keyword search*”.

3.3 Identificação de motivos conservados em proteínas *EcgWRKY*

A detecção dos motivos conservados nas proteínas identificadas como sendo *WRKY* foi realizada utilizando a plataforma *SALAD database* (<https://salad.dna.affrc.go.jp/salad/en/>) que compara as sequências submetidas à bancos de dados de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (MIHARA; ITOH; IZAWA, 2010).

3.4 Alinhamento de sequências e análise filogenética

A árvore filogenética foi construída envolvendo 123 sequências de aminoácidos, dentre as quais estão 74 sequências de eucalipto, juntamente com 40 sequências de *WRKY* de *A. thaliana* e 9 sequências de *Populus* sp. já caracterizados na literatura (APÊNDICE A). As sequências foram alinhadas pelo algoritmo *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e a árvore filogenética foi construída no programa *MEGAX* utilizando o método *neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

3.5 Análise de sintênia

Para identificar blocos sintênicos, as comparações entre o genoma do eucalipto (*E. grandis* x *E. grandis*) e de arábido (*E. grandis* x *A. thaliana*), foram realizadas utilizando o algoritmo *SynMap* (<https://genomeevolution.org/coge/SynMap.pl>) (LYONS et al., 2008). Através do algoritmo *DAGchainer* (HAAS et al., 2004), utilizou-se como opções um mínimo de 5 pares de genes alinhados e uma distância máxima de 20 genes entre duas combinações e, para fundir blocos sintênicos adjacentes, utilizou-se o *QuotaAlign* (HAUG-BALTZELL et al., 2017). As duplicações genicas foram determinadas pelo algoritmo *Last (fastest)* disponível na plataforma CoGe (<https://genomeevolution.org/coge/SynMap.pl>) (LYONS et al., 2008).

3.6 Escolha dos genes avaliados

A fim de analisar o comportamento de alguns membros *EgrWRKY* frente a aplicação de moléculas sinalizadoras e déficit hídrico, foram escolhidos 3 genes mais expressos significativamente com base no sequenciamento de transcriptoma obtido em folhas de *E. camaldulensis* submetidas ao déficit hídrico (acesso - SRP014336) (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012). O perfil de expressão dos *EgrWRKY* é apresentado em um mapa de calor (*heatmap*) construído com auxílio do excel (APÊNDICE B). A partir desta análise, foram

escolhidos os genes *EgrWRKY3*, *EgrWRKY11* e *EgrWRKY20* (Eucgr.A01053.1, Eucgr.B03520.1 e Eucgr.C00348.1, respectivamente).

Outros genes *WRKY* envolvidos no processo de resposta ao déficit hídrico foram selecionados utilizando estratégia de redes de co-expressão. Foram utilizados genes diferencialmente expressos obtidos de duas bibliotecas de RNA-seq [SRP014336 (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012) e SRA012867 (VILLAR et al., 2011)] de plantas submetidas ao estresse hídrico disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas bibliotecas foram quantificadas utilizando *Salmon* (PATRO et al., 2017) contra o transcriptoma primário de *E. grandis* para identificar os genes diferencialmente expressos. A partir dos dados gerados, foi utilizado a correlação de *Sperman* com $p \geq 0,9$ para verificar a proximidade do perfil de expressão dos genes analisados com os FTs *WRKY*, e a correlação entre eles próprios. Para a visualização das redes de correlação foi utilizado o *software Cytoscape* (CLINE et al., 2007). A partir das redes de co-expressão geradas, foi selecionado o cluster com os 10 FTs *WRKY* mais conectados com os 3306 genes analisados (APÊNDICE C – A). Selecionou-se os genes *EgrWRKY15* e *EgrWRKY45* (Eucgr.C00077.1 e Eucgr.G02459.1, respectivamente).

A mesma abordagem de redes de co-expressão foi utilizada para selecionar genes que apresentavam correlação com os candidatos *WRKY* e apresentavam domínios conservados envolvidos em resposta ao estresse hídrico. Neste caso, foi utilizado a correlação de *Sperman* com $p \geq 0,8$ para verificar a proximidade do perfil de expressão dos genes utilizados com os FTs *WRKY* (APÊNDICE C – B). Os genes que apresentaram correlação com os FTs foram submetidos ao CDD – NCBI para análise dos seus domínios conservados. A partir desta análise inicial, foram selecionados dois possíveis candidatos envolvidos em resposta ao déficit hídrico: Eucgr.J00502.1 e Eucgr.D01960.1.

3.7 Desenho dos primers

As sequências dos genes selecionados foram identificadas no genoma de *E. grandis* disponível no banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A busca foi realizada pelo nome da sequência por meio da ferramenta “*Keyword search*”. A partir das sequências obtidas, os primers foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e os parâmetros de qualidade foram verificados pelo software *OligoAnalyzer*

(<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). As informações sobre os genes selecionados e os primers desenhados estão no APÊNDICE D.

3.8 Material vegetal

Para os experimentos foram utilizados dois clones (VM01 – tolerante e VM05 – sensível a déficit hídrico) do híbrido *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake (MARTINS et al., 2018). As plantas foram multiplicadas *in vitro* durante 16 meses em meio de cultivo WPM (*Wood Plant Medium*) (LLOYD; MCCOWN, 1980) acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose, 3,35 g.L⁻¹ de ágar, 26,85 µM.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,88 µM.L⁻¹ de 6 – benzilaminopurina (BAP). Posteriormente as microestacas foram alongadas em meio de cultura WPM contendo 20g.L⁻¹ de glicose, 3,35 g.L⁻¹ de ágar, 0,44 µM.L⁻¹ de BAP, 5,37 µM.L⁻¹ de ANA e 4,92 µM.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). As plantas foram enraizadas no mesmo meio de alongamento.

3.9 Experimento com moléculas sinalizadoras

Para o experimento de aplicação de moléculas sinalizadoras, as mudas enraizadas foram aclimatizadas em mini-estufas contendo Tropstrato HA Hortaliças (casca de pinus, turfa, vermiculita, superfosfato simples, nitrato de potássio e produtos formulados por terceiros) durante 15 dias e, posteriormente, transferidas para tubetes contendo o mesmo substrato. A aplicação de moléculas sinalizadoras foi realizada em plantas com 45 dias, medindo cerca de 10 – 12 cm de altura. A concentração das soluções utilizadas foram retiradas da literatura, optando-se por usar 100 µM de ABA (DIAO et al., 2016), 100 µM AS (DIAO et al., 2016; SONG et al., 2016), 100 µM metil jasmonato (MeJa) (DIAO et al., 2016; SONG et al., 2016) e 20 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SCARPECI et al., 2013), acrescido de TWEEN®20 para melhorar a aderência à superfície foliar, foram borrifadas em todas as folhas das plantas utilizadas no experimento.

Para a análise de expressão gênica, os dois pares de folhas mais novas foram coletados a 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação das soluções, iniciando a coleta as 8:00 horas da manhã. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, em freezer -80°C até a extração do RNA.

3.10 Experimento de déficit hídrico

O experimento de déficit hídrico foi induzido por Polietilenoglicol 6000 (PEG6000) *in vitro*. Plantas enraizadas foram transferidas para potes contendo meio de alongamento (subitem 3.8) com pH 5,8, acrescido de 20 g.L⁻¹ de glicose e 300 g.L⁻¹ de PEG6000, mimetizando um potencial hídrico de -1Mpa. Para a sustentação das plantas, foi utilizado cerca de 12 g de vermiculita em cada pote. O experimento foi mantido em sala de crescimento à 27 °C com intensidade luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹. Para a expressão gênica, a parte aérea das plantas foram coletadas as 0, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após o início do experimento.

3.11 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA foi realizada utilizando o protocolo CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*). O material vegetal coletado de cada experimento (folhas ou parte aérea) foi macerado em nitrogênio líquido e transferidas para eppendorf de 2 mL seguido de adição de 1,4 mL de CTAB (2% CTAB; 2% PVP; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; e 0,5 g.L de spermidina) pré-aquecido a 65°C por 10 minutos com 2% de β-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 65°C por 15 min. e após centrifugadas por 10 min. em velocidade máxima a temperatura ambiente. Após a centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes com Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1), sendo a cada lavagem, a centrifugação por 15 min. Para a precipitação do RNA (uma hora a -20°C), 500 μL de sobrenadante foram colocados em eppendorf de 1,5 mL e acrescido de 0,1X do volume total obtido de NaOAc a 4M (pH 5,2) e 2X do volume total obtido de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas por 30 min. e o precipitado obtido foi lavado, sequencialmente, em 250 μL de etanol 70% gelado e 250 μL de etanol 100%. O precipitado foi ressuspendido em 25 μL de H₂O Milli-Q autoclavada.

Para a remoção do DNA genômico, as amostras foram tratadas com *Kit Turbo DNA-free* (Ambion) e quantificadas em *Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000*. Para verificação de resíduos de DNA, as amostras foram submetidas à uma qPCR com *primers* para o gene de referência *EF-1α* em equipamento *ABI 7500 System* (*Applied Biosystems*). A partir de 1000 ng de RNA, o cDNA foi sintetizado utilizando o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*).

3.12 RT-qPCR

As análises de expressão gênica foram realizadas em aparelho *ABI 7500 Fast* (*Applied Biosystems*) em um volume total de 10 μ L contendo 5 μ L de GoTaq® qPCR Master Mix (*Promega*), 1 μ L de cDNA diluído em 1:5 e concentrações de *primers* conforme APÊNDICE D. Após os 40 ciclos na estequiometria padrão do equipamento, as curvas de dissociação (*Melting curve*) foram verificadas para confirmar a especificidade dos *primers* e sua eficiência foi determinada pelo software *LinRegPCR* (RUIJTER et al., 2009). Foram realizadas triplicatas biológicas juntamente com amostras de interensaio para verificar a reprodutibilidade técnica entre as placas. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001) e normalizados coma expressão dos genes de referência *PP2A3*, *EF-1 α* e *SAND* (MARTINS et al., 2018).

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizados em esquema fatorial: no experimento de moléculas sinalizadoras o fatorial foi 2x6 (dois clones e seis tempos) e no experimento de déficit hídrico foi 2x7 (dois clones e sete tempos). Para as análises estatísticas foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014) realizando ANOVA seguida pelo teste de médias Scott Knott, a 5% de nível de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação da família de genes *WRKY* em eucalipto e classificação das sequências

Estudos em genomas de animais, como em *Drosophila melanogaster*, não detectaram a presença de homólogos *WRKY* em seus DNAs, sugerindo que esta família estaria restrita ao reino vegetal (EULGEM et al., 2000; RIECHMANN et al., 2000; ZHANG; WANG, 2005). No entanto, com o sequenciamento de diversos organismos presentes na história evolutiva das plantas, foi possível identificar *WRKY* em alguns fungos, amebas sociais, diplomonadidos e algas verdes (RINERSON et al., 2015). A presença de um gene *WRKY* em alga verde carófito (*Klebsormidium flaccidum*) e a sua expansão específica em plantas, faz com que estes FTs sejam uma das famílias genicas mais importantes no reino vegetal, devido a sua participação direta em diversos processos biológicos e, principalmente, em respostas a estresses bióticos e abióticos (ALMEIDA et al., 2017; RINERSON et al., 2015).

Análises em eucalipto, utilizando dados do *PlantTFDB* e BLASTp, possibilitaram encontrar 79 sequências não redundantes com possibilidade de serem proteínas da família *WRKY* (TABELA 1). Diferentes espécies, como *Populus trichocarpa* (100 membros) (JIANG et al., 2014), *Oryza sativa* (100 membros) (ROSS; LIU; SHEN, 2007), *Elaeis guineenses* (95 membros) (XIAO et al., 2017), dentre outras, apresentam números maiores de membros nesta família, devido, principalmente, aos eventos de duplicação (RAMAMOORTHY et al., 2008).

Entre as 79 sequências identificadas em eucalipto, 77 possuem pelo menos um domínio completo do heptapeptídeo WRKYGQK verificados em pesquisas no *CDD-NCBI* (*Conserved domains search*) e *SALAD database*, enquanto duas sequências (Eucgr.C02487.1 e Eucgr.D01605.1) não apresentavam tal conformação (TABELA 1). Na tentativa de determinar a confiabilidade dos 77 genes restante, foi realizada uma inspeção manual das sequências proteicas que identificaram ausência do *zinc-finger like* (Eucgr.G00254.1, Eucgr.J01756.1 e Eucgr.J02655.1) ou alteração no mesmo domínio (Eucgr.C02487.1 e Eucgr.D01605.1) e no motivo *WRKY* (Eucgr.J02655.1) (TABELA 1). Essas sequências não foram classificadas pois apresentavam grandes divergências com as demais identificadas, assim como ocorreu em cacau (ALMEIDA et al., 2017), salgueiro (BI et al., 2016), banana (GOEL et al., 2016), uva (GUO et al., 2014) e populus (JIANG et al., 2014). Resultado diferente foi obtido em análise genômica realizada recentemente em eucalipto, onde foi possível identificar 82 genes putativos *WRKY* (FAN et al., 2018). Entretanto, três das sequências não apresentavam o domínio PF03106 e

Tabela 1 – Proteínas *WRKY* presentes no genoma de *Eucalyptus grandis* (Continua).

Gene	Locus do gene	FAN et al., 2018	Domínio <i>WRKY</i>		Grupo	Crom.
			Heptapeptídeo	Zinc-finger like		
<i>EgrWRKY1</i>	Eucgr.A01195.1	<i>EgrWRKY44</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	1
<i>EgrWRKY2</i>	Eucgr.A01001.1	<i>EgrWRKY47</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	1
<i>EgrWRKY3</i>	Eucgr.A01053.1	<i>EgrWRKY1</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	1
<i>EgrWRKY4</i>	Eucgr.A01990.1	<i>EgrWRKY8</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	1
<i>EgrWRKY5</i>	Eucgr.A02718.1	<i>EgrWRKY27</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	1
<i>EgrWRKY6</i>	Eucgr.B01503.1	<i>EgrWRKY21</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	2
<i>EgrWRKY7</i>	Eucgr.B01415.1	<i>EgrWRKY34</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	2
<i>EgrWRKY8</i>	Eucgr.B00437.1	<i>EgrWRKY72</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	2
<i>EgrWRKY9</i>	Eucgr.B03165.1	<i>EgrWRKY10</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	2
<i>EgrWRKY10</i>	Eucgr.B03189.1	<i>EgrWRKY3</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	2
<i>EgrWRKY11</i>	Eucgr.B03520.1	<i>EgrWRKY75</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	2
<i>EgrWRKY12</i>	Eucgr.B04010.1	<i>EgrWRKY26</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	2
<i>EgrWRKY13</i>	Eucgr.C00675.1	<i>EgrWRKY50</i>	WRKYGKK	C ₂ H ₂	II-c	3
<i>EgrWRKY14</i>	Eucgr.C01943.1	<i>EgrWRKY73</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	3
<i>EgrWRKY15</i>	Eucgr.C00077.1	<i>EgrWRKY11</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	3
<i>EgrWRKY16</i>	Eucgr.C02481.1	<i>EgrWRKY37</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	3
<i>EgrWRKY17</i>	Eucgr.C02545.1	<i>EgrWRKY5</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	3
<i>EgrWRKY18</i>	Eucgr.C02659.1	<i>EgrWRKY79</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	3
<i>EgrWRKY19</i>	Eucgr.C02660.1	<i>EgrWRKY60</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	3
<i>EgrWRKY20</i>	Eucgr.C00348.1	<i>EgrWRKY32</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	3
<i>EgrWRKY21</i>	Eucgr.C04011.1	<i>EgrWRKY17</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	3
<i>EgrWRKY22</i>	Eucgr.D01219.1	<i>EgrWRKY12</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	4
<i>EgrWRKY23</i>	Eucgr.D01809.1	<i>EgrWRKY24</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	4
<i>EgrWRKY24</i>	Eucgr.D01811.1	<i>EgrWRKY35</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	4
<i>EgrWRKY25</i>	Eucgr.D02324.1	<i>EgrWRKY29</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	4
<i>EgrWRKY26</i>	Eucgr.D02326.1	<i>EgrWRKY56</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	4
<i>EgrWRKY27</i>	Eucgr.D02359.1	<i>EgrWRKY41</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	4
<i>EgrWRKY28</i>	Eucgr.D00336.1	<i>EgrWRKY71</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	4

<i>EgrWRKY29</i>	Eucgr.K01971.1	<i>EgrWRKY14</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	5
<i>EgrWRKY30</i>	Eucgr.E02783.1	<i>EgrWRKY65</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	5
<i>EgrWRKY31</i>	Eucgr.E04011.1	<i>EgrWRKY31</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	5
<i>EgrWRKY32</i>	Eucgr.E00096.1	<i>EgrWRKY43</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	5
<i>EgrWRKY33</i>	Eucgr.E00098.1	<i>EgrWRKY22</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	5
<i>EgrWRKY34</i>	Eucgr.E00850.1	<i>EgrWRKY53</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	5
<i>EgrWRKY35</i>	Eucgr.F00740.1	<i>EgrWRKY42</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	6
<i>EgrWRKY36</i>	Eucgr.F01981.1	<i>EgrWRKY2</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ / C ₂ H ₂	I	6
<i>EgrWRKY37</i>	Eucgr.F00187.1	<i>EgrWRKY7</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	6
<i>EgrWRKY38</i>	Eucgr.F03522.1	<i>EgrWRKY25</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	6
<i>EgrWRKY39</i>	Eucgr.F03955.1	<i>EgrWRKY18</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	6
<i>EgrWRKY40</i>	Eucgr.F04317.1	<i>EgrWRKY76</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	6
<i>EgrWRKY41</i>	Eucgr.F00621.1	<i>EgrWRKY20</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	6
<i>EgrWRKY42</i>	Eucgr.J02653.1	<i>EgrWRKY38</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	7
<i>EgrWRKY43</i>	Eucgr.G00258.1	<i>EgrWRKY30</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	7
<i>EgrWRKY44</i>	Eucgr.G00268.1	<i>EgrWRKY63</i>	WRKYDQK	C ₂ HC	III	7
<i>EgrWRKY45</i>	Eucgr.G02459.1	<i>EgrWRKY57</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	7
<i>EgrWRKY46</i>	Eucgr.G02469.1	<i>EgrWRKY4</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	7
<i>EgrWRKY47</i>	Eucgr.G02535.1	<i>EgrWRKY36</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	7
<i>EgrWRKY48</i>	Eucgr.G03144.1	<i>EgrWRKY52</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	7
<i>EgrWRKY49</i>	Eucgr.G03145.1	<i>EgrWRKY70</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	7
<i>EgrWRKY50</i>	Eucgr.G00619.1	<i>EgrWRKY9</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	7
<i>EgrWRKY51</i>	Eucgr.H00996.1	<i>EgrWRKY68</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	8
<i>EgrWRKY52</i>	Eucgr.H01007.1	<i>EgrWRKY39</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	8
<i>EgrWRKY53</i>	Eucgr.H04061.1	<i>EgrWRKY48</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	8
<i>EgrWRKY54</i>	Eucgr.H04135.1	<i>EgrWRKY74</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	8
<i>EgrWRKY55</i>	Eucgr.H03349.1	<i>EgrWRKY45</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	8
<i>EgrWRKY56</i>	Eucgr.I00882.1	<i>EgrWRKY15</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-d	9
<i>EgrWRKY57</i>	Eucgr.I01633.1	<i>EgrWRKY64</i>	RSQYGQK	C ₂ H ₂	II-c	9
<i>EgrWRKY58</i>	Eucgr.I01927.1	<i>EgrWRKY19</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	9
<i>EgrWRKY59</i>	Eucgr.I01998.1	<i>EgrWRKY58</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	9
<i>EgrWRKY60</i>	Eucgr.I00305.1 ^a	<i>EgrWRKY13</i>	WRKYGQK	C ₂ HA	II-c	9

<i>EgrWRKY61</i>	Eucgr.I00316.1	<i>EgrWRKY51</i>	WRKYGKK	C ₂ H ₂	II-c	9
<i>EgrWRKY62</i>	Eucgr.I00317.1	<i>EgrWRKY59</i>	WRKYGKK	C ₂ H ₂	II-c	9
<i>EgrWRKY63</i>	Eucgr.J00106.1	<i>EgrWRKY46</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	10
<i>EgrWRKY64</i>	Eucgr.J00107.1	<i>EgrWRKY55</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	10
<i>EgrWRKY65</i>	Eucgr.J03117.1	<i>EgrWRKY40</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-a	10
<i>EgrWRKY66</i>	Eucgr.K01151.1	<i>EgrWRKY69</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-e	11
<i>EgrWRKY67</i>	Eucgr.K01219.1	<i>EgrWRKY23</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	11
<i>EgrWRKY68</i>	Eucgr.K01289.1	<i>EgrWRKY28</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	11
<i>EgrWRKY69</i>	Eucgr.K00331.1	<i>EgrWRKY54</i>	WRKYGQK	C ₂ HC	III	11
<i>EgrWRKY70</i>	Eucgr.K02453.1	<i>EgrWRKY61</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	11
<i>EgrWRKY71</i>	Eucgr.K02940.1	<i>EgrWRKY33</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	11
<i>EgrWRKY72</i>	Eucgr.K03115.1	<i>EgrWRKY49</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-c	11
<i>EgrWRKY73</i>	Eucgr.K03196.1	<i>EgrWRKY67</i>	WRKYGQK/WRKYGQK	C ₂ H ₂ /C ₂ H ₂	I	11
<i>EgrWRKY74</i>	Eucgr.K00786.1	<i>EgrWRKY6</i>	WRKYGQK	C ₂ H ₂	II-b	11
NC	Eucgr.G00254.1 ^{a*}	<i>EgrWRKY16</i>	WRKYGQK	SD	NC	7
NC	Eucgr.J01756.1 ^{a*}	<i>EgrWRKY66</i>	WKKYGQK	SD	NC	10
NC	Eucgr.C02487.1 ^{a*}	<i>EgrWRKY77</i>	Domínio não identificado	C ₁ H ₂	NC	3
NC	Eucgr.D01605.1 ^{a*}	<i>EgrWRKY78</i>	Domínio não identificado	C ₁ H ₂	NC	5
NC	Eucgr.J02655.1 ^{a*}	<i>EgrWRKY62</i>	WTKYGQK/HAAENQK	C ₂ H ₂ /SD	NC	7

(Conclusão)

Crom.: cromossomo

^a Sequências não classificadas em nenhum grupo devido à ausência do domínio WRKY, ausência de *Zinc-finger like* e/ou domínios incompletos

* Sequências excluídas de análise filogenética

^{SD} Sem domínio

^{NC} Não classificadas

Fonte: Da autora (2019)

foram descartadas das análises posteriores (sequências não apresentadas no artigo). As sequências com alterações identificadas neste trabalho (Eucgr.G00254.1, Eucgr.J02655.1, Eucgr.J01756.1, Eucgr.C02487.1 e Eucgr.D01605.1) foram classificadas normalmente por Fan et al. (2018) como *EgrWRKY16*, *EgrWRKY62*, *EgrWRKY66*, *EgrWRKY77* e *EgrWRKY78*, respectivamente.

A característica definidora dos FTs *WRKY* é a presença do domínio *WRKYGQK* quase invariante na região N-terminal que é responsável pela ligação ao DNA (EULGEM et al., 2000). As proteínas contendo a sequência *WRKYGQK* entram em contato com uma região de aproximadamente 6pb, conectando com *W-box* (TTGACC/T) presente no promotor dos genes alvo (YAMASAKI et al., 2005). Este domínio consiste em uma folha de quatro filamentos, com o Zn^{2+} coordenando os resíduos de Cys/His (Cisteína e Histidina) conservados no motivo (YAMASAKI et al., 2005). O Zn^{2+} é responsável pela formação da estrutura terciária da proteína, indicando que, sequências que não apresentam este motivo, não são funcionais. Outro indicativo de inatividade da proteína é a presença de mutações nos resíduos de Cys e His que não apresentam atividade de ligação ao DNA (MAEO et al., 2001; YAMASAKI et al., 2005).

O domínio *WRKY* (*WRKYGQK*) invariante foi encontrado em 69 proteínas. Três sequências do grupo II-c apresentaram variações de um aminoácido (*WRKYGKK*), outra sequência do grupo II-c apresenta variação de três aminoácidos (*RSQYGQK*) e uma sequência do grupo III apresenta variação de um aminoácido (*WRKYDQK*). Embora o domínio *WRKYGQK* seja altamente conservado, várias alterações são encontradas em diferentes espécies e podem ser expressas, como por exemplo *WRKYGMK*, *WSKYGQK*, *WQKYGQK* e *WIKYGEN* em tomate (*Solanum lycopersicum*) (HUANG et al., 2012). Essas variações, especialmente *WRKYGKK*, foram identificadas principalmente nos membros do grupo II-c, corroborando com observações em berinjela (YANG et al., 2015), arabidopsis (EULGEM et al., 2000), tomate (HUANG et al., 2012), soja (YIN et al., 2013) e amendoim (SONG et al., 2016). Esses resultados indicam que as proteínas do grupo II-c podem desempenhar uma variedade de funções biológicas e tendem a sofrer mais mutações (SONG et al., 2016).

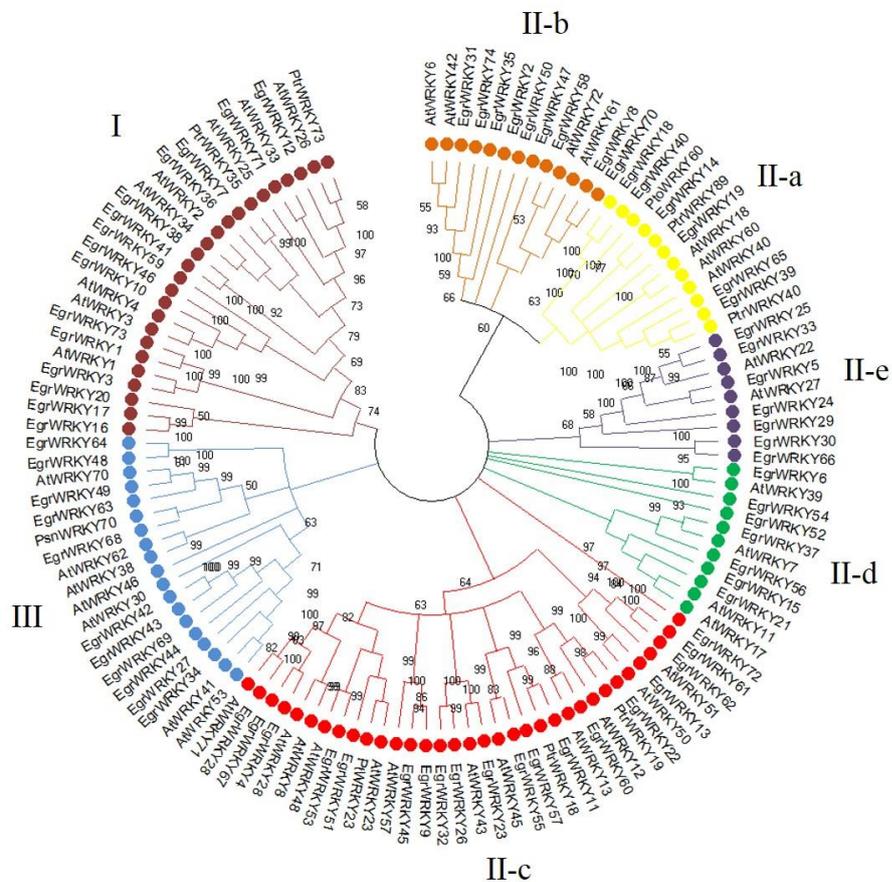
Essas variações podem interagir com sítios de ligações diferentes do consenso TTGACC/T. Em tabaco, o FT *NtWRKY12* é responsável pela expressão de *PR-1* induzida por AS. No entanto, ele possui sítios de ligações específicos que diferem de *W-box*. O domínio presente nesta sequência apresenta um resíduo Lys (K) no lugar de Gln (Q) (*WRKYGKK*), que reconhece especificamente duas *WK-boxes* (*WK1* e *WK2* – TTTTCCAC) mas não se liga ao elemento da *W-box* (VERK et al., 2008). Essas alterações nas sequências dos domínios

conservados podem ser indicativos de ligações a diferentes sítios presente nos promotores de genes alvo.

4.2 Análise filogenética, identificação dos motivos conservados em proteínas *EgrWRKY* e localização cromossômica

Com o intuito de analisar as relações evolutivas e obter uma melhor separação dos grupos e subgrupos dos genes *EgrWRKY*, a árvore filogenética foi construída com um total de 123 sequências apresentadas na metodologia (APÊNDICE A). A distribuição dos domínios pode fornecer informações importantes sobre a evolução e as relações entre sequências divergentes (ZHOU et al., 2016). Com base nas características estruturais dos domínios, os 74 genes representantes do eucalipto foram agrupados nos três grupos principais (I, II e III) e nos cinco subgrupos do grupo II (II-a à II-e) (FIGURA 1; APÊNDICE E) de acordo com o proposto em arabidopsis (EULGEM et al., 2000).

Figura 1 – Árvore filogenética dos domínios *WRKY* de *E. grandis*, *A. thaliana* e *Populus* sp.



Fonte: Da autora (2019).

O grupo I contém 15 sequências que apresentaram dois domínios *WRKY* e dois *zinc-finger like C₂H₂* (C-X₄-C-X₂₃-H-X₁-H) (TABELA 1; APÊNDICE B). Os dois domínios *WRKY* presentes nas sequências do grupo I aparentam ser funcionalmente distintos. A ligação específica aos genes alvo é realizada principalmente pelo domínio C-terminal, sendo que o domínio presente na região N-terminal pode participar do processo de ligação, aumento de afinidade ou especificidade (sua função não é clara) (BAKSHI; OELMÜLLER, 2014; EULGEM et al., 2000).

O grupo II, composto por 48 sequências subdivididas em cinco subgrupos (II-a, II-b, II-c, II-d e II-e), contém um domínio *WRKY* e um *zinc-finger like C₂H₂* (C-X₄-C-X₂₃-H-X₁-H), e possuem 6, 10, 19, 6 e 7 genes cada grupo, respectivamente (TABELA 1; APÊNDICE B). 11 sequências do grupo III apresentam um domínio *WRKY* e um *zinc-finger like C₂HC* (C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C) (TABELA 1; APÊNDICE B). Os grupos II-a e II-b apresentam-se como clados irmãos (FIGURA 1), o que resultam em propostas para fundi-los em um único subgrupo (XU et al., 2016).

Evolutivamente, os genes *WRKY* do grupo I são considerados mais antigos, pois foram identificados em organismos primitivos, como protozoários (BARANWAL; NEGI; KHURANA, 2016). Análises recentes em genomas de algas unicelulares, algas pluricelulares, fungos, amebas sociais, diplomadidos e plantas, identificaram a presença de genes do grupo I e genes do grupo II-b em organismos existentes antes da colonização terrestre. Até a conclusão final sobre a evolução destes FTs, são sugeridas duas hipóteses diferentes referentes ao *WRKY* ancestral: “Hipótese Separada II-a + II-b” – sugerem que os genes destes dois grupos não evoluíram a partir de genes do Grupo I; e “Hipótese do Grupo I” – todos os *WRKY* presente em plantas superiores evoluíram a partir deste grupo (RINERSON et al., 2015). Uma das avaliações sobre a evolução é a presença de membros do grupo I e II em musgo (*Physcomitrella patens*), porém não há a presença de membros do grupo I e III em outras espécies, indicando assim que sequências do grupo III podem ter evoluído do grupo II (ZHANG; WANG, 2005; ZHOU et al., 2016).

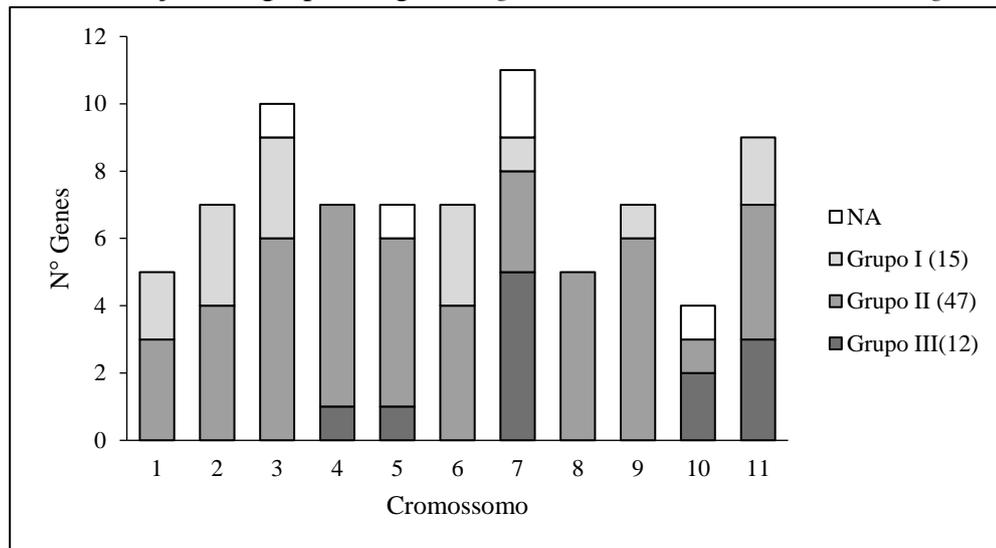
No estudo da família *WRKY* em eucalipto, Fan et al. (2018) classificou sete genes em grupos diferentes dos encontrados neste trabalho. *EgrWRKY65* e *EgrWRKY69* (*EgrWRKY30* e *EgrWRKY66* neste trabalho) foram classificados como pertencentes ao grupo II-d. Neste estudo, as sequências permaneceram no grupo II-e, corroborando com a classificação de *AtWRKY22* e *AtWRKY27* (EULGEM et al., 2000). As sequências proteicas de *EgrWRKY50*, *EgrWRKY51*, *EgrWRKY59* e *EgrWRKY74* (*EgrWRKY13*, *EgrWRKY61*, *EgrWRKY62* e *EgrWRKY54* neste trabalho) foram classificadas no grupo II-a. Na árvore filogenética deste estudo, as três

primeiras sequências pertencem ao grupo II-c e a sequência *EgrWRKY74*, no grupo II-d. A classificação demonstrada na árvore filogenética por Fan et al. (2018), que utilizou sequências de eucalipto e arabidopsis, difere da relação filogenética construída com base somente nas proteínas de eucalipto quando analisados os motivos conservados no mesmo artigo. Nesta análise, as três primeiras sequências pertencem ao grupo II-c, enquanto a sequência 74 pertence ao grupo I. No entanto, não é possível verificar a presença de dois domínios WRKYGQK e dois domínios C₂H₂ nesta proteína, demonstrando resultados contraditórios. A proteína *EgrWRKY49* (*EgrWRKY72* neste trabalho) e *EgrWRKY66* [sequência não analisada – Eucgr.J01756.1 (TABELA 1)] aparentam ser um grupo separado, pois não apresenta proximidade filogenética com o grupo ao qual foi classificado (FAN et al., 2018).

Como apresentado anteriormente, a identificação das sequências foi baseada na presença do domínio *WRKY* e do motivo *zinc-finger like*. Além disso, a classificação refinada resultante nos três grupos e suas subdivisões é afirmada pela presença de cerca de 10 motivos estruturais adicionais que são intrínsecos entre os membros de arabidopsis (APÊNDICE F) (EULGEM et al., 2000). O motivo conservado HARF [RTGHARFRR(A/G)P] foi identificado em dois membros de eucalipto, *EgrWRKY16* e *EgrWRKY17*. No entanto, nenhuma função foi claramente identificada para este motivo (ZHANG; FENG, 2014; ZOU et al., 2016). O motivo repressor da expressão, LxLxLx, foi identificado em 4 membros do subgrupo II-a (*EgrWRKY18*, 39, 40 e 65) e 8 membros do subgrupo II-b (*EgrWRKY2*, 8, 31, 35, 54, 58, 70 e 74) (TIWARI; HAGEN; GUILFOYLE, 2004; ZHANG; FENG, 2014; ZOU et al., 2016). Já o motivo ativador LxxLL está presente em *EgrWRKY11*, 23, 26, 32, 55 e 57, todos presentes no grupo II-c (MCINERNEY et al., 1998; ZHANG; FENG, 2014; ZOU et al., 2016).

As 74 sequências proteicas *EgrWRKY* que apresentavam o heptapeptídeo na região N-terminal e um *zinc-finger like* na região C-terminal foram nomeadas conforme sua localização nos 11 cromossomos do eucalipto (TABELA 1; FIGURA 2) (DOU et al., 2014; GOEL et al., 2016; GUO et al., 2014; MYBURG et al., 2014; ZHOU et al., 2016). As sequências que codificam os FT *WRKY* estão distribuídas de maneira desuniforme em todos os cromossomos de eucalipto, sendo a maioria, localizada nos cromossomos 3, 7 e 11 (FIGURA 2).

Figura 2 – Distribuição dos grupos de genes *EgrWRKY* nos cromossomos de *E. grandis*.



NA: sequências não avaliadas.

O número de genes pertencentes a cada grupo foi indicado entre parênteses

Fonte: Da autora (2019).

Devido ao exposto anteriormente, a análise da classificação das sequências de acordo com a proximidade filogenética (FIGURA 1), análise manual dos alinhamentos (APÊNDICE E) e presença de motivos conservados adicionais (APÊNDICE F) apresentados nesse trabalho apontam para uma maior confiabilidade dos dados.

4.3 Estudo de sintênia e duplicação dos genes *WRKY* em *E. grandis*

O que torna os genomas de angiospermas mais complexos em estrutura e conteúdo de DNA, quando comparados a genomas de animais, é a sucessão de rearranjos e expansões genômicas, através de duplicações (ou triplicação) dos eventos (TANG et al., 2008). Esses eventos, que causam a expansão de famílias gênicas, fornecem oportunidades para ocorrência de uma variedade de mudanças evolutivas (WANG et al., 2011b). A redundância de genes pode permitir mudanças nas sequências, como mutações de nucleotídeos em uma das cópias do gene duplicado e funcionalmente neutralizado pela presença de outras cópias, diminuindo o efeito na aptidão biológica (WANG et al., 2011b). Essas alterações nas sequências podem resultar em neofuncionalização (novas funções), subfuncionalização (subdivisões de funções ancestrais) ou subneofuncionalização (uma mistura das duas) (INNAN; KONDRASHOV, 2010; LYNCH; CONERY, 2001; WANG et al., 2011b). Para compreender a origem dos membros presente na família *WRKY* de eucalipto, a partir destes eventos, é necessário um estudo de ancestralidade.

Dez genes que codificam proteínas *WRKY* foram identificadas em cinco eventos de duplicação em tandem (TABELA 2) presentes no cromossomo 3, 10 e 11, pertencentes ao subgrupo IId, II-a, III e II-e, respectivamente. As duplicações em tandem são resultado de cruzamentos desiguais (*crossing-over*) e ocasionam um aumento ou diminuição do número de cópias em famílias gênicas (ACHAZ et al., 2000; CANNON et al., 2004).

Tabela 2 – Duplicações em tandem dos genes *WRKY* no genoma de *E. grandis*

Grupos de duplicação em tandem	<i>Locus</i> do gene	Localização cromossômica
Grupo 1	<i>EgrWRKY14</i> /Eucgr.C01943.1	Chr03:33788800..33789808
	Eucgr.C01940.1	Chr03:33854754..33856233
Grupo 2	<i>EgrWRKY16</i> /Eucgr.C02481.1	Chr03:50129514..50135906
	Eucgr.C02487.1 ^{a*}	Chr03:50061371..50062220
Grupo 3	<i>EgrWRKY18</i> /Eucgr.C02659.1	Chr03:52809823..52812346
	<i>EgrWRKY19</i> /Eucgr.C02660.1	Chr03:52819310..52821678
Grupo 4	<i>EgrWRKY63</i> /Eucgr.J00106.1	Chr10:1369903..1371673
	<i>EgrWRKY64</i> /Eucgr.J00107.1	Chr10:1375836..1379405
Grupo 5	<i>EgrWRKY66</i> /Eucgr.K01151.1	Chr11:14822433..14824983
	Eucgr.K01169.1	Chr11:15121821..15125236

^a Sequências não classificadas em nenhum grupo devido à ausência do domínio *WRKY*, ausência de *Zinc-finger like* e/ou domínios incompletos

*Sequências excluídas de análise filogenética

Fonte: Da autora (2019).

Diferindo do exposto neste trabalho, Fan et al. (2018) identificou 28 genes *EgrWRKY* agrupados em 13 regiões de eventos de duplicação em tandem, sendo que 3 dos grupos, não pertenciam ao mesmo grupo ou subgrupo. A abordagem para identificação das duplicações no genoma aplicado pelo autores, sugere que uma região cromossômica onde é possível a observação de dois ou mais genes em uma distância de 200 kb pode ser definida como um agrupamento de genes (HOLUB, 2001). Essa abordagem não é consenso entre os trabalhos, sendo que alguns, fixam distâncias diferentes (HUANG et al., 2012). No presente estudo, os eventos de duplicação identificados estavam presentes na distância máxima de 10 genes. A identificação de poucos locais de duplicação indicam que a distância fixada de 10 genes provavelmente é menor que a utilizada por Fan et al. (2018).

Das duplicações encontradas, as sequências do grupo 2, 3 e 4 (TABELA 2) são condizentes com as sequências encontradas e relatadas na Tabela 1, juntamente com as encontradas por Fan et al. (2018). No entanto, os grupos 1 e 5 não apresentaram esta relação e não são descritas no trabalho anterior. A sequência Eucgr.C01940.1 não apresenta o domínio

conservado WRKYGQK e o *zinc-finger like* (APÊNDICE G – A), porém apresenta 66% de identidade com a sequência *EgrWRKY14* (APÊNDICE G – B). Possivelmente, no processo de duplicação em tandem ocorreu duplicação apenas de parte do gene analisado (ZHANG, 2003) ou a sua anotação no genoma de eucalipto não foi realizada de forma correta. O quinto grupo de duplicação presente no cromossomo 11 pode ter sido gerado a muito tempo no processo evolutivo. A sequência Eucgr.K01169.1 não apresenta relação com *WRKY* e possui a presença de um domínio conservado RAS, que atuam na sinalização de diversos estímulos intracelulares, inclusive na sinalização que controla a transcrição de genes no processo de diferenciação celular (ROJAS et al., 2012) (APÊNDICE H). Neste caso, durante o processo evolutivo pode ter ocorrido mudanças na sequência, como mutação em nucleotídeo, conferindo a este gene nova função (neofuncionalização) (WANG et al., 2011b).

O genoma de eucalipto apresenta a maior proporção de duplicações em tandem até o momento em relação as plantas. Dos 36.376 genes codificadores de proteínas, 34% ocorreram de duplicações em tandem (MYBURG et al., 2014). Essas duplicações resultam de cruzamentos desiguais e são caracterizadas como múltiplos membros de uma família ocorrendo em uma mesma região intergênica ou em regiões intergênicas vizinhas (CANNON et al., 2004; RAMAMOORTHY et al., 2008). Acredita-se que as duplicações em tandem podem estar envolvidas nas respostas a estresse biótico, visto que nestes casos a planta requer uma resposta rápida, que é facilitada pela presença de mais de um gene duplicado (HANADA et al., 2008).

Juntamente com as duplicações em tandem, as duplicações segmentares também proporcionam expansões em famílias gênicas. Essas duplicações ocorrem a partir de poliploidia seguida de rearranjos cromossômicos (YU et al., 2005; ZHU et al., 2014). Mesmo apresentando duplicações segmentares, nenhum *EgrWRKY* foi identificado dentro das 126 duplicações segmentares presentes no genoma, indicando que as duplicações em tandem foram a principal causa da expansão desta família em eucalipto (FAN et al., 2018). Expansão de famílias *WRKY* por duplicação em tandem foi observada em diferentes espécies, como *Solanum lycopersicum* (HUANG et al., 2012), *Populus trichocarpa* (HE et al., 2012), *Gossypium raimondii* e *Gossypium hirsutum* (DOU et al., 2014) e *Brassica napus* (HE et al., 2016b), que também apresentam taxas de duplicações segmentares na família *WRKY*, porém, são relativamente baixas em comparação a duplicação em tandem. Enquanto outras, possuem apenas este tipo de duplicação em seu genoma [*Salix suchowensis* (BI et al., 2016)].

Além do processo de duplicação, a identificação de parálogos é importante em famílias multigênicas pela possibilidade de estar relacionada a eventos de poliploidização em

angiospermas, através de duplicações retidas nos genomas de plantas existentes e também para descobrir potenciais redundâncias de genes (SANTOS et al., 2017; WANG et al., 2011b).

Identificou-se 16 pares de parálogos no genoma de eucalipto correspondente a família *WRKY* (TABELA 3; FIGURA 3) que se apresentam distribuídos nos três grupos.

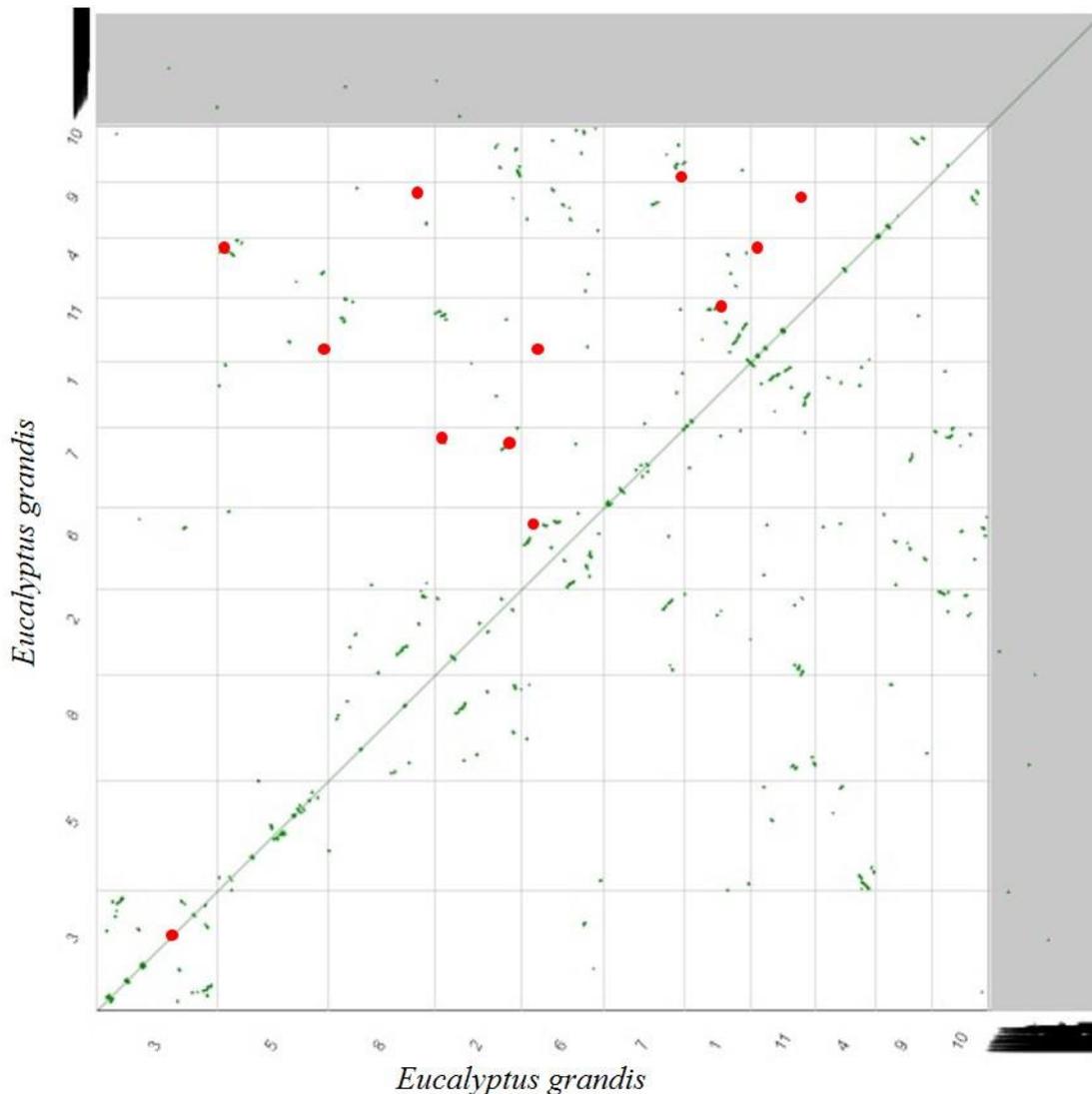
Tabela 3 – Identificação dos pares de parálogos em microsintenia com o genoma de *E. grandis*

Par de Parálogos	Gene/Loci	Cromossomo
Par 1	<i>EgrWRKY1</i> /Eucgr.A01195.1	Chr01:24109469..24114654
	<i>EgrWRKY73</i> /Eucgr.K03196.1	Chr11:39938144..39943442
Par 2	<i>EgrWRKY8</i> /Eucgr.B00437.1	Chr02:4107965..4110123
	<i>EgrWRKY47</i> /Eucgr.G02535.1	Chr07:46171130..46173316
Par 3	<i>EgrWRKY9</i> /Eucgr.B03165.1	Chr02:52082194..52085942
	<i>EgrWRKY45</i> /Eucgr.G02459.1	Chr07:45459770..45465360
Par 4	<i>EgrWRKY10</i> /Eucgr.B03189.1	Chr02:52249292..52254601
	<i>EgrWRKY46</i> /Eucgr.G02469.1	Chr07:45554940..45558600
Par 5	<i>EgrWRKY16</i> /Eucgr.C02481.1	Chr03:50129514..50135906
	<i>EgrWRKY17</i> /Eucgr.C02545.1	Chr03:50647184..50653433
Par 6	<i>EgrWRKY23</i> /Eucgr.D01809.1	Chr04:31560041..31561146
	<i>EgrWRKY32</i> /Eucgr.E00096.1	Chr05:827344..830213
Par 7	<i>EgrWRKY24</i> /Eucgr.D01811.1	Chr04:31572235..31573846
	<i>EgrWRKY33</i> /Eucgr.E00098.1	Chr05:834768..836429
Par 8	<i>EgrWRKY25</i> /Eucgr.D02324.1	Chr04:36494400..36495993
	<i>EgrWRKY33</i> /Eucgr.E00098.1	Chr05:834768..836429
Par 9	<i>EgrWRKY26</i> /Eucgr.D02326.1	Chr04:36501912..36502909
	<i>EgrWRKY32</i> /Eucgr.E00096.1	Chr05:827344..830213
Par 10	<i>EgrWRKY27</i> /Eucgr.D02359.1	Chr04:36823599..36826031
	<i>EgrWRKY69</i> /Eucgr.K00331.1	Chr11:2897922..2900006
Par 11	<i>EgrWRKY31</i> /Eucgr.E04011.1	Chr05:71484959..71487619
	<i>EgrWRKY74</i> /Eucgr.K00786.1	Chr11:9312999..9315953
Par 12	<i>EgrWRKY41</i> /Eucgr.F00621.1	Chr06:9156274..9162386
	<i>EgrWRKY38</i> /Eucgr.F03522.1	Chr06:46372354..46377426
Par 13	<i>EgrWRKY35</i> /Eucgr.F00740.1	Chr06:10610307..10615073
	<i>EgrWRKY74</i> /Eucgr.K00786.1	Chr11:9312999..9315953
Par 14	<i>EgrWRKY48</i> /Eucgr.G03144.1	Chr07:52444610..52447523
	<i>EgrWRKY64</i> /Eucgr.J00107.1	Chr10:1375836..1379405
Par 15	<i>EgrWRKY55</i> /Eucgr.H03349.1	Chr08:63986321..63988662
	<i>EgrWRKY57</i> /Eucgr.I01633.1	Chr09:26259094..26260867
Par 16	<i>EgrWRKY58</i> /Eucgr.I01927.1	Chr09:29223497..29225818
	<i>EgrWRKY70</i> /Eucgr.K02453.1	Chr11:32565295..32569459

Fonte: Da autora (2019).

Quatro pertencem ao grupo I (Par 1, 4, 5 e 12), quatro ao subgrupo II-b (Par 2, 11, 13 e 16), quatro ao subgrupo II-c (Par 3, 6, 9 e 15), dois ao subgrupo II-e (Par 7 e 8) e dois ao grupo III (Par 10 e 14). Os pares de parálogos identificados não são relacionados com os eventos de duplicações identificados neste trabalho e por Fan et al. (2018).

Figura 3 – Identificação dos pares de parálogos em microsintenia no o genoma de *E. grandis* distribuídos nos 11 cromossomos.



Pontos vermelhos correspondem as coordenadas dos genes dentro dos respectivos cromossomos.
Fonte: Da autora (2019).

É amplamente aceito que duplicações podem criar oportunidades de divergência funcional em parálogos (WANG et al., 2009), supondo que o gene duplicado retém a função original da proteína, enquanto a função do gene que deu origem a duplicação, muda por meio do particionamento das funções de uma proteína ancestral não duplicada (WANG et al., 2011a). Se ocorrer divergência funcional entre os genes duplicados, isso deve ser perceptível pelas alterações em suas regiões de codificações (HUANG et al., 2016; WANG et al., 2011a).

Parálogos encontrados em famílias *WRKY* apresentam, ou não, a mesma função. Análises comparativas em expressão de genes parálogos *WRKY* em *Brassica oleracea* apresentam divergências de expressão em diferentes tecidos testados, indicando que

modificações nas expressões espaço-temporais é um dos mais relevantes indicadores de diferença funcional nestes genes duplicados (YAO et al., 2015). No entanto, *OsWRKY24*, *OsWRKY53* e *OsWRKY70* são parálogos próximos e funcionam parcialmente de forma redundante como repressores na regulação da sinalização de giberelina e ABA durante o processo de germinação em células de aleurona (ZHANG et al., 2015).

O estudo de ortólogos pode indicar hipóteses sobre as funções genéticas comuns em diferentes espécies (SANTOS et al., 2017). A análise do genoma de eucalipto contra o de *A. thaliana* determinou a presença de 23 pares de possíveis ortólogos (TABELA 4; FIGURA 4), sendo que apenas o par 14 não apresenta relação sintênica com genes *WRKY* de *A. thaliana*.

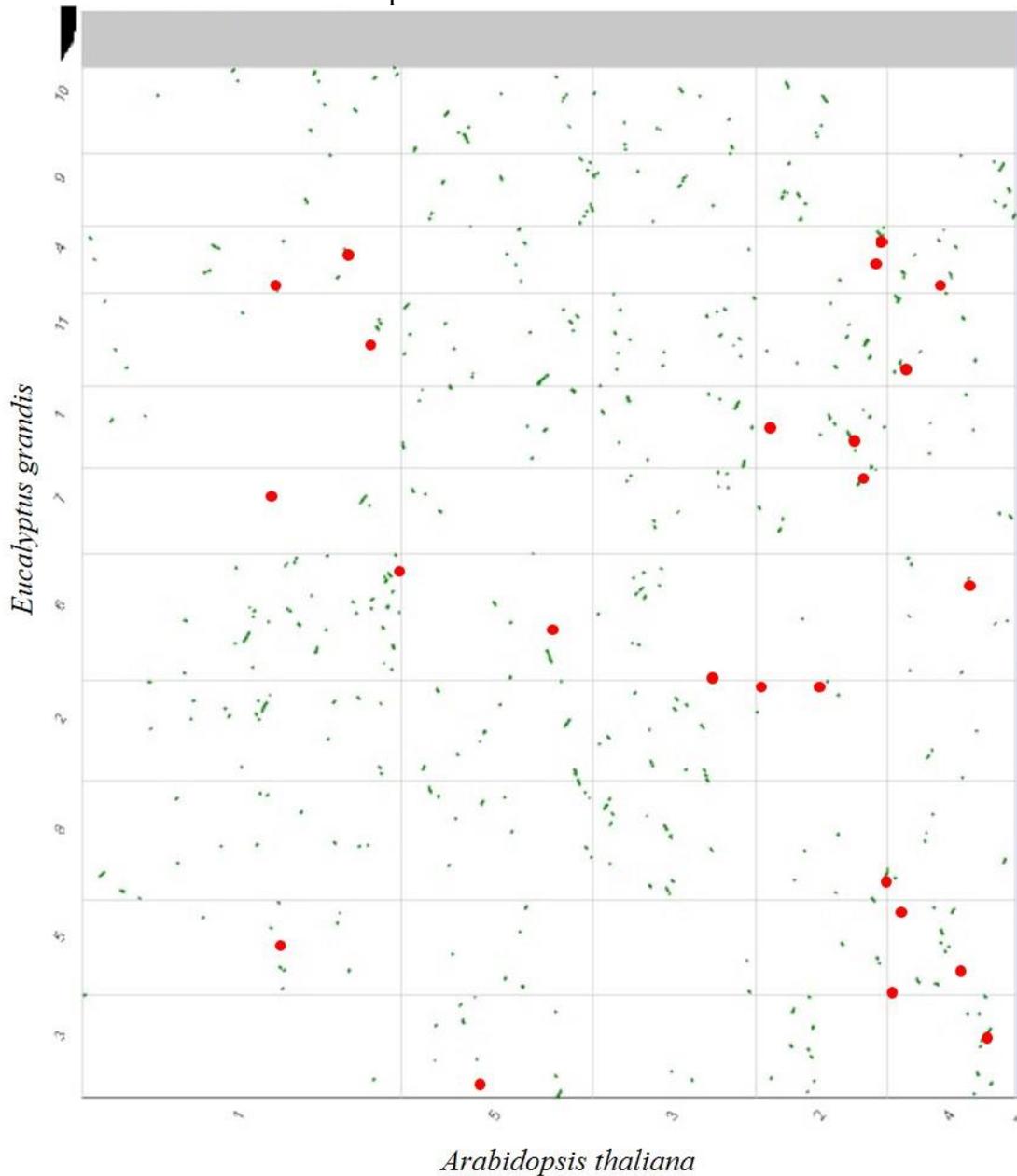
Tabela 4 – Análise sintênica entre os genes *WRKY* de *E. grandis* e *A. thaliana*.

Pares Sintênicos	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Par 1	<i>EgrWRKY3</i> /Eucgr.A01053.1	AT2G04880.1/ <i>AtWRKY1</i>
Par 2	<i>EgrWRKY1</i> /Eucgr.A01195.1	AT2G37260.1/ <i>AtWRKY44</i>
Par 3	<i>EgrWRKY10</i> /Eucgr.B03189.1	AT2G03340.1/ <i>AtWRKY3</i>
Par 4	<i>EgrWRKY12</i> /Eucgr.B04010.1	AT2G30250.1/ <i>AtWRKY25</i>
Par 5	<i>EgrWRKY13</i> /Eucgr.C00675.1	AT5G26170.1/ <i>AtWRKY50</i>
Par 6	<i>EgrWRKY17</i> /Eucgr.C02545.1	AT4G30935.1/ <i>AtWRKY32</i>
Par 7	<i>EgrWRKY28</i> /Eucgr.D00336.1	AT1G29860.1/ <i>AtWRKY71</i> AT4G18170.1/ <i>AtWRKY28</i>
Par 8	<i>EgrWRKY22</i> /Eucgr.D01219.1	AT2G44745.1/ <i>AtWRKY12</i>
Par 9	<i>EgrWRKY23</i> /Eucgr.D01809.1	AT1G64000.1/ <i>AtWRKY56</i>
Par 10	<i>EgrWRKY26</i> /Eucgr.D02326.1	AT2G46130.1/ <i>AtWRKY43</i>
Par 11	<i>EgrWRKY33</i> /Eucgr.E00098.1	AT4G01250.1/ <i>AtWRKY22</i>
Par 12	<i>EgrWRKY34</i> /Eucgr.E00850.1	AT4G23810.1/ <i>AtWRKY53</i>
Par 13	<i>EgrWRKY31</i> /Eucgr.E04011.1	AT4G04450.1/ <i>AtWRKY42</i>
Par 14	<i>EgrWRKY37</i> /Eucgr.F00187.1	AT3G50180.1
Par 15	<i>EgrWRKY36</i> /Eucgr.F01981.1	AT5G56270.1/ <i>AtWRKY2</i>
Par 16	<i>EgrWRKY38</i> /Eucgr.F03522.1	AT4G26640.2/ <i>AtWRKY20</i>
Par 17	<i>EgrWRKY39</i> /Eucgr.F03955.1	AT1G80840.1/ <i>AtWRKY40</i>
Par 18	<i>EgrWRKY46</i> /Eucgr.G02469.1	AT1G13960.1/ <i>AtWRKY4</i>
Par 19	<i>EgrWRKY48</i> /Eucgr.G03144.1	AT2G40740.1/ <i>AtWRKY55</i>
Par 20	<i>EgrWRKY51</i> /Eucgr.H00996.1	AT2G47260.1/ <i>AtWRKY23</i>
Par 21	<i>EgrWRKY74</i> /Eucgr.K00786.1	AT4G04450.1/ <i>AtWRKY42</i>
Par 22	<i>EgrWRKY29</i> /Eucgr.K01971.1	AT1G30650.1/ <i>AtWRKY14</i>
Par 23	<i>EgrWRKY70</i> /Eucgr.K02453.1	AT1G69810.1/ <i>AtWRKY36</i>

Fonte: Da autora (2019).

Dos resultados obtidos, os pares 1, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 20 e 21 foram agrupados próximos na árvore filogenética (FIGURA 1), sendo que a proteína *AtWRKY42* é paróloga a dois *WRKY* de eucalipto, *EgrWRKY31* e *EgrWRKY74*. As sequências de *A. thaliana* observadas nos pares de parálogos 2, 4, 6, 9, 16, 19, 22 e 23 não foram utilizadas na árvore filogenética porque ainda não possuem função biológica definida.

Figura 4 – Análise sintênica entre os genes *WRKY* de *E. grandis* e *A. thaliana* distribuídos nos 11 cromossomos de eucalipto.



Pontos vermelhos correspondem as coordenadas dos genes dentro dos respectivos cromossomos.
Fonte: Da autora (2019).

Nos resultados obtidos, os genes *EgrWRKY31* e *EgrWRKY74* são parálogos entre si e possível ortólogos de *AtWRKY42*, que é responsável pela modulação da translocação de Pi através da expressão de *PHO1* (*phosphate1*) (SU et al., 2015). Os possíveis ortólogos *AtWRKY3* (LAI et al., 2008), *AtWRKY4* (LAI et al., 2008) e *AtWRKY28* (WU et al., 2011) presente nos pares 3, 18 e 7, atuam na regulação positiva a patógenos necrotróficos em plantas. Os possíveis ortólogos *AtWRKY71* e *12* (pares 7 e 8) atuam diretamente no processo de floração. O primeiro,

quando superexpresso, apressa o florescimento através da ativação direta de *FT* (*FLOWERING LOCOS T*) e *LFY* (*LEAFY*) (YU et al., 2016) e o segundo, quando inativado causa atraso na floração de arabis em dia curto (LI; WANG; YU, 2016).

AtWRKY50 (par 5) é um ativador da expressão de *PR1* (proteínas relacionadas a patogênese) induzido por AS (HUSSAIN et al., 2018). O possível ortólogo *AtWRKY23* (par 20) é responsável pela regulação do transporte direcional de auxina nas células da raiz, estimulando a biossíntese de flavonoides, e também atua no processo embriogênico, dependente ou não de auxina (GRUNEWALD et al., 2012, 2013). *AtWRKY43* (par 10) codifica um regulador positivo na regulação de genes dependente de ABA e atua como um potente modulador da dessaturação de ácidos graxos e preenchimento de sementes, resultando no aumento de tolerância a estresses abióticos (GEILEN et al., 2017). Outros possíveis ortólogos que apresentam sensibilidade ao ABA são *AtWRKY1* e *AtWRKY2* (pares 1 e 15). *AtWRKY1* controla a transcrição de *MYB2*, *ABCG40*, *DREB1A* e *ABI5* durante respostas a seca ou tratamento com ABA e, possivelmente, atua como regulador negativo na sinalização de ABA em células guarda (QIAO; LI; ZHANG, 2016). Já o possível ortólogo *AtWRKY2* afeta a germinação de sementes e a parada do desenvolvimento pós-germinação induzidos pelo ABA (JIANG; YU, 2009).

Afirmar que um fator de transcrição desempenha apenas uma função é incorreto, devido, principalmente, à complexidade das respostas a diferentes estímulos e pela regulação multigênica realizada por essas proteínas (WANG et al., 2016). Esse processo é demonstrado pelos possíveis ortólogos *AtWRKY22*, *AtWRKY53* e *AtWRKY40* (pares 11, 12 e 17). *AtWRKY22* desempenha papel na sinalização de AS e AJ, devido a reprogramação transcricional em resposta a estímulos mecânicos e afídeos (KLOTH et al., 2016); também protege as plantas durante o alagamento desencadeando a imunidade inata via *AtWRKY22*, protegendo as plantas do ataque de patógenos durante ou após o alagamento (HSU et al., 2013); e, por fim, participa da transdução de sinal de senescência induzida por cor escura (ZHOU; JIANG; YU, 2011). *AtWRKY53* previne o fechamento estomático reduzindo a quantidade de H₂O₂ e mantendo a abertura estomática através da degradação de amido das células guarda em condições de seca, atuando, então, como um regulador negativo nestas condições (SUN; YU, 2015). Outras funções ocorrem na regulação positiva de genes específicos responsáveis pelo processo de senescência e na regulação dos genes da CAT, indicando atuação em resposta aos níveis de estresse oxidativo (MIAO et al., 2004). Por fim, *AtWRKY40* atua como um repressor transcricional em células vegetais em resposta ao ABA, possivelmente modulando os genes regulados por esta molécula (CHEN et al., 2010), mas também, na sinalização endógena desencadeada por patógenos e respostas de defesa das plantas (PANDEY et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos, um possível alvo para posteriores estudos seria a sequência de *EgrWRKY26/Eucgr.D02326.1*, visto que seu possível ortólogo (*AtWRKY43*) apresenta relação com ABA e aumento de tolerância a estresses abióticos (GEILEN et al., 2017).

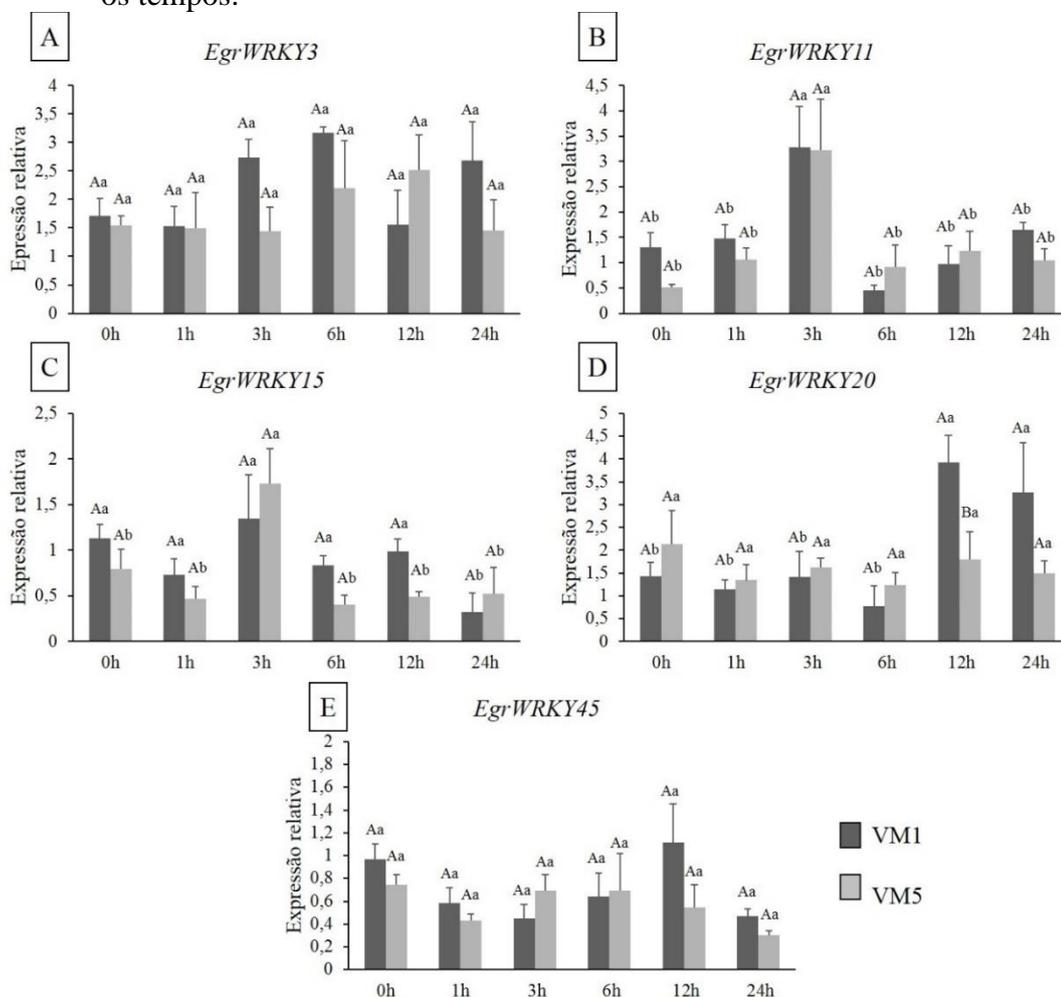
4.4 Expressão relativa responsiva a moléculas sinalizadoras e déficit hídrico

A modulação transcricional é essencial nas complexas vias de transdução de sinais que as plantas geram em resposta a diferentes estímulos, principalmente a estresses bióticos e abióticos (CHI et al., 2013). A utilização de moléculas sinalizadoras destes processos é indicada para rastrear genes candidatos a engenharia genética responsivos a estas condições e explorar suas potenciais funções (HE et al., 2016a).

No presente estudo foram selecionados três genes que apresentam alta expressão (*EgrWRKY3*, *EgrWRKY11* e *EgrWRKY20*) durante o déficit hídrico a partir de biblioteca de RNA-seq de seca (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012) (APÊNDICE B) e dois genes (*EgrWRKY15* e *EgrWRKY45*) a partir das redes de co-expressão (APÊNDICE C). A expressão relativa foi analisada após a aplicação de diferentes moléculas sinalizadoras (MeJa, AS, ABA E H₂O₂) e indução de déficit hídrico com PEG6000 em dois clones contrastantes ao déficit hídrico (VM01 – tolerante e VM05 – sensível a déficit hídrico).

O fitormônio jasmonato (JA) é um importante regulador celular, envolvido em inúmeros processos durante o desenvolvimento das plantas (DAR et al., 2015). A utilização de MeJa, composto sintetizado nas plantas (CHEONG; CHOI, 2003), como ativador da cascata de sinalização ocasionou a modulação transcricional estatisticamente significativa em três dos cinco genes analisados (*EgrWRKY11*, *EgrWRKY15* e *EgrWRKY20*) (FIGURA 5). *EgrWRKY3* e *EgrWRKY45* apresentaram expressão relativa estável, demonstrando não serem regulados por MeJa (FIGURA 5E). *EgrWRKY11* apresentaram aumento na expressão após 3h de exposição ao tratamento nos dois clones analisados, voltando a níveis basais após este período (FIGURA 5B). Os níveis de expressão de *EgrWRKY15* permaneceram baixos, sendo que no clone VM1, ocorreu redução da expressão após 24h (FIGURA 5C). O clone VM5 apresentou aumento da expressão as 3h, porém não diferindo do clone VM1. *EgrWRKY20* apresentou o dobro da expressão apenas para o clone VM1 após 12h de exposição da molécula sinalizadora MeJa (FIGURA 5D).

Figura 5 – Perfis de expressão relativa de genes *EgrWRKY* em folhas de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake com aplicação de 100 μ M de MeJa. O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos.



Fonte: Da autora (2019).

A importância real desta molécula está associada a sinalização ativada por estresse biótico (SANTINO; TAURINO; DOMENICO, 2013). Atua, juntamente com etileno, na resposta sistêmica induzida a ataque de patógenos necrotróficos e alguns microorganismos não patogênicos (GLAZEBROOK, 2005; PIETERSE et al., 2014). *AtWRKY3* (LAI et al., 2008), *AtWRKY4* (LAI et al., 2008), *AtWRKY33* (ZHENG et al., 2006) e *PtWRKY40* (KARIM et al., 2015), atuam diretamente na resistência a patógenos necrotróficos, no caso *Botrytis cinerea*, via ativação de genes de defesa, como *PDF1.2* (*jasmonate-regulated plant defensin*), *VSP2* (*vegetative storage protein 2 gene*) e *PR3* (*pathogen-inducible genes*).

A expressão relativa dos genes analisadas em experimento realizado por Fan et al. (2018) foram regulados positivamente após 1h e 6h de aplicação de MeJa. Porém após 24h

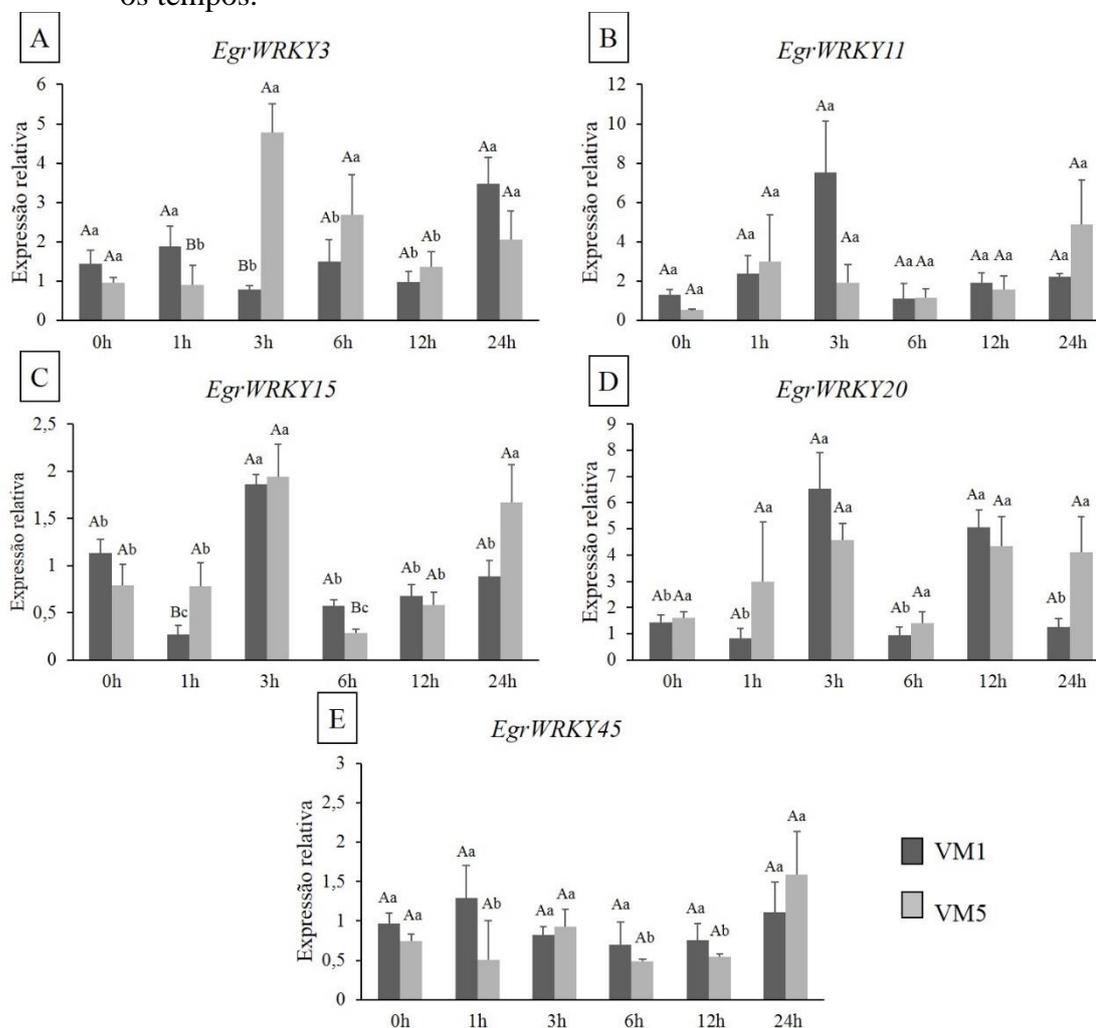
todos os genes foram regulados negativamente, reativando sua expressão após 168h. Esses resultados corroboram com o exposto neste trabalho, diferindo somente na regulação negativa após 24h de exposição ao tratamento, onde não ocorreu regulação negativa dos genes.

Plantas de *Citrullus lanatus* (melancia) apresentaram o mesmo padrão de expressão relativa em genes *WRKY* observados, utilizando a mesma aplicação e concentração (YANG et al., 2018). A expressão da maioria dos genes se deu entre 1 e 6h de aplicação, diminuindo posteriormente após este tempo. Em outros casos, como em *Triticum aestivum* (trigo), *TaWRKY1* apresentou baixas taxas de expressão quando submetido a MeJa (HE et al., 2016a). No entanto, *TaWRKY33* apresentou expressão 50 vezes maior que o controle. Juntamente com os dados de aplicação de ABA, os autores propuseram que essas duas moléculas podem modular a expressão gênica relacionada ao estresse abiótico e biótico, pela ativação coordenada entre estas duas vias, apesar das interações antagônicas entre ABA e JA/ET (HE et al., 2016a).

O AS desempenha papel crítico nas respostas de resistência sistêmica adquirida em plantas pela regulação, principalmente, de proteínas relacionadas a patogênese (*PRI*) (GAO et al., 2015). A expressão ativada por moléculas sinalizadoras, como AS, pode indicar uma possível participação nesta rota de sinalização. Como demonstrado na Figura 6, o AS regulou a expressão em três vezes mais de *EgrWRKY3* após 3h no clone VM5, voltando a sua expressão basal após 6h (FIGURA 6A). Já o clone VM1 foi regulado negativamente após 3h de contato com a molécula, voltando sua expressão após 24h.

A mesma molécula sinalizadora foi responsável por regular a expressão de *EgrWRKY20* (FIGURA 6D) no clone VM1 após 3h. *EgrWRKY15* aumentou a expressão relativa em VM1 e VM5 após 3h, voltando a expressão basal após 6h, e aumentou a expressão em VM5 após 24h de aplicação (FIGURA 6C). *EgrWRKY45* apresentou expressão relativa estável para o clone VM1, no entanto, o clone VM5 apresentou flutuações na expressão conforme o tempo, sendo regulado negativamente quando comparado ao controle (FIGURA 6E).

Figura 6 – Perfis de expressão relativa de genes *EgrWRKY* em folhas de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake com aplicação de 100 μ M de AS. O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos.



Fonte: Da autora (2019).

A expressão dos genes devido a aplicação de AS em *E. grandis* (FAN et al., 2018) corroboram com a expressão relativa de *EgrWRKY3*, *EgrWRKY11* e *EgrWRKY15* neste trabalho. A expressão de *EgrWRKY20* e *EgrWRKY45* diferiram dos resultados encontrados neste estudo, pois foram regulados negativamente após a aplicação, voltando a ser expresso somente após 168h. Esse fato pode ser explicado devido a expressão desses FTs serem genótipo dependente (LI et al., 2014).

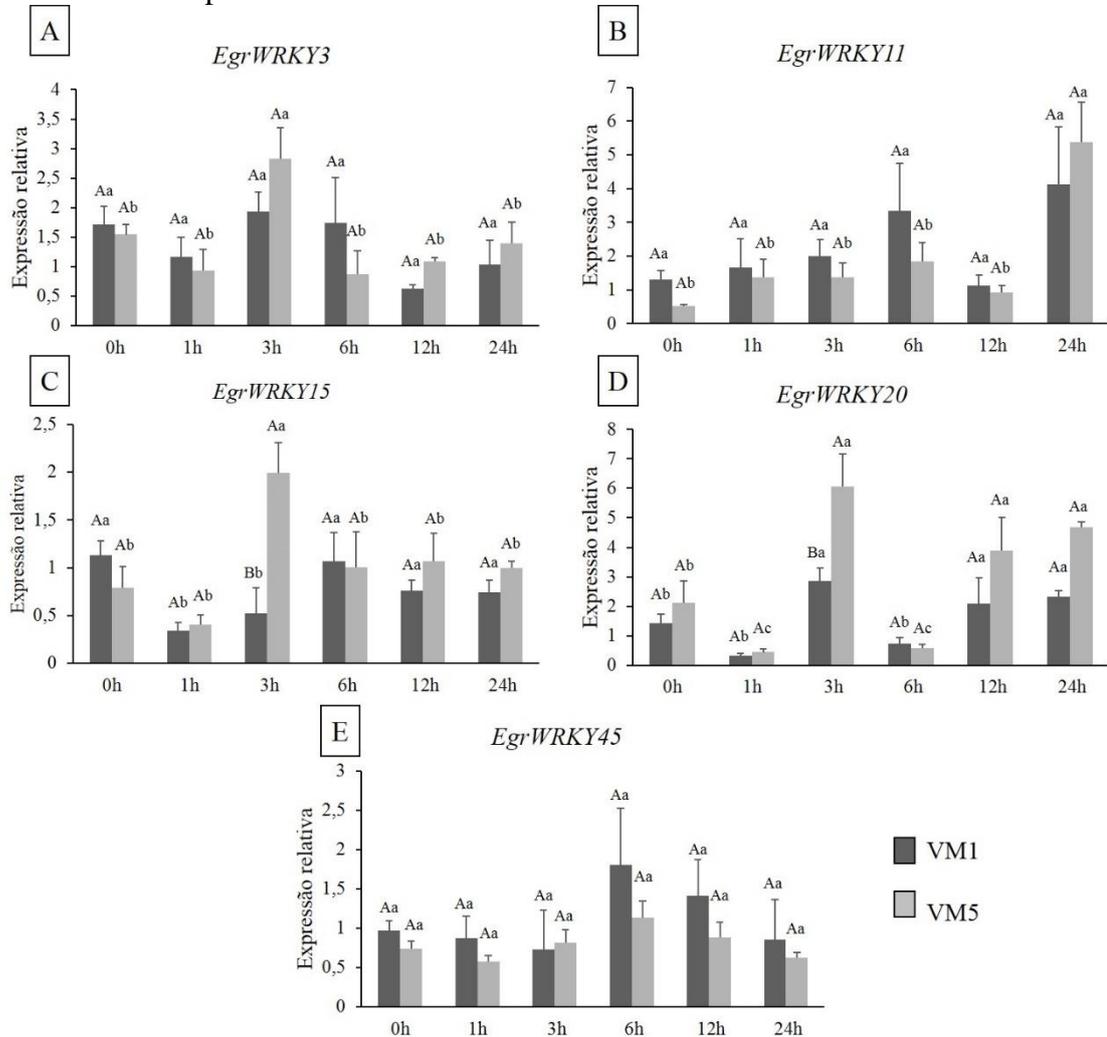
Durante a aplicação de AS em *Arachis hypogaea* L. (amendoim), 10 dos 13 genes *WRKY* avaliados apresentaram ser regulados negativamente por essa molécula (SONG et al., 2016), resultado oposto ao encontrado neste trabalho, onde somente *EgrWRKY45* foi regulado desta maneira. Outra observação obtida em amendoim foi o perfil de expressão diferente entre os

tratamentos com AS e MeJa para os mesmos genes, devido a regulação negativa por AS e positiva por MeJa, indicando que esses FT podem atuar de forma oposta na sinalização de estresse biótico, devido ao antagonismo entre as duas vias (SONG et al., 2016). A diferença de expressão observada nos *EgrWRKY* foi tempo dependente, sendo que a diferença entre os clones utilizados variou somente para dois genes, *EgrWRKY20* por MeJa e *EgrWRKY3* por AS. Esses resultados podem indicar que, por mais que as vias sejam antagonicas na sinalização, elas podem atuar de forma sinérgica em alguns casos, como relatado em tabaco (MUR et al., 2006). Corroborando com essa afirmação, *OsWRKY46b* apresentou níveis parecidos de expressão com ativação ao mesmo tempo pelas duas moléculas citadas (RAMAMOORTHY et al., 2008).

O AS participa ativamente na sinalização e proteção das plantas durante déficit hídrico. A aplicação de AS em *Eucalyptus globulus* melhorou a tolerância das plantas a este estresse, aprimorou o metabolismo primário (taxa fotossintética e açúcares solúveis), metabolismo secundário e, também, os mecanismos de defesa (aumento da taxa de fenóis totais e menor peroxidação lipídica) (JESUS et al., 2015). A aplicação utilizada neste estudo, 100 µM de AS, foi menor do que utilizada no estudo relatado anteriormente. Uma hipótese possível é que a aplicação de níveis maiores de AS poderia induzir uma maior expressão dos genes analisados, que poderiam atuar ativamente nas rotas de estresse hídrico, talvez ocasionando, uma maior resistência em eucalipto.

A aplicação de ABA resultou na alteração de expressão dos genes *EgrWRKY3*, *EgrWRKY11*, *EgrWRKY15* e *EgrWRKY20* (FIGURA 7). A expressão relativa de *EgrWRKY3* (FIGURA 7A) e *EgrWRKY11* (FIGURA 7B) não diferiu entre os clones, no entanto VM5 apresentou maior expressão após 3h para o gene *EgrWRKY3*, voltando à níveis basais após este tempo, enquanto a expressão relativa de *EgrWRKY11* aumentou em três vezes após 24h. *EgrWRKY15* foi regulado negativamente após as primeiras horas de aplicação de ABA em VM1, voltando a expressão basal em 6h (FIGURA 7C). Já para no clone VM5, ocorreu aumento de expressão após 3h. A expressão relativa do gene *EgrWRKY20* oscilou conforme a variação do tempo, apresentando um pico de expressão nos dois clones (que diferiram entre si – VM5 apresentou maior expressão) após 3h de contato com a molécula sinalizadora, antecedido e precedido de uma regulação negativa da expressão (FIGURA 7D). *EgrWRKY45* apresentou expressão relativa estável (FIGURA 7E).

Figura 7 – Perfis de expressão relativa de genes *EgrWRKY* em folhas de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake com aplicação de 100 μ M de ABA. O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos.



Fonte: Da autora (2019).

A utilização de ABA como molécula sinalizadora indicou uma maior expressão em plantas do clone VM5, caracterizado como sensível a seca. Estes genes podem mediar respostas a estresses por sal e seca a partir da modulação do conteúdo de ABA, aumentando os níveis de transcrito de genes que respondem a esta sinalização, como ocorre em *TaWRKY44* (WANG et al., 2015). A tolerância demonstrada pelo clone VM1 pode ser ativada por rotas distintas as do clone VM5, como a não ativação por ABA, ou, a cascata de sinalização desencadeada por esse hormônio requer um aumento na concentração dessa molécula para regulação destes genes. Uma das resposta desta sinalização é o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) induzido por ABA em plantas

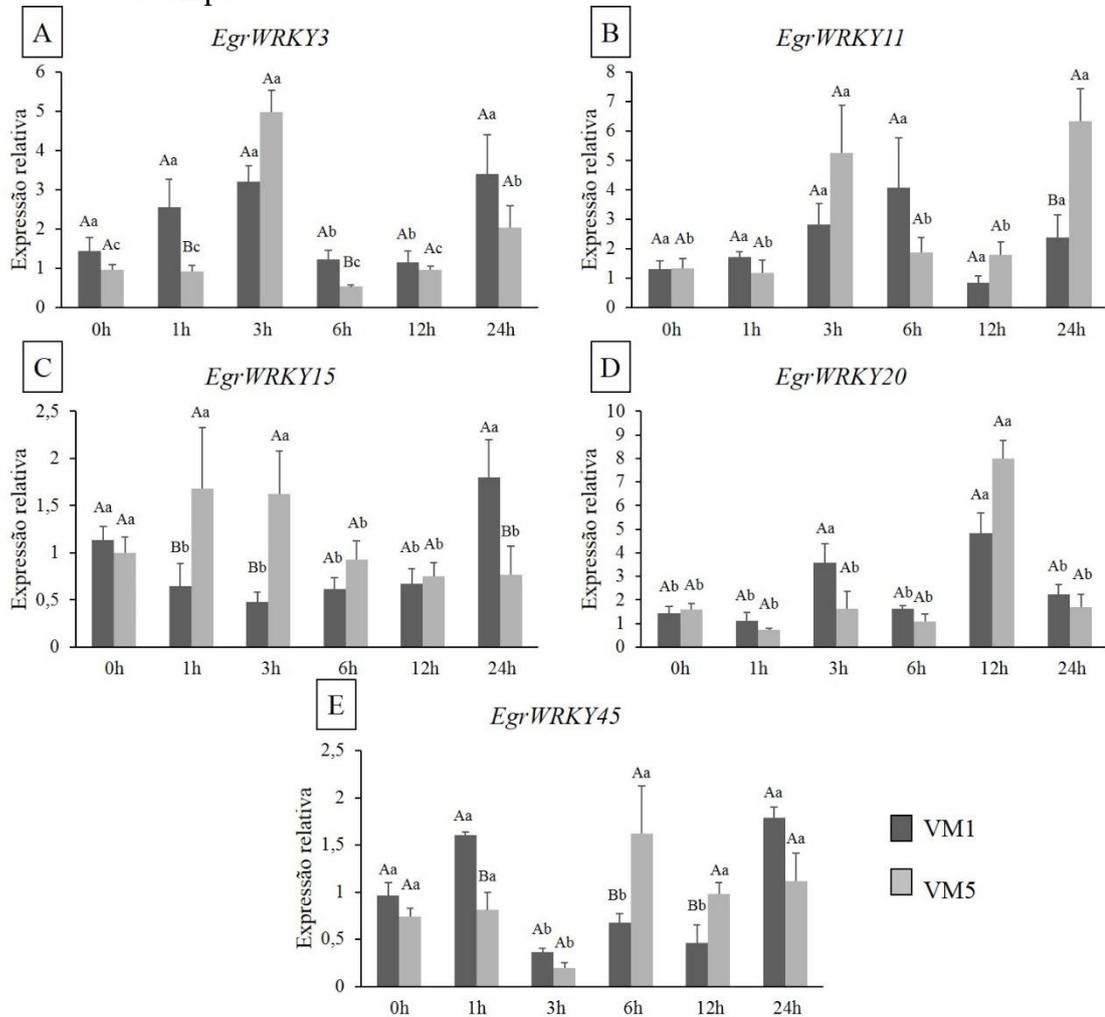
superexpressando *ZmWRKY4* (HONG et al., 2017) e a regulação positiva de *RD29A*, *NCED3* e *ABA3* (genes responsivos ao estresse) por *AtWRKY57*, aumentando a resistência das plantas a seca (JIANG; LIANG; YU, 2012). Linhas transgênicas que expressam *CmWRKY1* apresentam regulação negativa de genes de inibição da rota ABA-dependente, como *PP2C*, *ABI1* e *ABI2*. Corroborando a este resultado, esse gene é responsável por regular positivamente *PYL2*, *SnRK2.2*, *ABF4*, *MYB2*, *RAB18* e *DREB1A*, ativados em momentos de estresse hídrico (FAN et al., 2016).

Outra possibilidade perante aos resultados é de que a maior expressão destes genes em VM5 pode ser um indicativo de que possam atuar como reguladores negativos de genes responsivos ao déficit hídrico ou a outros estresses abióticos. Há inúmeros relatos de regulação negativa por genes *WRKY* causada por ABA (CHEN et al., 2010; PANDEY et al., 2010; QIAO; LI; ZHANG, 2016; YANG et al., 2018). Um dos genes caracterizados que atuam desta forma é *AtWRKY1*. Este liga-se a *W-box* presente nos promotores dos genes *MYB2*, *ABCG40*, *DREB1A* e *ABI5*, atuando como um regulador negativo nas respostas ao estresse hídrico e tratamento com ABA (QIAO; LI; ZHANG, 2016). Em trabalho comparando os dois clones analisados, a expressão de *EgrNCED3* e *EgrPYR1*, que atuam na rota ABA-dependente, foram mais expressos no clone tolerante, juntamente com genes *EgrDREB2.5* e *EgrCPK26*, relacionados a rota ABA-independente (MARTINS et al. 2018). A comprovação destas respostas entre os clones corrobora com a possibilidade de atuação como regulador negativo.

Entretanto, a ativação de genes em resposta ao déficit hídrico, assim como outros estresses abióticos, não depende somente de ABA. Relatos na literatura indicam que os *WRKY* são induzidos também pela via ABA-independente (SONG; JING; YU, 2010). *AtWRKY46* é expresso ao longo das raízes laterais durante o seu desenvolvimento. A superexpressão deste gene aumenta o desenvolvimento destas raízes em estresse salino e osmótico. A aplicação de ABA regula negativamente sua expressão, indicando que sua regulação é realizada por um sinal independente de ABA (DING et al., 2014a). Isso possivelmente pode ter ocorrido nos resultados relatados neste trabalho.

H_2O_2 , uma das espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas, é utilizada durante o processo de estresse como molécula sinalizadora devido a sua maior estabilidade e meia-vida mais longa (HUNG; YU; LIN, 2005). Sua aplicação alterou a expressão de todos os genes analisados (FIGURA 8). A expressão de *EgrWRKY3* não apresentou diferença entre os clones, porém em VM1, diminuiu após 3h de aplicação e voltou ao nível normal após 24h (FIGURA 8A). Para o clone VM5, a expressão foi aumentada em quatro vezes após a aplicação, voltando ao normal após 6h e indicando um aumento da expressão no final do experimento.

Figura 8 – Perfis de expressão relativa de genes *EgrWRKY* em folhas de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake com aplicação de 100 μ M de H_2O_2 . O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos.



Fonte: Da autora (2019).

Os dois clones analisados contrastaram na expressão relativa de *EgrWRKY11* entre 12 e 24h, sendo em VM5 mais expresso que em VM1 (FIGURA 8B). A expressão no clone VM1 não apresentou diferença entre os tempos, indicando que *EgrWRKY11* não é regulado significativamente por essa molécula sinalizadora. *EgrWRKY11* apresentou dois picos de expressão relativa em VM5, sendo as 3h e 24h. *EgrWRKY15* foi regulado negativamente em VM1, voltando sua expressão após 24h de tratamento, e também apresentou diminuição da expressão em VM5 após 6h de exposição a H_2O_2 (FIGURA 8C). A expressão relativa de *EgrWRKY20* não diferiu entre os clones, porém VM5 apresentou uma expressão relativa 7 vezes maior após 12h de aplicação (FIGURA 8D). Em VM1, a expressão deste gene apresentou

oscilações durante o andamento do experimento, aumentando a expressão após 3h e 12h. Os dois clones apresentaram diferenças na expressão de *EgrWRKY45*, sendo este mais expresso após 1h em VM1 e 6h em VM5 (FIGURA 8E). A expressão do gene *EgrWRKY45* diminuiu após 3h de tratamento em VM1, voltando ao normal em 24h. No mesmo horário, ocorreu a mesma diminuição na expressão relativa em VM5, porém, após 6h a sua expressão voltou aos mesmos níveis anteriores.

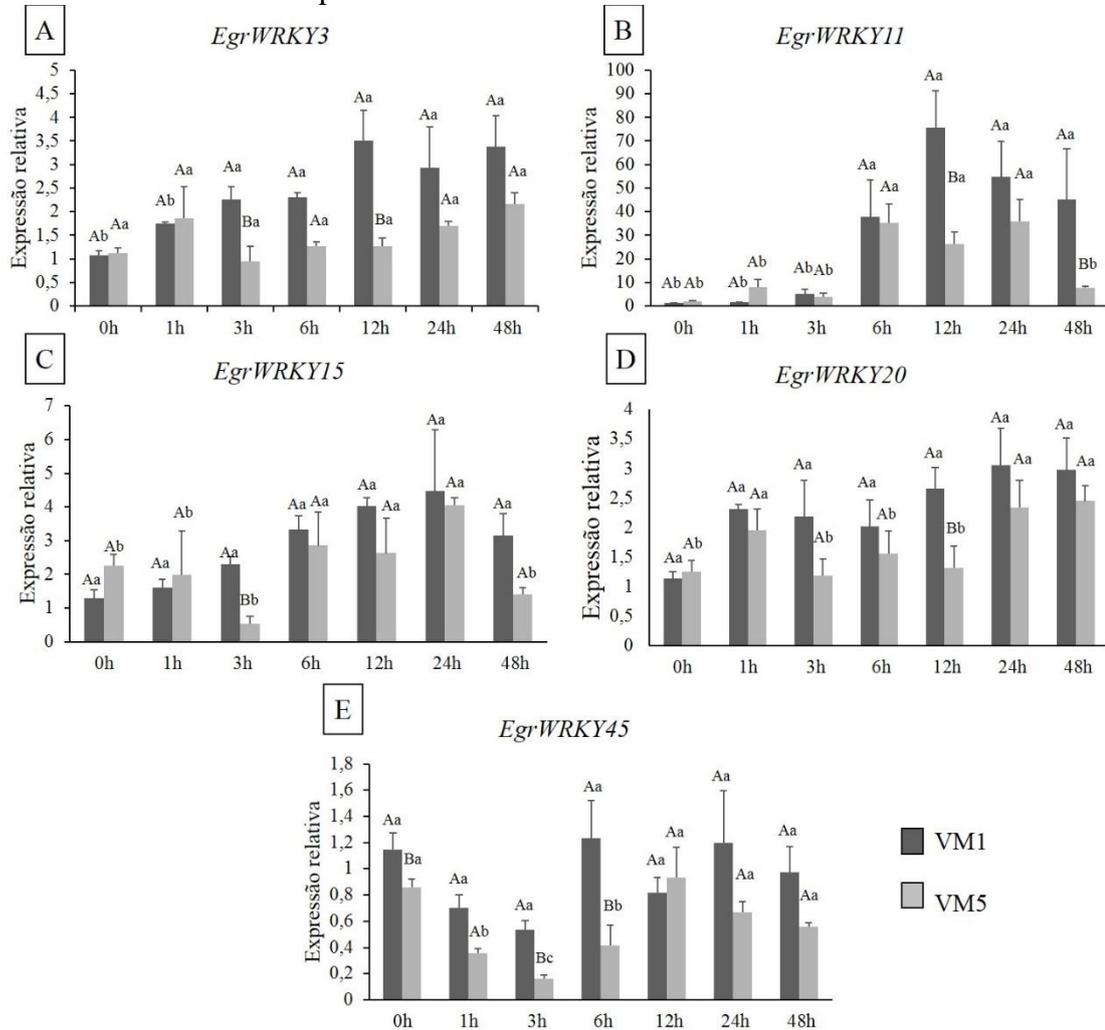
Os genes *EgrWRKY3* e *EgrWRKY11* apresentaram ser mais responsivos a sinalização de H₂O₂ do que por ABA, devido aos níveis de expressão serem mais elevados. Outra interação entre os resultados é referente a *EgrWRKY20*. VM5 apresentou ser ativado inicialmente por ABA a partir de 3h de aplicação (FIGURA 7D). No entanto, quando submetido à H₂O₂, sua expressão foi alterada significativamente após 12h, juntamente com o clone VM1 (FIGURA 8D). Esse mesmo padrão de expressão foi observado em *AtWRKY8*, responsivo a estresse biótico (CHEN; ZHANG; YU, 2010) e *TaWRKY44* responsivo a múltiplos estresses abióticos (WANG et al., 2015). No entanto, para *GmWRKY58* e *GmWRKY76*, os dois tratamentos induziram a expressão dos genes as 3h e 6h, somente (YANG et al., 2016b). Esses resultados indicam que geralmente essas moléculas apresentam padrões de expressões parecidos em diferentes *WRKY*, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho.

Poucos artigos elucidam a forma como essa molécula atua na sinalização de *WRKY*, mas parece estar intimamente relacionada com a ativação a jusante de genes relacionados a enzimas antioxidantes. *CaWRKY27* é um regulador negativo de genes em resposta a estresse térmico, inibindo a expressão de genes que codificam enzimas, como APX, CAT e SOD (DANG et al., 2018). Em contra partida, plantas superexpressando *TaWRKY44* apresentaram aumento da atividade de SOD, CAT e peroxidase, diminuindo assim, os níveis de EROs presente nas plantas (WANG et al., 2015).

O déficit hídrico é o estresse que mais acarreta perda de produtividade em eucalipto, causando danos severos, principalmente em mudas, devido ao sistema radicular não estar bem desenvolvido. O estudo do comportamento destes genes frente a este estresse torna-se importante para identificar o comportamento desses membros *WRKY* no processo de adaptação de clones contrastantes.

O experimento de déficit hídrico ocasionado pelo uso de PEG6000 apresentou alteração na expressão relativa de todos os genes analisados e as plantas aparentaram sentir o estresse a partir de 12h de imposição, principalmente o clone VM5 (FIGURA 9; APÊNDICE J).

Figura 9 – Perfis de expressão relativa de genes *EgrWRKY* na parte aérea de plantas *in vitro* de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake em déficit hídrico induzido por PEG6000. O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos



Fonte: Da autora (2019).

A expressão de *EgrWRKY3* aumentou gradativamente em VM1, diferindo estatisticamente após 3 horas de estresse (FIGURA 9A). O clone VM5 não apresentou alteração na expressão no decorrer do experimento, mas diferiu estatisticamente de VM1 as 3h e as 12 de tratamento. O uso das moléculas sinalizadoras não apresentou alteração significativa na expressão dos genes em VM1, sendo este ativado somente com déficit hídrico. Porém, comparando os níveis de expressão, este gene parece ser regulado por H₂O₂ e AS. Quando analisada a localização deste gene na árvore filogenética (FIGURA 1), este apresenta proximidade com *AtWRKY1*. Como mencionado anteriormente, *AtWRKY1* controla negativamente a transcrição de genes de resposta ao déficit hídrico e não responde a tratamento

com ABA (QIAO; LI; ZHANG, 2016), corroborando com os resultados apresentados por *EgrWRKY3* com a mesma aplicação.

A expressão relativa de *EgrWRKY11* foi super-regulada cerca de 30 vezes após 6h de estresse nos dois clones analisados (FIGURA 9B). Após 12h de tratamento, o clone VM1 dobrou sua expressão em relação ao tempo anterior começando a diferir estatisticamente de VM5 que apresentou níveis de expressão relativa próximos ao anterior. Após 48h de experimento, a expressão relativa de *EgrWRKY11* ainda era 40 vezes maior que o controle em VM1, porém em VM5 os níveis já haviam baixado consideravelmente. A expressão relativa de *EgrWRKY11* foi responsiva aos reguladores relacionados ao estresse biótico, AS e MeJa, mas não a aplicação de ABA e H₂O₂. Porém, como mencionado anteriormente, essas moléculas também apresentam interação em respostas ao estresse abiótico e, possivelmente, as concentrações utilizadas de ABA e H₂O₂ foram baixas para ativar a sua expressão. Outra possibilidade pode estar relacionada ao fato de que alguns *WRKY* participam da rota de síntese de ABA, ativando a expressão de *NCED* por exemplo (JIANG; LIANG; YU, 2012), indicando que a utilização dessa molécula não é necessária para a sua ativação. A imposição de estresse salino em *E. grandis* ocasionou uma regulação negativa do gene *EgrWRKY11* (*EgrWRKY75*) até 168h de estresse, quando este voltou a sua expressão. Porém, para estresse por frio, o gene foi regulado positivamente, apresentando expressão até 168h (FAN et al., 2018). Esses resultados indicam que os genes podem responder de formas diferentes mesmo apresentando as mesmas moléculas sinalizadoras como ativadores de expressão. A maior proximidade filogenética de *EgrWRKY11* é com *PtrWRKY18*. O *WRKY* de pópulus está relacionado ao aumento da resistência ao patógeno biotrófico *Melampsora* através de sinalização mediada por AS (JIANG et al., 2017b). Esses resultados são correlacionados com a ativação de *EgrWRKY11* por AS, mas também apresenta ativação da transcrição pelas outras moléculas sinalizadoras. Devido ao seu comportamento perante ao déficit hídrico, torna-se importante seu estudo em particular para elucidar sua real função.

Estatisticamente, a expressão relativa de *EgrWRKY15* diferiu entre os clones somente após 3h de experimento, sendo que em VM5, a expressão só foi significativa após 6h (FIGURA 9C). O clone VM1 não apresentou alteração significativa na expressão deste gene. Estes resultados corroboram com o exposto anteriormente referente as moléculas de sinalização, diferindo, no que diz respeito, as relacionadas à estresses abióticos. Elas foram responsáveis por regular negativamente a expressão de *EgrWRKY15*. *EgrWRKY15* apresenta maior proximidade filogenética com *AtWRKY11* e *AtWRKY17* que respondem da mesma forma como

reguladores negativos da resistência basal a *Pseudomonas syringae* (JIANG et al., 2016a; JOURNOT-CATALINO et al., 2006).

Padrão parecido foi observado para o gene *EgrWRKY20*, onde a expressão em VM1 não foi alterada. No entanto, ocorreram oscilações em VM5 (aumento da expressão após 1h, 24h e 48h de tratamento) (FIGURA 9D), tendo este diferido de VM1 as 12h de tratamento. Os resultados de expressão do gene *EgrWRKY20* (*EgrWRKY32*) em tratamento com sal e frio corroboram com o resultado exposto para o gene *EgrWRKY11* (FAN et al., 2018).

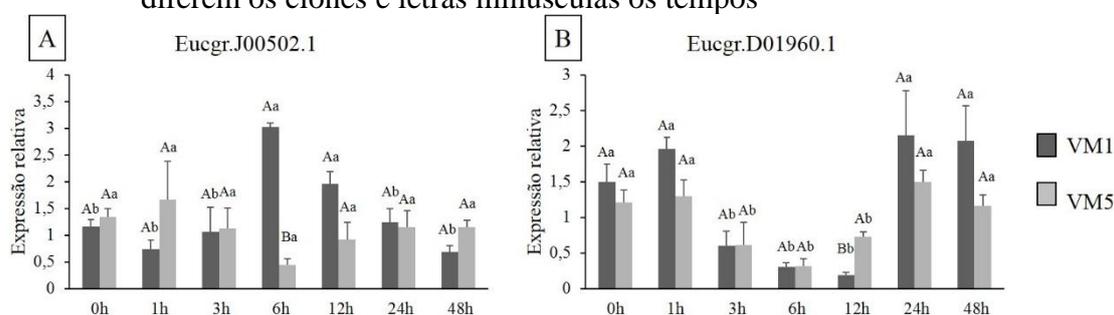
A expressão relativa de *EgrWRKY45* não teve alteração significativa para o clone VM1 (FIGURA 9E). No entanto, a expressão em VM5 foi regulada negativamente nas primeiras horas, voltando a ser expresso em níveis normais após 12h de estresse. Os níveis de expressão em resposta a estresse com PEG6000 e as moléculas sinalizadoras, permaneceram baixos e, praticamente, constantes durante o desenvolvimento dos experimentos. Este gene apresenta relação filogenética com *AtWRKY57*, responsável pelo acúmulo de ABA em condições de seca, através da ativação da transcrição de *NCED3* (JIANG; LIANG; YU, 2012), e, através da sua perda de função, aumenta a resistência a *Botrytis cinerea* (JIANG; YU, 2016).

Os dados transcriptômicos são importantes para gerar informações sobre possíveis genes diferencialmente expressos em condições de estresse. Esses dados podem ser utilizados para identificação de genes potenciais envolvidos na aquisição de tolerância a dessecação. Porém, eles não revelam por si só as redes reguladoras que controlam os diferentes processos pelos quais a planta passa durante o déficit hídrico (GONZÁLEZ-MORALES et al., 2016). Frente a esta exposição, torna-se necessário analisar a correlação dos FTs *WRKY* com genes responsivos a seca em eucalipto. A análise de co-expressão (APÊNDICE C – B), juntamente com análise do domínio conservado dos genes correlacionados com os FTs indicados, geraram duas sequências, Ecgr.J00502.1 e Ecgr.D01960.1, com possível impacto em futuras análises de engenharia genética. Outro indicativo de atuação destas proteínas durante o estresse hídrico é a correlação negativa apresentada com *EgrWRKY63* (APÊNDICE C – B) que apresentou redução na sua expressão em análise de RNA-seq de seca após 60 dias de estresse (APÊNDICE B). Porém, não há como saber se essa diminuição na expressão de *EgrWRKY63* foi significativa quando comparada ao controle, e se durante a execução do experimento (60 dias) ocorreu oscilação na expressão desta molécula. A correlação negativa apresentada neste caso indica expressões divergentes entre estes genes, sendo que o aumento da expressão de um, diminui a expressão do outro (CHILDS; DAVIDSON; BUELL, 2011).

Eucgr.J00502.1 codifica possivelmente uma proteína LEA (*Late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein family*). Análises de domínio conservado

(APÊNDICE I), juntamente com BLASTP no NCBI e Tair (banco de dados de *A. thaliana* - <https://www.arabidopsis.org/>), corroboram com esta suposição. O BLASTP realizado com o banco de dados de arabidopsis indicou maior identidade a sequência AT3G44380. Genes de arabidopsis ortólogos aos transcritos de batata foram analisados em resposta ao tratamento com um agente controlador de brotações, 1,4-dimetilenoetileno (DMN) (CAMPBELL; GLEICHNER, 2012). Em resposta, plantas tratadas com DMN regulam positivamente um grande número de transcritos associados a regulação de água e ajuste osmótico. Dentre os que são responsivos a dessecação está AT3G44380, indicando assim sua possível função. Eucgr.J00502.1 foi expresso significativamente após 6h de estresse somente em VM1 (FIGURA 10A), não apresentando alteração na expressão no clone VM5. A sua possível função e os resultados contrastantes entre os clones, torna esse gene um possível candidato a estudos posteriores.

Figura 10 – Perfis de expressão relativa de genes correlacionados com *EgrWRKY* na parte aérea de plantas *in vitro* de dois clones contrastantes (VM1 e VM5) de *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* S.T.Blake em déficit hídrico induzido por PEG6000. O tempo 0 que não recebeu tratamento foi utilizado como controle. Letras maiúsculas diferem os clones e letras minúsculas os tempos



Fonte: Da autora (2019).

Análise do domínio conservado de Eucgr.D01960.1 (APÊNDICE L) e de BLASTP nos mesmos bancos de dados citado anteriormente, indicam que esta proteína é similar à *SLAC1* (*SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1*) (VAHISALU et al., 2008). Esta proteína é essencial para o fechamento estomático em respostas ao CO₂, ABA, ozônio (O₃), transições de claridade, umidade, Ca²⁺, H₂O₂ e óxido nítrico (NO), indicando ser um canal aniônico do tipo S em células guarda. Esse canal é diretamente ativado por *SRK2E/OST1/SnRK2.6* que estão envolvidos na rota de sinalização de ABA e também são regulados por proteínas quinases dependentes de Ca²⁺ (*CDPK/CPK*) (GEIGER et al., 2009, 2010; LEE et al., 2009).

Após 3h de exposição a estresse hídrico, o gene *Eucgr.D01960.1* foi regulado negativamente até 24h, quando sua expressão relativa voltou a níveis normais (FIGURA 10B). Os dois clones diferiram significativamente apenas 12h de tratamento. O resultado da baixa expressão encontrado neste trabalho é devido ao fato de *SLAC1* ser expresso especificamente em células guarda. Quando a expressão é comparada entre células guarda e células do mesófilo, a diferença de expressão é cerca de 390 vezes maior onde os canais atuam (GEIGER et al., 2009). Como neste estudo foram utilizadas parte aéreas das plantas, possivelmente a expressão ficou diluída, não apresentando os dados reais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível identificar 74 proteínas putativas de *WRKY* distribuídas nos 11 cromossomos de eucalipto. A análise de ortólogos com *A. thaliana* indica *EgrWRKY26*, possível ortólogo de *AtWRKY43*, com potencial alvo para estudos posteriores. As sequências utilizadas para análise de RT-qPCR indicam um interesse maior nas possíveis proteínas *EgrWRKY3* e, especialmente, *EgrWRKY11*, que apresentou elevada expressão relativa com grande diferença entre os dois clones contrastantes. Juntando-se a estes resultados, *Ecgr.J00502.1* também é um candidato efetivo a posteriores análises. Em suma, os resultados apresentados podem ajudar a selecionar possíveis candidatos envolvidos no déficit hídrico para futuros esforços no melhoramento vegetal.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. Anuário Estatístico da ABRAF - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Terra**, p. 130, 2011.
- ABRAF. Anuário Estatístico da ABRAF. **Abraf**, p. 150, 2012.
- ACHAZ, G. et al. Analysis of intrachromosomal duplications in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A possible model for their origin. **Molecular Biology and Evolution**: London, v. 17, n. 8, p. 1268–1275, 1 ago. 2000.
- AKPINAR, B. A. et al. Plant abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**: London, v. 7, n. 11, p. 1450–1455, 2012.
- ALMEIDA, D. S. M. DE et al. Genome-wide identification and characterization of cacao *WRKY* transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease. **Plos One**: Cambridge, v. 12, n. 10, p. 1–23, 2017.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**: Amsterdã, v. 215, p. 403–410, 1990.
- AMATO, A. et al. A Grapevine TTG2-Like *WRKY* transcription factor is involved in regulating vacuolar transport and flavonoid biosynthesis. **Science**: New York, v. 7, p. 1–20, 2017.
- ARNDT, S. K. et al. Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. **Plant, Cell and Environment**: Malden, v. 31, n. 7, p. 915–924, 2008.
- ATAMIAN, H. S.; EULGEM, T.; KALOSHIAN, I. *SlWRKY70* is required for Mi-1-mediated resistance to aphids and nematodes in tomato. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 235, n. 2, p. 299–309, 2012.
- AYADI, M. et al. The *WRKY* transcription factor family in citrus: valuable and useful candidate genes for citrus breeding. **Applied Biochemistry and Biotechnology**: [s.l.: s.n.], v. 180, n. 3, p. 516–543, 2016.
- BAESSO, R. C. E.; RIBEIRO, A.; SILVA, M. P. Impacto das mudanças climáticas na produtividade do eucalipto na região norte do Espírito Santo e sul da Bahia. **Ciência Florestal**: Santa Maria, v. 20, n. 2, p. 335–344, 2010.
- BAKSHI, M.; OELMÜLLER, R. *WRKY* transcription factors jack of many trades in plants. **Plant Signaling and Behavior**: Amsterdã, v. 9, p. 1–18, 2014.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. *WRKY* proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. **The Scientific World Journal**: Londres, v. 2015, p. 1–17, 2015.

- BARAL, H.; GUARIGUATA, M. R.; KEENAN, R. J. A proposed framework for assessing ecosystem goods and services from planted forests. **Ecosystem Services**: [s.l: s.n.], v. 22, p. 260–268, 2016.
- BARANWAL, V. K.; NEGI, N.; KHURANA, P. Genome-wide identification and structural, functional and evolutionary analysis of wrky components of mulberry. **Scientific Reports**: New York, v. 6, p. 1–13, 2016.
- BATEMAN, I. J. et al. Bringing Ecosystem Services into Use in the United Kingdom. **Science**: New York, v. 341, n. 45, p. 45–50, 2013.
- BATTAGLIA, M.; CHERRY, M. Prediction of leaf area index in eucalypt plantations: effects of water stress and temperature. **Tree Physiology**: London, v. 18, p. 521–528, 1998.
- BELOSTOTSKY, D. A.; ROSE, A. B. Plant gene expression in the age of systems biology: Integrating transcriptional and post-transcriptional events. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 10, n. 7, p. 347–353, 2005.
- BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**: [s.l: s.n.], v. 132, n. 1, p. 21–32, 2013.
- BHATTARAI, K. K. et al. *WRKY72*-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and Arabidopsis as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. **Plant Journal**: Oxford, v. 63, n. 2, p. 229–240, 2010.
- BI, C. et al. Genome-wide identification and characterization of *WRKY* gene family in *Salix suchowensis*. **PeerJ**: [s.l: s.n.], v. 4, p. 1–29, 2016.
- BUONGIORNO, J.; ZHU, S. Assessing the impact of planted forests on the global forest economy. **New Zealand Journal of Forestry Science**: [s.l: s.n.], v. 44, n. 1, p. 1–9, 2014.
- CAI, M. et al. Identification of novel pathogen-responsive cis-elements and their binding proteins in the promoter of *OsWRKY13*, a gene regulating rice disease resistance. **Plant, Cell and Environment**: Malden, v. 31, n. 1, p. 86–96, 2008.
- CAMPBELL, M. A.; GLEICHNER, A. The sprout inhibitor 1, 4-dimethylnaphthalene induces the expression of the cell cycle inhibitors *KRP1* and *KRP2* in potatoes. **Functional & Integrative Genomics**: Berlin, v. 15, p. 533–541, 2012.
- CANNON, S. B. et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**: London, v. 4, n. 1, p. 10, 2004.
- CAO, P. B. et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *Eucalyptus grandis*: An intriguing over-representation of stress-responsive. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2015.
- CASTRO, C. A. DE O. et al. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 46, n. 9, p. 1585–1593, 2016.

- CHEN, H. et al. Roles of Arabidopsis *WRKY18*, *WRKY40* and *WRKY60* transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. **BMC Plant Biology**: London, v. 10, n. 281, p. 1–15, 2010.
- CHEN, L.; ZHANG, L.; YU, D. Wounding-Induced *WRKY8* is involved in basal defense in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**: Eagan, v. 23, n. 5, p. 558–565, 2010.
- CHEN, X. et al. Overexpression of *AtWRKY28* and *AtWRKY75* in Arabidopsis enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 32, n. 10, p. 1589–1599, 2013.
- CHEN, Y.-F. et al. The *WRKY6* transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in Arabidopsis. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 21, n. 11, p. 3554–3566, 2009.
- CHEONG, J.-J.; CHOI, Y. DO. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends in Genetics**: [s.l.: s.n.], v. 19, n. 7, p. 409–413, 1 jul. 2003.
- CHI, Y. et al. Protein-protein interactions in the regulation of *WRKY* transcription factors. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 6, n. 2, p. 287–300, 2013.
- CHILDS, K. L.; DAVIDSON, R. M.; BUELL, C. R. Gene coexpression network analysis as a source of functional annotation for Rice genes. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 6, n. 7, p. e22196, 2011.
- CIOLKOWSKI, I. et al. Studies on DNA-binding selectivity of *WRKY* transcription factors lend structural clues into *WRKY*-domain function. **Plant Molecular Biology**: [s.l.: s.n.], v. 68, n. 1–2, p. 81–92, 2008.
- CORREIA, B. et al. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: Physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**: Malden, v. 150, n. 4, p. 580–592, 2014.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**: [s.l.: s.n.], v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005.
- COSTA E SILVA, F. et al. Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. **Tree Physiology**: London, v. 24, p. 1165–1172, 2004.
- DAI, X.; WANG, Y.; ZHANG, W. H. *OsWRKY74*, a *WRKY* transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 67, n. 3, p. 947–960, 2016.
- DANG, F. et al. *CaWRKY27* negatively regulates H₂O₂ -mediated thermotolerance in pepper (*Capsicum annuum*). **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 9, p. 1–15, 2018.
- DAR, T. A. et al. Jasmonates counter plant stress : A Review. **Environmental and Experimental Botany**: Amsterdã, v. 115, p. 49–57, 2015.

- DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**: Palo Alto, v. 42, p. 55–76, 1991.
- DE LA TORRE, F. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular-specific *EgCCR* as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: [S.l.: s.n.], v. 117, n. 1, p. 77–84, 2014.
- DIAO, W.-P. et al. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of *WRKY* Gene Family in *Capsicum annuum* L. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p. 1–15, 2016.
- DING, Z. J. et al. Transcription factor *WRKY46* regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis*. **Plant Journal**: Oxford, v. 79, n. 1, p. 13–27, 2014a.
- DING, Z. J. et al. *WRKY41* controls *Arabidopsis* seed dormancy via direct regulation of *ABI3* transcript levels not downstream of ABA. **Plant Journal**: Oxford, v. 79, n. 5, p. 810–823, 2014b.
- DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal of Biotechnology**: Abraka, v. 2, n. 10, p. 328–333, 2003.
- DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the *Arabidopsis WRKY* gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**: [s.l.: s.n.], v. 51, p. 21–37, 2003.
- DOU, L. et al. Genome-wide analysis of the *WRKY* gene family in cotton. **Molecular Genetics and Genomics**: Amsterdã, v. 289, n. 6, p. 1103–1121, 2014.
- DUAN, S. et al. Functional characterization of a heterologously expressed *Brassica napus WRKY41-1* transcription factor in regulating anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**: Amsterdã, v. 268, p. 47–53, 2018.
- DUAN, Y. et al. *PtrWRKY73*, a salicylic acid-inducible poplar *WRKY* transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 34, n. 5, p. 831–841, 2015.
- EDWARDS, D.; BATLEY, J. Plant genome sequencing: Applications for crop improvement. **Plant Biotechnology Journal**: Hoboken, v. 8, n. 1, p. 2–9, 2010.
- EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**: London, n. 8, p. 1–6, 2018.
- EULGEM, T. et al. The *WRKY* superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 5, n. 5, p. 199–206, 2000.
- FAN, C. et al. Genome-wide analysis of *Eucalyptus grandis WRKY* genes family and their expression profile in response to hormone and abiotic stress treatment. **Gene**: [s.l.: s.n.], v. 678, p. 38–48, 2018.

- FAN, Q. et al. *CmWRKY1* enhances the dehydration tolerance of chrysanthemum through the regulation of ABA-associated genes. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2016.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 72, p. 673–689, 2015.
- FAO. Global Forest Resources Assessment 2010. **FAO Forestry Paper**, v. 163, p. 350 pp., 2010.
- FERNANDES, E. T.; CAIRO, P. A. R.; NOVAES, A. B. DE. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Ciência Florestal**: Santa Maria, v. 45, n. 1, p. 29–34, 2015.
- FERNÁNDEZ, M. et al. Photoperiod, temperature and water deficit differentially regulate the expression of four dehydrin genes from *Eucalyptus globulus*. **Trees**: Berlin, v. 26, n. 5, p. 1483–1493, 2012.
- FERREIRA, D. F. Sisvar : A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**: Lavras, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic acid synthesis and response. **The Arabidopsis Book**: Washington, v. 11, p. 1–36, 2013.
- FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic. **Physiologia Plantarum**: Malden, v. 1, p. 1–13, 2012.
- FUKUSHIMA, S. et al. Transcription factor *WRKY62* plays a role in pathogen defense and hypoxia-responsive gene expression in rice. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 57, n. 12, p. 2541–2551, 2016.
- GAMBOA, M. C. et al. Drought and salt tolerance enhancement of transgenic Arabidopsis by overexpression of the vacuolar pyrophosphatase 1 (*EVPI*) gene from *Eucalyptus globulus*. **Plant Physiology and Biochemistry**: [s.l.: s.n.], v. 73, p. 99–105, 2013.
- GAO, Q.-M. et al. Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the *WRKY50* and *WRKY51* proteins. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 155, n. 1, p. 464–476, 2011.
- GAO, Q.-M. et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 6, p. 1–12, 2015.
- GAO, R. et al. Genome-wide transcriptomic analysis reveals correlation between higher *WRKY61* expression and reduced symptom severity in Turnip crinkle virus infected *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**: New York, v. 6, p. 2–11, 2016.
- GEIGER, D. et al. Activity of guard cell anion channel *SLAC1* is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 106, n. 50, p. 21425–21430, 2009.

- GEIGER, D. et al. Guard cell anion channel *SLAC1* is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 107, n. 17, p. 8023–8028, 2010.
- GEILEN, K. et al. *WRKY43* regulates polyunsaturated fatty acid content and seed germination under unfavourable growth conditions. **Scientific Reports**: New York, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**: New York, v. 17, n. 1, p. 9–23, 2011.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review Phytopathologist**: Palo Alto, v. 43, p. 205–227, 2005.
- GOEL, R. et al. Genome-wide analysis of the musa *WRKY* gene family: evolution and differential expression during development and stress. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, n. March, p. 1–13, 2016.
- GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 39, p. 1607–1614, 2009.
- GONÇALVES, J. L. DE M. et al. Forest Ecology and Management Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**: [s.l: s.n.], v. 301, p. 6–27, 2013.
- GONZÁLEZ-MORALES, S. I. et al. Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 13, n. 35, p. 5232–5241, 2016.
- GRUNEWALD, W. et al. Transcription factor *WRKY23* assists auxin distribution patterns during *Arabidopsis* root development through local control on flavonol biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 109, n. 5, p. 1554–1559, 2012.
- GRUNEWALD, W. et al. Tightly controlled *WRKY23* expression mediates *Arabidopsis* embryo development. **EMBO Reports**: [s.l: s.n.], v. 14, n. 12, p. 1136–1142, 2013.
- GUARNASCHELLI, A. B. et al. Responses to drought preconditioning in *Eucalyptus globulus* Labill. provenances. **Trees**: Berlin, v. 17, n. 6, p. 501–509, 2003.
- GUO, A. Y. et al. PlantTFDB: A comprehensive plant transcription factor database. **Nucleic Acids Research**: London, v. 36, p. 966–969, 2008.
- GUO, C. et al. Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 65, n. 6, p. 1513–1528, 2014.
- HAAS, B. J. et al. DAGchainer: A tool for mining segmental genome duplications and synteny. **Bioinformatics**: Oxford, v. 20, n. 18, p. 3643–3646, 2004.

- HAN, M. et al. *OsWRKY42* represses *OsMT1d* and induces reactive oxygen species and leaf senescence in rice. **Molecules and Cells**: Seoul, v. 37, n. 7, p. 532–539, 2014.
- HANADA, K. et al. Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. **Plant physiology**: [S.l.: s.n.], v. 148, n. 2, p. 993–1003, 2008.
- HART, P. W.; SANTOS, R. B. Changing the face of short fiber - A review of the eucalyptus revolution. **Tappi Journal**: [s.l.: s.n.], v. 14, n. 6, p. 353–359, 2015.
- HAUG-BALTZELL, A. et al. SynMap2 and SynMap3D: Web-based whole-genome synteny browsers. **Bioinformatics**: Oxford, v. 33, n. 14, p. 2197–2198, 2017.
- HE, G. H. et al. Drought-responsive *WRKY* transcription factor genes *TaWRKY1* and *TaWRKY33* from wheat confer drought and/or heat resistance in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**: London, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2016a.
- HE, H. et al. Genome-wide survey and characterization of the *WRKY* gene family in *Populus trichocarpa*. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 31, n. 7, p. 1199–1217, 2012.
- HE, Y. et al. Genome-wide identification and expression analysis of *WRKY* transcription factors under multiple stresses in *Brassica napus*. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2016b.
- HODECKER, B. E. R. et al. Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of Eucalyptus to water restriction. **New Forests**: Amsterdã, v. 49, n. 2, p. 173–195, 2018.
- HOLUB, E. B. The arms race is ancient history in Arabidopsis, the wildflower. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 2, n. 7, p. 516–527, 2001.
- HONG, C. et al. The role of *ZmWRKY4* in regulating maize antioxidant defense under cadmium stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**: Amsterdã, v. 482, n. 4, p. 1504–1510, 2017.
- HSU, F.-C. et al. Submergence confers immunity mediated by the *WRKY22* transcription factor in Arabidopsis. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 25, n. 7, p. 2699–2713, 2013.
- HU, Y. et al. Arabidopsis transcription factor *WRKY8* functions antagonistically with its interacting partner *VQ9* to modulate salinity stress tolerance. **Plant Journal**: Oxford, v. 74, n. 5, p. 730–745, 2013.
- HUANG, S. et al. Genome-wide analysis of *WRKY* transcription factors in *Solanum lycopersicum*. **Molecular Genetics and Genomics**: Amsterdã, v. 287, n. 6, p. 495–513, 2012.
- HUANG, Y. et al. Members of *WRKY* Group III transcription factors are important in TYLCV defense signaling pathway in tomato (*Solanum lycopersicum*). **BMC Genomics**: London, v. 17, n. 788, p. 1–18, 2016.

HUNG, S.-H.; YU, C.-W.; LIN, C. H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**: Taiwan, v. 46, p. 1-10, 2005.

HUSSAIN, R. M. F. et al. Arabidopsis *WRKY50* and *TGA* transcription factors synergistically activate expression of *PR1*. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 9, p. 1–16, 2018.

HUSSEY, S. G. et al. Structural, evolutionary and functional analysis of the *NAC* domain protein family in Eucalyptus. **New Phytologist**: London, v. 206, n. 4, p. 1337–1350, 2015.

IBÁ. **Relatório Anual Indústria Brasileira de Árvores**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf>.

INNAN, H.; KONDRASHOV, F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 11, n. 2, p. 97–108, 2010.

JESUS, C. et al. Salicylic acid application modulates physiological and hormonal changes in *Eucalyptus globulus* under water deficit. **Environmental and Experimental Botany**: Amsterdã, v. 118, p. 56–66, 2015.

JIANG, C. H. et al. Transcription factors *WRKY70* and *WRKY11* served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 67, n. 1, p. 157–174, 2016a.

JIANG, J. et al. *WRKY* transcription factors in plant responses to stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**: Beijing, v. 59, n. 2, p. 86–101, 2017a.

JIANG, W.; YU, D. Arabidopsis *WRKY2* transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. **BMC Plant Biology**: London, v. 9, p. 1–14, 2009.

JIANG, Y. et al. Genome-wide identification and characterization of the Populus *WRKY* transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 65, n. 22, p. 6629–6644, 2014.

JIANG, Y. et al. Overexpression of poplar *PtrWRKY89* in transgenic Arabidopsis leads to a reduction of disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016b.

JIANG, Y. et al. The *WRKY* transcription factors *PtrWRKY18* and *PtrWRKY35* promote *Melampsora* resistance in Populus. **Tree Physiology**: London, v. 37, n. 5, p. 665–675, 2017b.

JIANG, Y.; DEYHOLOS, M. K. Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. **Plant Molecular Biology**: [s.l: s.n.], v. 69, n. 1–2, p. 91–105, 2009.

JIANG, Y.; LIANG, G.; YU, D. Activated expression of *WRKY57* confers drought tolerance in arabidopsis. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 5, n. 6, p. 1375–1388, 2012.

- JIANG, Y.; YU, D. *WRKY57* regulates JAZ genes transcriptionally to compromise *Botrytis cinerea* resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 171, n. August, p. pp.00747.2016, 2016.
- JING, S. et al. Heterologous expression of *OsWRKY23* gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**: Amsterdã, v. 58, n. 2, p. 181–190, 2009.
- JOSHI, R. et al. Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p. 1–15, 2016.
- JOURNOT-CATALINO, N. et al. The Transcription Factors *WRKY11* and *WRKY17* Act as Negative Regulators of Basal Resistance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell Online**: Waterbury, v. 18, n. 11, p. 3289–3302, 2006.
- KARIM, A. et al. Isolation and characterization of a subgroup IIa *WRKY* transcription factor *PtrWRKY40* from *Populus trichocarpa*. **Tree Physiology**: London, v. 35, n. 10, p. 1129–1139, 2015.
- KIM, J.-S. et al. *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including *DREB2A*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 24, n. 8, p. 3393–3405, 2012.
- KIM, K.-C. et al. *Arabidopsis* *WRKY38* and *WRKY62* transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. **The Plant Cell Online**: Waterbury, v. 20, n. 9, p. 2357–2371, 2008.
- KIM, K.-C.; FAN, B.; CHEN, Z. Pathogen-induced *Arabidopsis* *WRKY7* is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 142, n. 3, p. 1180–1192, 2006.
- KLOTH, K. J. et al. *AtWRKY22* promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 67, n. 11, p. 3383–3396, 2016.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**: London, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LAI, Z. et al. Roles of *Arabidopsis* *WRKY3* and *WRKY4* transcription factors in plant responses to pathogens. **BMC Plant Biology**: London, v. 8, p. 1–13, 2008.
- LEE, H. et al. Rice *WRKY11* plays a role in pathogen defense and drought tolerance. **Rice**: [s.l.: s.n.], v. 11, n. 1, p. 5, 2018.
- LEE, S. C. et al. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 106, n. 50, p. 21419–21424, 2009.

- LEMCOFF, J. H. et al. Elastic and osmotic adjustments in rooted cuttings of several clones of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from southeastern Australia after a drought. **Flora: Freiberg**, v. 197, n. 2, p. 134–142, 2002.
- LEVÉE, V. et al. Expression profiling and functional analysis of *Populus WRKY23* reveals a regulatory role in defense. **New Phytologist**: London, v. 184, n. 1, p. 48–70, 2009.
- LI, C.; WANG, K. Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell. populations. **Forest Ecology and Management**: [s.l.: s.n.], v. 179, n. 1–3, p. 377–385, 2003.
- LI, D. et al. Genome-wide analysis of *WRKY* gene family in the sesame genome and identification of the *WRKY* genes involved in responses to abiotic stresses. **BMC Plant Biology**: London, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017a.
- LI, H. et al. Comparative expression analysis of five *WRKY* genes from *Tibetan hullless barley* under various abiotic stresses between drought-resistant and sensitive genotype. **Acta Physiologiae Plantarum**: [S.l.: s.n.], v. 36, n. 4, p. 963–973, 8 abr. 2014.
- LI, L. Q. et al. Identifying the genes regulated by at *WRKY6* using comparative transcript and proteomic analysis under phosphorus deficiency. **International Journal of Molecular Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 18, n. 5, p. 1–20, 2017b.
- LI, S. et al. Functional characterization of *Arabidopsis thaliana WRKY39* in heat stress. **Molecules and cells**: Seul, v. 29, n. 5, p. 475–483, 2010.
- LI, S. et al. *Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 233, n. 6, p. 1237–1252, 2011.
- LI, W.; WANG, H.; YU, D. *Arabidopsis WRKY* transcription factors *WRKY12* and *WRKY13* oppositely regulate flowering under short-day conditions. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 9, n. 11, p. 1492–1503, 2016.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society**: [s.l.: s.n.], v. 30, p. 421–427, 1980.
- LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**: Colombo, v. 33, n. 76, p. 429–438, 2013.
- LUO, X. et al. Expression of wild soybean *WRKY20* in *Arabidopsis* enhances drought toleranc. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 64, n. 8, p. 2155–2169, 2013.
- LYNCH, M.; CONERY, J. C. Gene Duplication and Evolution. **Science**: New York, v. 293, p. 1551, 2001.
- LYONS, E. et al. Finding and comparing syntenic regions among *Arabidopsis* and the outgroups papaya, poplar, and grape: CoGe with rosids. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 148, n. 4, p. 1772–1781, 2008.

- MA, J. et al. Genome-wide identification of *WRKY* genes in the desert poplar *Populus euphratica* and adaptive evolution of the genes in response to salt stress. **Evolutionary Bioinformatics**: Oxford, v. 11, p. 47–55, 2015.
- MACFARLANE, C.; WHITE, D. A.; ADAMS, M. A. The apparent feed-forward response to vapour pressure deficit of stomata in droughted, field-grown *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant, Cell and Environment**: Malden, v. 27, p. 1268–1280, 2004.
- MAEO, K. et al. Role of conserved residues of the *WRKY* domain in the DNA-binding of tobacco *WRKY* family proteins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**: Tokyo, v. 65, n. 11, p. 2428–2436, 2001.
- MARTINS, G. S. et al. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**: [s.l: s.n.], v. 229, p. 122–131, 2018.
- MASEDA, P. H.; FERNÁNDEZ, R. J. Growth potential limits drought morphological plasticity in seedlings from six *Eucalyptus* provenances. **Tree Physiology**: London, v. 36, n. 2, p. 243–251, 2015.
- MATOS, F. S. et al. *Eucalyptus urocan* drought tolerance mechanisms. **African Journal of Agricultural Research**: Abraka, v. 11, n. 18, p. 1617–1622, 2016.
- MCINERNEY, E. M. et al. Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. **Genes & Development**: New York, v. 12, n. 21, p. 3357–3368, 1998.
- MCKIERNAN, A. B. et al. A water availability gradient reveals the deficit level required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. **Annals of Botany**: Oxford, v. 119, n. 6, p. 1043–1052, 2017.
- MENDES, L.; TREICHEL, M.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro da Silvicultura 2016**. [s.l: s.n.].
- MERCHANT, A. et al. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. **Plant, Cell and Environment**: Malden, v. 29, n. 11, p. 2017–2029, 2006.
- MIAO, Y. et al. Targets of the *WRKY53* transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**: [s.l: s.n.], v. 55, n. 6, p. 853–867, 2004.
- MIHARA, M.; ITOH, T.; IZAWA, T. SALAD database: A motif-based database of protein annotations for plant comparative genomics. **Nucleic Acids Research**: London, v. 38, n. SUPPL.1, p. 835–842, 2010.
- MOHANTA, T. K.; PARK, Y. H.; BAE, H. Novel genomic and evolutionary insight of *WRKY* transcription factors in plant lineage. **Scientific Reports**: New York, v. 6, p. 1–22, 2016.

MOKOTEDI, M. Physiological responses of *Eucalyptus nitens* × *nitens* under experimentally imposed water stress. **Southern Forests**: [s.l.: s.n.], v. 72, n. 2, p. 63–68, 2010.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000.

MUKHTAR, M. S. et al. The Arabidopsis transcription factor *WRKY27* influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. **Plant Journal**: Oxford, v. 56, n. 6, p. 935–947, 2008.

MUR, L. A. J. et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 140, p. 249–262, 2006.

MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**: London, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 5, p. 1–7, 2014.

NAZ, S. et al. Characterization of abiotic stress genes from different species of *Eucalyptus*. **Pakistan Journal of Botany**: Karachi, v. 47, n. 4, p. 1217–1223, 2015.

OLIVEIRA, E. B. DE et al. **Plantações Florestais: Geração de Benefícios com Baixo Impacto Ambiental**. 1. ed. Colombo, PR: EMBRAPA, 2016.

ONG, Q. et al. Bioinformatics Approach in Plant Genomic Research. **Current Genomics**: Sharjah, v. 17, n. 4, p. 368–378, 2016.

OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 5, p. 1–8, 2014.

OTTO, M. S. G. et al. Fotossíntese, condutância estomática e produtividade de clones de *Eucalyptus* sob diferentes condições edafoclimáticas. **Revista Árvore**: Viçosa, v. 36, n. 3, p. 431–439, 2013.

OTTO, M. S. G. et al. Impact of water supply on stomatal conductance, light use efficiency and growth of tropical *Eucalyptus* plantation in Brazil. **Revista Ecologia e Nutrição Florestal - ENFLO**: Santa Maria, v. 4, n. 3, p. 87, 2017.

PANDEY, S. P. et al. Transcriptional reprogramming regulated by *WRKY18* and *WRKY40* facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. **Plant Journal**: Oxford, v. 64, n. 6, p. 912–923, 2010.

PANTIN, F. et al. Rapid report The dual effect of abscisic acid on stomata. **New Phytologist**: London, v. 197, p. 65–72, 2013.

PAYN, T. et al. Changes in planted forests and future global implications. **Forest Ecology and Management**: [s.l.: s.n.], v. 352, p. 57–67, 2015.

- PENG, X. et al. Constitutive expression of rice *WRKY30* gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, *PR* gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 236, n. 5, p. 1485–1498, 2012.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**: London, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.
- PIETERSE, M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Phytopathologist**: Palo Alto, v. 52, p. 347–375, 2014.
- QIAO, Z.; LI, C. L.; ZHANG, W. *WRKY1* regulates stomatal movement in drought-stressed *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**: [s.l: s.n.], v. 91, n. 1–2, p. 53–65, 2016.
- QIN, F. et al. *Arabidopsis DREB2A*-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress – Responsive Gene Expression. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 20, p. 1693–1707, 2008.
- RAMAMOORTHY, R. et al. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 49, n. 6, p. 865–879, 2008.
- RAMIRO, D. et al. Identification of coffee *WRKY* transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens. **Tree Genetics and Genomes**: Berlin, v. 6, n. 5, p. 767–781, 2010.
- RAMOS, M. L. A. et al. Variação radial dos caracteres anatômicos da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maidem e idade de transição entre juvenil e adulto. **Scientia Forestalis**: Piracicaba, v. 39, n. 92, p. 411–418, 2011.
- REIS, G. G. DOS et al. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus* spp submetidos a dois regimes de irrigação no campo. **Revista Árvore**: Viçosa, v. 30, n. 6, p. 921–931, 2006.
- RIECHMANN, J. L. et al. *Arabidopsis* transcription factors : genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**: New York, v. 290, p. 2105–2110, 2000.
- RINERSON, C. I. et al. The evolution of *WRKY* transcription factors. **BMC Plant Biology**: London, v. 15, n. 66, p. 1–18, 2015.
- ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. E. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. **Genes and Development**: New York, v. 16, p. 1139–1149, 2002.
- ROJAS, A. M. et al. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. **Journal of cell Biology**: New York, v. 196, n. 2, p. 189–201, 2012.
- ROSS, C. A.; LIU, Y.; SHEN, Q. J. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). **Journal of Integrative Plant Biology**: Beijing, v. 49, n. 6, p. 827, 2007.

- ROYCHOUDHURY, A.; PAUL, S.; BASU, S. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 1, p. 1–22, 2013.
- RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**: London, v. 37, n. 6, p. 1–12, 2009.
- RUSHTON, D. L. et al. *WRKY* transcription factors: Key components in abscisic acid signalling. **Plant Biotechnology Journal**: Hoboken, v. 10, n. 1, p. 2–11, 2012.
- RUSHTON, P. J. et al. *WRKY* transcription factors. **Trends in Plant Science**: Kidlington , v. 15, n. 5, p. 247–258, 2010.
- SANTINO, A.; TAURINO, M.; DOMENICO, S. DE. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 32, p. 1085–1098, 2013.
- SANTOS, A. L. DOS et al. Global analysis of the *MATE* gene family of metabolite transporters in tomato. **BMC Plant Biology**: London, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.
- SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861–871, 2008.
- SCARPECI, T. E. et al. Overexpression of *AtWRKY30* enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**: [s.l: s.n.], v. 83, n. 3, p. 265–277, 2013.
- SCHULTZ, J. et al. SMART : a web-based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Research**: London, v. 28, n. 1, p. 231–234, 2000.
- SCOLFORO, H. F. et al. Incorporating rainfall data to better plan eucalyptus clones deployment in eastern Brazil. **Forest Ecology and Management**: [s.l: s.n.], v. 391, p. 145–153, 2017.
- SHANG, Y. et al. The Mg-Chelatase H Subunit of *Arabidopsis* Antagonizes a Group of *WRKY* Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 22, n. 6, p. 1909–1935, 2010.
- SHIMONO, M. et al. Rice *WRKY45* plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 19, n. 6, p. 2064–2076, 2007.
- SHVALEVA, A. L. et al. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**: London, v. 26, n. 2, p. 239–248, 2006.
- SILVA, J. A. A. Potencialidades de florestas energéticas de Eucalyptus no pólo gesseiro do Araripe-PE. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**: Dois Irmãos, v. 5 e 6, p. 301–309, 2009.

SIMETTI, R. et al. Production of biomass and energy stock for five *Eucalyptus* species. **Revista Ciência da Madeira - RCM**: Pelotas, v. 9, n. 1, p. 30–36, 2018.

SINGH, A. K. et al. A WRKY transcription factor from *Withania somnifera* regulates triterpenoid withanolide accumulation and biotic stress tolerance through modulation of phytosterol and defense pathways. **New Phytologist**: London, v. 215, n. 3, p. 1115–1131, 2017.

SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 6, p. 1–11, 2015.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã v. 5, n. 5, p. 430–436, 2002.

SLOT, M.; POORTER, L. Diversity of tropical tree seedling responses to drought. **Biotropica - The Scientific Journal of the Atbc**: [s.l.: s.n.], v. 39, n. 6, p. 683–690, 2007.

SOLER, M. et al. The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: Evidence for woody growth-related evolution and function. **New Phytologist**: London, v. 206, n. 4, p. 1364–1377, 2015.

SONG, H. et al. Genome-Wide Identification and Characterization of WRKY Gene Family in Peanut. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p. 1–15, 2016.

SONG, Y.; JING, S.; YU, D. Overexpression of the stress-induced *OsWRKY08* improves osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **Chinese Science Bulletin**: Beijing, v. 54, n. 24, p. 4671–4678, 2010.

SPOKEVICIUS, A. V. et al. Medium term water deficit elicits distinct transcriptome responses in *Eucalyptus* species of contrasting environmental origin. **BMC Genomics**: London, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2017.

SU, T. et al. WRKY42 modulates phosphate homeostasis through regulating phosphate translocation and acquisition in Arabidopsis. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 167, p. 1579–1591, 2015.

SUN, C. et al. A Novel WRKY Transcription Factor, *SUSIBA2*, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the iso1 Promoter. **The Plant Cell Online**: Waterbury, v. 15, n. 9, p. 2076–2092, 2003.

SUN, X. et al. Over-expression of *SlWRKY39* leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. **Journal of Plant Biology**: Berlin Heidelberg, v. 58, n. 1, p. 52–60, 2015.

SUN, Y.; YU, D. Activated expression of *AtWRKY53* negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 34, n. 8, p. 1295–1306, 2015.

- SUTTIPANTA, N. et al. The Transcription Factor *CrWRKY1* Positively Regulates the Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 157, n. 4, p. 2081–2093, 2011.
- TANG, H. et al. Synteny and Collinearity in Plant Genomes. **Science**: New York, v. 320, p. 486–489, 2008.
- TARDIEU, F. Plant response to environmental conditions : assessing potential production , water demand , and negative effects of water deficit. **Frontiers in Physiology**: Lausanne, v. 4, p. 1–11, 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**: London, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- THUMMA, B. R.; SHARMA, N.; SOUTHERTON, S. G. Transcriptome sequencing of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms and genes under selection. **BMC Genomics**: London, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2012.
- TIWARI, S. B.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. **Society**: Berlin, v. 16, p. 533–543, 2004.
- TORRES, P. M. DE A. et al. Caracterização físico-mecânica da madeira jovem de *Eucalyptus camaldulensis* para aplicação na arquitetura rural. **Floresta e Ambiente**: Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 109–117, 2016.
- UHLIG, A.; GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. O Uso de carvão vegetal na indústria siderúrgica brasileira e o impacto sob as mudanças climáticas. **Revista Brasileira de Energia**: Curitiba, v. 14, n. 11, p. 67–85, 2008.
- VAHISALU, T. et al. *SLAC1* is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. **Nature**: London, v. 452, p. 487–493, 2008.
- VERK, M. C. VAN et al. A Novel WRKY transcription factor is required for induction of *PR-1a* gene expression by salicylic acid. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 146, p. 1983–1995, 2008.
- VILLAR, E. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in *Eucalyptus*. **BMC genomics**: London, v. 12, n. 1, p. 538, 2011.
- WAN, Y. et al. Identification of the *WRKY* gene family and functional analysis of two genes in *Caragana intermedia*. **BMC Plant Biology**: London, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.
- WANG, H. et al. Overexpression of rice *WRKY89* enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. **Plant Molecular Biology**: [s.l: s.n.], v. 65, n. 6, p. 799–815, 2007.

WANG, H. et al. Arabidopsis *WRKY45* Transcription Factor Activates PHOSPHATE TRANSPORTER1;1 Expression in Response to Phosphate Starvation. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 164, n. 4, p. 2020–2029, 2014a.

WANG, H. et al. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p. 1–13, 2016.

WANG, J. et al. The wheat *WRKY* transcription factors *TaWRKY49* and *TaWRKY62* confer differential high-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 12, n. 7, p. 1–23, 2017a.

WANG, L. et al. Regulation of ethylene-responsive *SlWRKYs* involved in color change during tomato fruit ripening. **Scientific Reports**: New York, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017b.

WANG, M. et al. FoxO gene family evolution in vertebrates. **BMC Evolutionary Biology**: London, v. 15, p. 1–15, 2009.

WANG, N. et al. Function of *Malus prunifolia WRKY6* transcription factor in response to different stresses. **Biologia Plantarum**: [s.l.: s.n.], v. 1, p. 1–9, 2012.

WANG, Q. et al. *WRKY* gene family evolution in *Arabidopsis thaliana*. **Genetica**, v. 139, p. 973–983, 2011a.

WANG, S. et al. Identification of a C2H2-type zinc finger gene family from *Eucalyptus grandis* and its response to various abiotic stresses. **Biologia Plantarum**: [s.l.: s.n.], v. 58, n. 4, p. 1–6, 2014b.

WANG, X. et al. Gene conversion in angiosperm genomes with an emphasis on genes duplicated by polyploidization. **Genes**: [s.l.: s.n.], v. 2, p. 1–20, 2011b.

WANG, X. et al. Expression of *TaWRKY44*, a wheat *WRKY* gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 6, p. 1–14, 2015.

WANG, Y. et al. Overexpression of the alfalfa *WRKY11* gene enhances salt tolerance in soybean. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 13, n. 2, p. 1–16, 2018.

WARREN, C. R.; ARANDA, I.; CANO, F. J. Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. **Metabolomics**: New York, v. 8, p. 186–200, 2012.

WEI, K.-F. et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete *WRKY* transcription factor family in maize. **DNA Research**: Oxford, v. 19, n. 2, p. 153–164, 2012.

WHITE, D. A. et al. Selecting species for recharge management in Mediterranean south western Australia - Some ecophysiological considerations. **Plant and Soil**: Berlin, v. 257, n. 2, p. 283–293, 2003.

- WU, L. et al. Arabidopsis *WRKY28* transcription factor is required for resistance to necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*. **African Journal of Microbiology Research**: Abraka, v. 5, n. 30, p. 5481–5488, 2011.
- XIAO, Y. et al. Genome-wide identification of *WRKY* genes and their expression profiles under different abiotic stresses in *Elaeis guineensis*. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 12, n. 12, p. 1–18, 2017.
- XIE, Z. et al. Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 137, n. 1, p. 176–189, 2005.
- XING, D. H. et al. Stress- and pathogen-induced Arabidopsis *WRKY48* is a transcriptional activator that represses plant basal defense. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 1, n. 3, p. 459–470, 2008.
- XU, H. et al. *WRKY* transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*. **DNA Research**: Oxford, v. 23, n. 4, p. 311–323, 2016.
- XU, X. et al. Physical and functional interactions between and *WRKY60* transcription Factors. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 18, p. 1310–1326, 2006.
- YAMASAKI, K. et al. Solution Structure of an Arabidopsis *WRKY* DNA Binding Domain. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 17, p. 944–956, 2005.
- YANG, L. et al. *PtWRKY19*, a novel *WRKY* transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*. **Scientific Reports**: New York, v. 6, p. 1–12, 2016a.
- YANG, X. et al. The *WRKY* Transcription Factor Genes in Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Turkey Berry (*Solanum torvum* Sw.). **International Journal of Molecular Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 16, p. 7608–7626, 2015.
- YANG, X. et al. Identification and expression analyses of *WRKY* genes reveal their involvement in growth and abiotic stress response in watermelon (*Citrullus lanatus*). **PLoS ONE**: Cambridge, v. 13, n. 1, 2018.
- YANG, Y. et al. Functional analysis of structurally related soybean *GmWRKY58* and *GmWRKY76* in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 67, n. 15, p. 4727–4742, 2016b.
- YAO, Q. et al. Genome-wide identification and comparative expression analysis reveal a rapid expansion and functional divergence of duplicated genes in the *WRKY* gene family of cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata. **Gene**: [s.l.: s.n.], v. 557, n. 1, p. 35–42, 2015.
- YE, S. et al. Constitutive expression of the poplar *WRKY* transcription factor *PtoWRKY60* enhances resistance to *Dothiorella gregaria* Sacc. in transgenic plants. **Tree Physiology**: London, v. 34, n. 10, p. 1118–1129, 2014.

YIN, G. et al. The large soybean (*Glycine max*) *WRKY* TF family expanded by segmental duplication events and subsequent divergent selection among subgroups. **BMC Plant Biology**: London, v. 13, n. 148, p. 1–19, 2013.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 21, p. 133–139, 2014.

YU, J. et al. The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. **PLoS biology**: Cambridge v. 3, n. 2, p. e38, 2005.

YU, Y. et al. *WRKY71* accelerates flowering via the direct activation of FLOWERING LOCUS T and LEAFY in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**: Oxford, v. 85, n. 1, p. 96–106, 2016.

YUAN, J. S. et al. Plant systems biology comes of age. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 13, n. 4, p. 165–171, 2008.

ZHANG, C. et al. Genome-wide identification of the potato *WRKY* transcription factor family. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 12, n. 7, p. 1–20, 2017a.

ZHANG, G. et al. Genome-wide identification of ABA receptor *PYL* family and expression analysis of *PYLs* in response to ABA and osmotic stress in *Gossypium*. **PeerJ**: [s.l.: s.n.], v. 6, n. 5. p. e4126, 2017b.

ZHANG, J. Evolution by gene duplication : an update. **Trends in Ecology and Evolution**: [s.l.: s.n.], v. 18, n. 6, p. 292–298, 2003.

ZHANG, J.; PENG, Y.; GUO, Z. Constitutive expression of pathogen-inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. **Cell Research**: London, v. 18, n. 4, p. 508–521, 2008.

ZHANG, L. et al. Three *WRKY* transcription factors additively repress abscisic acid and gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant Science**: Amsterdã, v. 236, p. 214–222, 2015.

ZHANG, Y.; FENG, J. CAN. Identification and Characterization of the grape *WRKY* family. **BioMed Research International**: Cairo, v. 1, p. 1–14, 2014.

ZHANG, Y.; WANG, L. The *WRKY* transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evolutionary Biology**: London, v. 5, p. 1–12, 2005.

ZHAO, H. et al. *Populus simonii* × *Populus nigra* *WRKY70* is involved in salt stress and leaf blight disease responses. **Tree Physiology**: London, v. 37, n. 6, p. 827–844, 2017.

ZHENG, Z. et al. Arabidopsis *WRKY33* transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. **Plant Journal**: Oxford, v. 48, n. 4, p. 592–605, 2006.

ZHOU, H. et al. Genome-wide analysis of the expression of *WRKY* family genes in different developmental stages of wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit. **PLoS ONE**: Cambridge, v. 11, n. 5, p. 1–18, 2016.

ZHOU, Q. Y. et al. Soybean *WRKY*-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Biotechnology Journal**: Hoboken, v. 6, n. 5, p. 486–503, 2008.

ZHOU, X.; JIANG, Y.; YU, D. *WRKY22* transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. **Molecules and Cells**: Seoul, v. 31, p. 303–313, 2011.

ZHU, Y. et al. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. **BMC plant biology**: London, v. 14, n. 1, p. 93, 2014.

ZOU, C.; JIANG, W.; YU, D. Male gametophyte-specific *WRKY34* transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 61, n. 14, p. 3901–3914, 2010.

ZOU, Z. et al. Gene structures, evolution and transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). **PLoS ONE**: Cambridge, v. 11, n. 2, p. 1–23, 2016.

APÊNDICE A – Sequências caracterizadas de *Arabidopsis thaliana* e *Populus* sp. utilizadas na construção da árvore filogenética (Continua).

Nome	Nº Acesso	Grupo	Referência
<i>AtWRKY1</i>	At2g04880	I	(QIAO; LI; ZHANG, 2016)
<i>AtWRKY2</i>	At5g56270	I	(JIANG; YU, 2009)
<i>AtWRKY3</i>	At2g03340	I	(LAI et al., 2008)
<i>AtWRKY4</i>	At1g13960	I	(LAI et al., 2008)
<i>AtWRKY25</i>	At2g30250	I	(JIANG; DEYHOLOS, 2009)
<i>AtWRKY26</i>	At5g07100	I	(LI et al., 2011)
<i>AtWRKY33</i>	At2g38470	I	(JIANG; DEYHOLOS, 2009)
<i>AtWRKY34</i>	At4g26440	I	(ZOU; JIANG; YU, 2010)
<i>PtrWRKY73</i>	Potri.013G153400.1	I	(DUAN et al., 2015)
<i>PtrWRKY35</i>	Potri.013G086000.2	I-A	(JIANG et al., 2017b)
<i>PtrWRKY18</i>	Potri.003G169100.1	I-B	(JIANG et al., 2017b)
<i>AtWRKY18</i>	At4g31800	II-A	(XU et al., 2006)
<i>AtWRKY40</i>	At1g80840	II-A	(CHEN et al., 2010)
<i>AtWRKY60</i>	At2g25000	II-A	(CHEN et al., 2010)
<i>PtoWRKY60</i>	POPTR_0018s02480	II-A	(YE et al., 2014)
<i>PtrWRKY40</i>	POPTR_0003s18060.1	II-A	(KARIM et al., 2015)
<i>PtrWRKY89</i>	Potri.018G019800.4	II-A	(JIANG et al., 2016b)
<i>AtWRKY6</i>	AT1G62300	II-B	(ROBATZEK; SOMSSICH, 2002)
<i>AtWRKY42</i>	At4g04450	II-B	(CHEN et al., 2009)
<i>AtWRKY61</i>	At1g18860	II-B	(GAO et al., 2016)
<i>AtWRKY72</i>	At5g15130	II-B	(BHATTARAI et al., 2010)
<i>AtWRKY12</i>	AT2G44745	II-C	(LI; WANG; YU, 2016)
<i>AtWRKY13</i>	AT4G39410	II-C	(LI; WANG; YU, 2016)
<i>AtWRKY43</i>	At2g46130	II-C	(GEILEN et al., 2017)
<i>AtWRKY51</i>	At5g64810	II-C	(GAO et al., 2011)
<i>AtWRKY71</i>	At1g29860	II-C	(YU et al., 2016)
<i>PtrWRKY19</i>	POPTR_0014s04890.1	II-C	(YANG et al., 2016a)
<i>AtWRKY7</i>	At4g24240	II-D	(KIM; FAN; CHEN, 2006)

<i>AtWRKY8</i>	AT5G46350	II-D	(HU et al., 2013)
<i>AtWRKY11</i>	At4g31550	II-D	(WANG et al., 2018)
<i>AtWRKY17</i>	At2g24570	II-D	(JOURNOT-CATALINO et al., 2006)
<i>AtWRKY23</i>	At2g47260	II-D	(GRUNEWALD et al., 2013)
<i>AtWRKY28</i>	NM_117927	II-D	(CHEN et al., 2013)
<i>AtWRKY39</i>	At3g04670	II-D	(LI et al., 2010)
<i>AtWRKY45</i>	At3g01970	II-D	(WANG et al., 2014a)
<i>AtWRKY48</i>	At5g49520	II-D	(XING et al., 2008)
<i>AtWRKY50</i>	At5g26170	II-D	(GAO et al., 2011)
<i>AtWRKY57</i>	NM_001334406	II-D	(JIANG; LIANG; YU, 2012)
<i>PtWRKY23</i>	EF051079.1	II-D	(LEVÉE et al., 2009)
<i>AtWRKY22</i>	At4g01250	II-E	(KLOTH et al., 2016)
<i>AtWRKY27</i>	At5g52830	II-E	(MUKHTAR et al., 2008)
<i>AtWRKY30</i>	At5g24110	III	(SCARPECI; MUELLER-ROEBER; VALLE, 2013)
<i>AtWRKY38</i>	At5g22570	III	(KIM et al., 2008)
<i>AtWRKY41</i>	At4g11070	III	(DING et al., 2014b)
<i>AtWRKY46</i>	At2g46400	III	(DING et al., 2014a)
<i>AtWRKY53</i>	AT4G23810	III	(MIAO et al., 2004)
<i>AtWRKY62</i>	At5g01900	III	(FUKUSHIMA et al., 2016)
<i>AtWRKY70</i>	AF421157	III	(JIANG et al., 2016a)
<i>PsnWRKY70</i>	Potri.016G137900	III	(ZHAO et al., 2017)

(Conclusão).

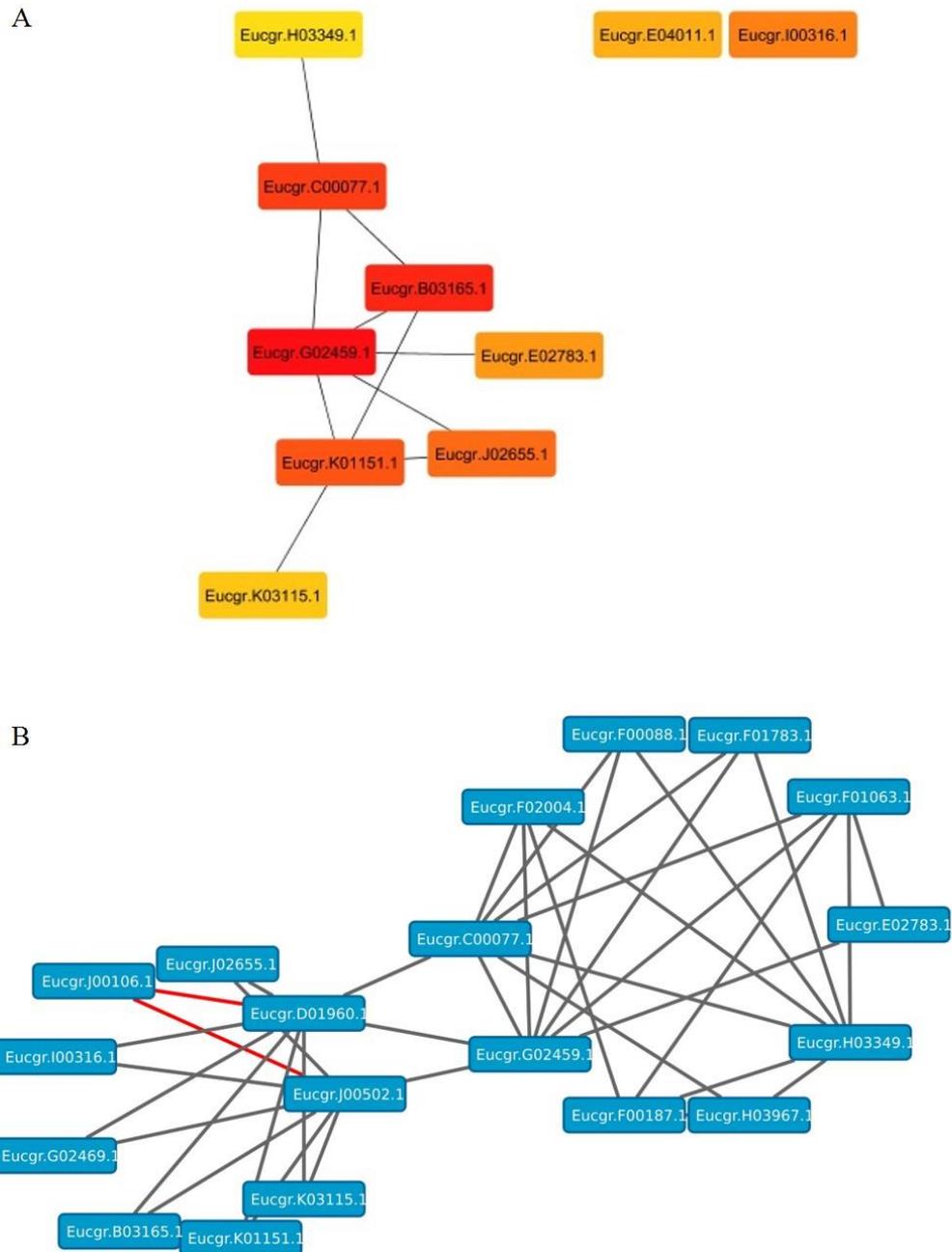
Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE B – Perfil de expressão dos fatores de transcrição EgrWRKY em RNA-seq realizado em experimento de déficit hídrico em plântulas de três clones de *E. camaldulensis* (THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012). P – Petford de trópicos húmidos; K – Katherine de trópicos secos; e M – Mt.Isa de trópicos semi-áridos. Controles coletados no início do déficit hídrico e Estresse coletados após 60 dias do mesmo estresse. Valores normalizados por Log2



Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE C – Redes de co-expressão dos FTs *WRKY*. Cutoff utilizado $\geq 0,9$ (A) e $\geq 0,8$ (B).
Linha contínua vermelha – correlação negativa. Linha contínua cinza – correlação positiva



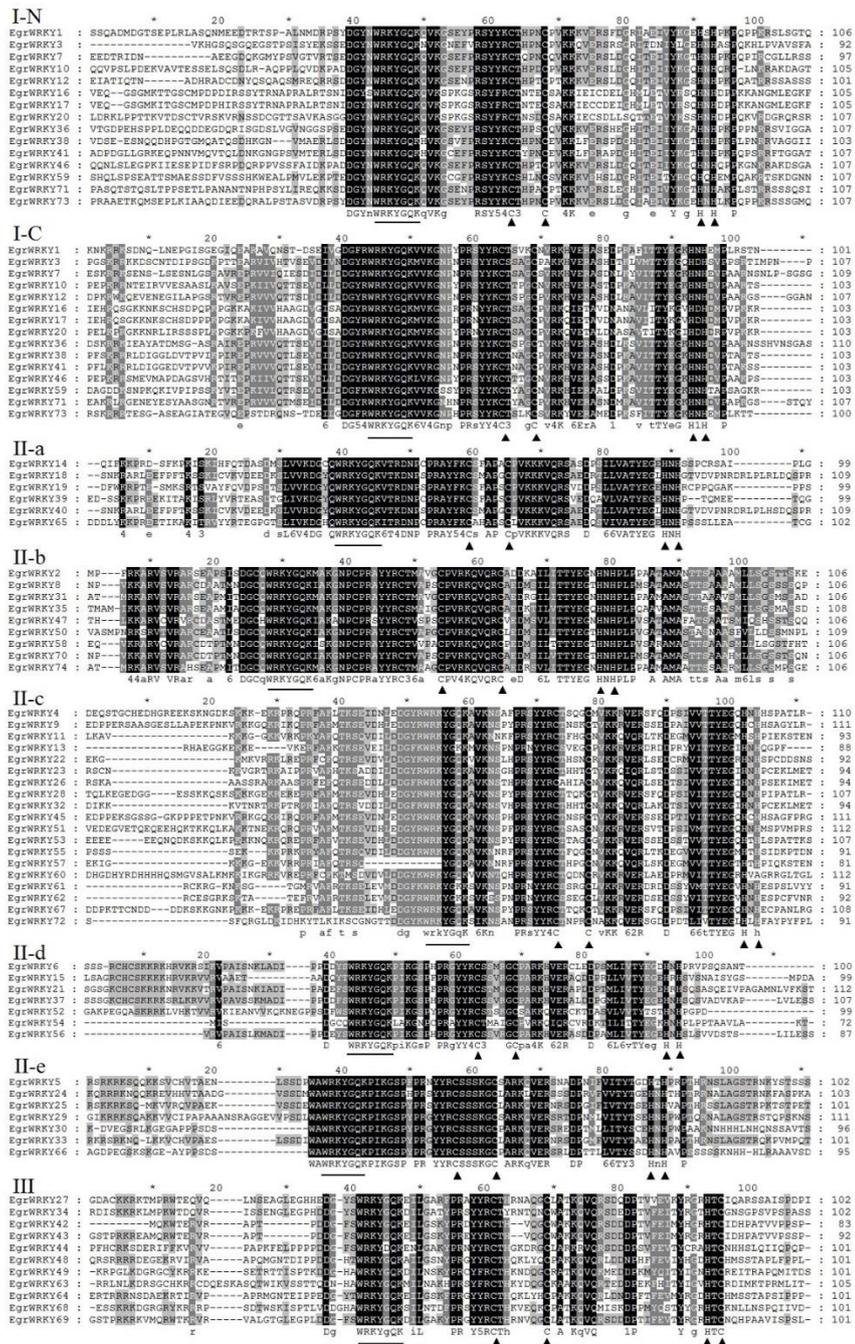
Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE D – Informações gerais dos *primers* utilizados na análise de RT-qPCR

Gene	Locus	Sequência 5'→3'	Concent. (µM)	Amplicon (pb)
<i>EgrWRKY3</i>	Eucgr.A01053.1	F:GCGAGCAAAAAGAAGACCG R:ATTCTCCCCCATCACATTCA	2	89
<i>EgrWRKY11</i>	Eucgr.B03520.1	F:TCATCCCCGTCTTTTCTGTC R:TGTTATCGCCATGTCCTTTG	2	85
<i>EgrWRKY20</i>	Eucgr.C00348.1	F:GACCGTAAACTGCCACCAAC R:TCTCCTCCAGATGCCTTCAC	6	113
<i>EgrWRKY15</i>	Eucgr.C00077.1	F:TCAAGATGGTGGACAACGAG R:GGGGAGAAGAGAGGAAGGAG	2	93
<i>EgrWRKY45</i>	Eucgr.G02459.1	F:TCCTCCTCATCCTCCCAGTA R:AATCCCTGGTCAATGTCTGC	2	111
<i>EgrLea</i>	Eucgr.J00502.1	F:AAGGTCAAATGGTCGTGGAC R:TGGAGATGAGGTGGAAGGTC	2	109
<i>EgrSNAC1</i>	Eucgr.D01960.1	F:ATGGATACTCGACCGCTGAA R:TCGATTGTTCCGCTTCTTCT	2	85
<i>EF-1α</i>	Eucgr.B02473.1	F:TGCTTTGCTCGCTTTCACCTC R:TTCATCGTACCTTGCCTTGG	2	100
<i>PP2A-3</i>	Eucgr.B03031.1	F:TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT R:GTCCTTTCTTCTCCGAGAGCAC	2	124
<i>SAND</i>	Eucgr.B02502.1	F:CGTGTATGTCAATGGGTGAAAG R:TAGCAGGCAATACATCACCAAG	2	86

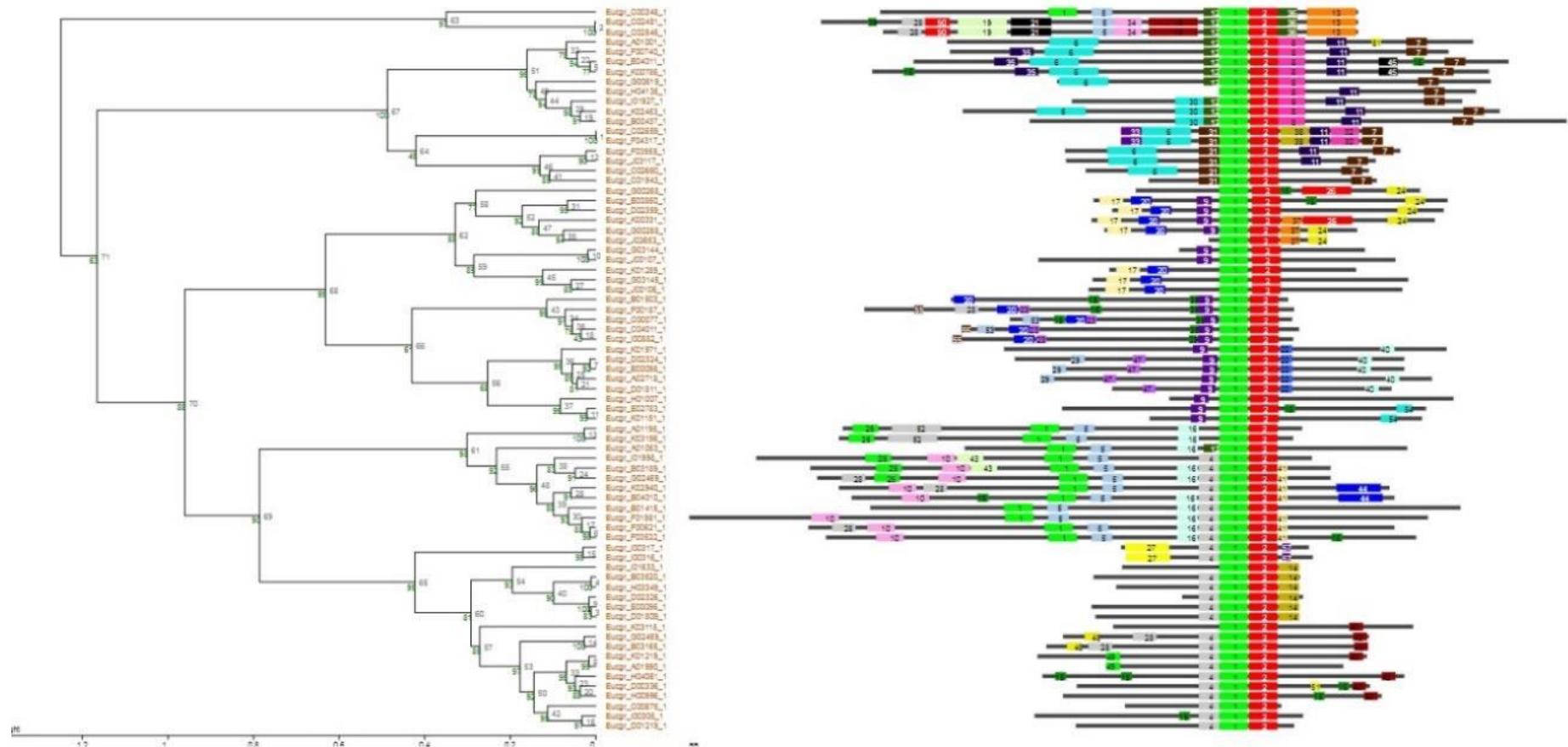
Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE E – Comparação das sequências putativas de aminoácidos dos *EgrWRKY* através de alinhamento pelo algoritmo *ClustalW* no programa MEGAX e organização das sequências com auxílio do Programa GeneDoc. Sequências separadas conforme distribuição dos grupos filogenéticos. Barra – indica o domínio WRKYGQK; Setas – indicam os aminoácidos presentes no domínio zinc-finger like



Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE F – Identificação dos motivos encontrados nas 74 seqüências de *EgrWRKY* através da plataforma SALAD database



Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE G – Identificação do domínio conservado de Eucgr.C01940.1 e alinhamento com *EgrWRKY14*. A – Falta do domínio WRKYGQK presente em proteínas que codificam o fator de transcrição *WRKY*. B – Alinhamento das seqüências

A

Conserved domains on [lcl|seqsig_MGSNW_3cd16361faf1364be09b26bfe1f31fcf] View **Concise Results** ?

Eucgr.C01940.1

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options >](#)

Query seq. 1 20 40 60 80 100 120 140
MGSNMIVDTLSLENTSYFKKEIIVLENDNSRRGPEEPVIVHFAHGLMEEYRVRVSHENKALTEMLTLPVDSYNLQNLIVLENKTSQDELGASRKRKHEANIAAESCSYEEEDICKKPKDIFKPPMILHLHFQTDVSDMSLVRY
 ... No conserved domains have been identified for this query sequence ...

List of domain hits

+	Name	Accession	Description	Interval	E-value
No domain hits found.					

B

Alignments

Download **Graphics** Next Previous Descriptions

Eucgr.C01940.1
 Sequence ID: Query_137317 Length: 143 Number of Matches: 1

Range 1: 63 to 141 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
107 bits(267)	2e-34	Compositional matrix adjust.	52/79(66%)	61/79(77%)	6/79(7%)

```

Query 1  MLTHQESYVIMLVHQLVLIQITS-----ASRKRKHEAVTTESGQVDEQDFKKPRDSF 54
          MLTIV+SYVILMLVLIIVL+-----ASRKRKHEAV+ESC Y+ED+I KQP+D F
Sbjct 63  MLTLPVDSYNLQNLIVLENKTSQDELGASRKRKHEANIAAESCSYEEEDICKKPKDIF 122

Query 55  KPKISKIHFQTDASDMSLV 73
          KP I+K+HFQTD SDMSLV
Sbjct 123  KPKIETLHFQTDVSDMSLV 141
  
```

Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE H – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.k01169.1

Conserved domains on [lcl|seqsig_MAGYK_c1fedaf1a1138e2898c1e077be1af429] View [Concise Results](#) [?](#)

Eucgr.K01169.1

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options >](#) [?](#)

Query seq. Super-families

Ras superfamily

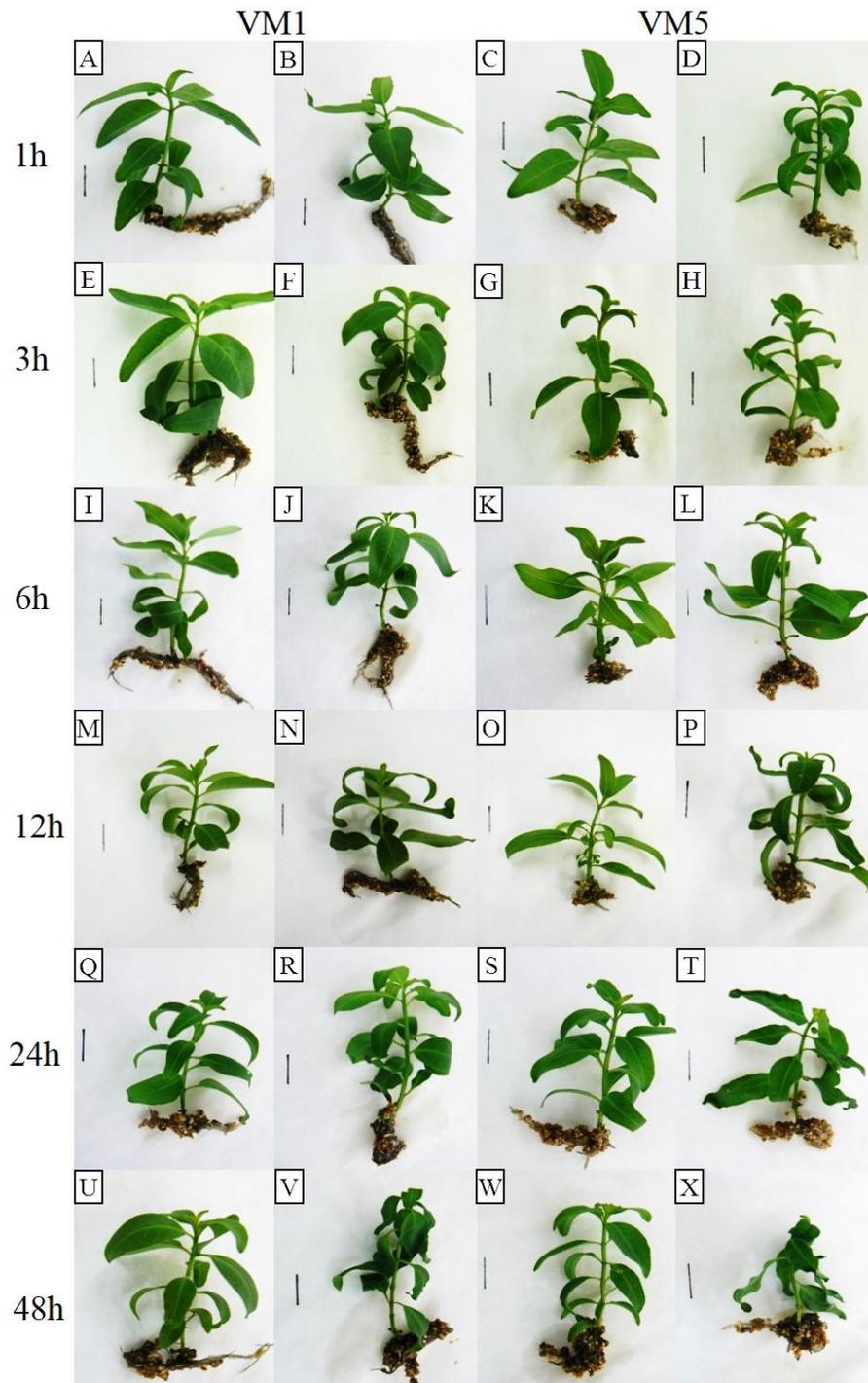
[Search for similar domain architectures](#) [?](#) [Refine search](#) [?](#)

List of domain hits [?](#)

	Name	Accession	Description	Interval	E-value
[+]	Ras super family	cl27030	Ras family; Includes sub-families Ras, Rab, Rac, Ral, Ran, Rap Ypt1 and more. Shares P-loop ...	1-218	2.14e-127

Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE I – Imagem ilustrativa das plantas utilizadas durante o experimento de déficit hídrico com PEG6000. VM1 (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R, U e V) VM5 (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W e X). Tempos: 1h (A, B, C e D), 3h (E, F, G e H), 6h (I, J, K e L), 12h (M, N, O e P), 24h (Q, R, S e T) e 48h (U, V, W e X). Barra: 1 cm



Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE J – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.J00502.1

NCBI

Conserved Domains

Conserved domains on [lcl|seqsig_MGKKV_adbbb65954c9c9952a104093d3658873] View **Concise Results**

Eucgr.J00502.1

Protein Classification

WHY domain-containing protein (domain architecture ID 10654889)
WHY domain-containing protein

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options >](#)

Query seq. Specific hits Superfamilies

WHY
LEA_2 superfamily

Search for similar domain architectures Refine search

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
[H] WHY	smart00769	Water Stress and Hypersensitive response;	41-139	2.98e-17

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2017), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.*45(D)200-3.
- Marchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.*43(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W)327-331.

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
NCBI | NLM | NIH

Fonte: Da autora (2019).

APÊNDICE L – Domínio conservado presente na sequência de aminoácidos Eucgr.D01960.1

NCBI

Conserved Domains

HOME | SEARCH | GUIDE | NewSearch | Structure Home | 3D Macromolecular Structures | Conserved Domains | Pubchem | BioSystems

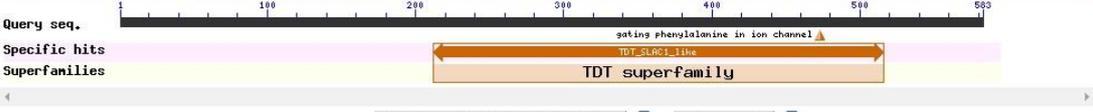
Conserved domains on [lcl|seqsig_MDTRP_f8228e90e0e08bb151359a5c4cc44b6e] View **Concise Results** ?

Eucgr.D01960.1

Protein Classification ?

TDT_SLAC1_like domain-containing protein (domain architecture ID 10174710)
TDT_SLAC1_like domain-containing protein

Graphical summary Zoom to residue level show extra options > ?

Query seq. 

Specific hits

Superfamilies

? ?

List of domain hits ?

	Name	Accession	Description	Interval	E-value
[+]	TDT_SLAC1_like	cd09323	Tellurite-resistance/Dicarboxylate Transporter (TDT) family includes SLAC1 (Slow Anion ...	212-516	1.06e-102

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2017), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.*45(D)200-3.
- Marchler-Bauer A et al. (2015), "NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.*43(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W)327-331.

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
NCBI | NLM | NIH

Fonte: Da autora (2019).