



**GUILHERME SILVA MARTINS**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DA  
EXPRESSÃO GÊNICA DE CLONES DE *Eucalyptus*  
*spp.* SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**LAVRAS - MG**

**2015**

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

Martins, Guilherme Silva.

Transformação genética e análise da expressão gênica de clones  
de *Eucalyptus spp* sob déficit hídrico / Guilherme Silva Martins. –

Lavras : UFLA, 2015.

134 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Seca. 2. Genes de referência. 3. RT-qPCR. 4. Engenharia  
genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**GUILHERME SILVA MARTINS**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DE CLONES DE *Eucalyptus spp.* SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS – MG**

**2015**

**GUILHERME SILVA MARTINS**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DE CLONES DE *Eucalyptus spp.* SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 07 de agosto de 2015.

Dra. Andréa Almeida Carneiro – EMBRAPA /MG

Dr. Claudio Brondani – EMBRAPA / GO

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS – MG**

**2015**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade concedida para a realização da pós-graduação em Biotecnologia vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade e apoio concedido.

À empresa Vallourec Florestal Ltda pelo material disponibilizado, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso de Biotecnologia Vegetal por todos os ensinamentos necessários para a minha formação profissional.

Ao professor Luciano Vilela Paiva pela orientação, paciência e ensinamentos que foram de grande relevância para minhas decisões e formação.

Aos companheiros do Laboratório Central de Biologia Molecular por todos os momentos de descontração e trabalho vividos em todo esse tempo.

Aos amigos do Grupo Eucalipto, Flávia, Wesley, Lara, Chaiane e Marieli pelo companheirismo e apoio compartilhado. Em especial, agradeço a Natália pelos ensinamentos e paciência os quais foram primordiais para o sucesso deste trabalho.

Aos meus irmãos José Cláudio e Camila por todo amor e amizade.

À minha família por todo carinho e paciência. Em especial minhas avós Nini e Terezinha pelo carinho.

Aos meus pais Liliane e José Cláudio pelo amor, carinho, paciência e amizade tornando possível essa conquista.

À minha esposa Livia por todo companheirismo, paciência, amor e carinho.

## RESUMO

Visando a compreensão dos mecanismos de defesa de *Eucalyptus spp.* ao déficit hídrico e obter plantas mais tolerantes a esta condição, este trabalho avaliou, via RT-qPCR, o padrão de expressão dos genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* e *EgrDDM1* em dois clones contrastantes (VM01 - tolerante e VM05 - Sensível) do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* sob condições de déficit hídrico e irrigação, através da normalização com genes de referência adequados. Além disso, este trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, contendo em seu genoma o gene *OsCPK5* e avaliar o efeito da inserção deste na expressão dos genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1*. Primeiramente, foram analisados sete candidatos a genes de referência (*SAND*, *IDH*, *PP2A-3*, *PP2A-1*, *UBQ*, *TUB* e *EF-1 $\alpha$* ) através dos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct*, das amostras provenientes dos dois clones de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* sob condições de déficit hídrico e irrigação. De acordo com os dados obtidos, verificou-se uma maior estabilidade dos genes *SAND* e *PP2A-3* na maioria dos conjuntos amostrais testados. Alguns estudos sugerem um número mínimo de três genes de referência para a normalização mais precisa da expressão, selecionando assim o terceiro gene mais estável, o *EF-1 $\alpha$* . Com os genes de referência selecionados, a análise da expressão dos genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* e *EgrDDM1* foi feita nas amostras dos clones contrastantes sob as condições citadas através da normalização com os três genes de referência (*SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* ). Paralelamente, foram avaliados os potenciais hídricos das mudas de ambos os clones. O clone VM01 apresentou uma expressão mais acentuada dos genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1* em condições de déficit hídrico quando comparados com o clone VM05. De acordo com a literatura estes genes estão relacionados com várias sinalizações e respostas da planta ao déficit hídrico, demonstrando uma maior expressão em plantas tolerantes. Esses dados corroboram com os valores de potencial hídrico no qual o VM05 apresentou uma diminuição drástica em condições de estresse, enquanto que o VM01 apresentou uma leve diminuição, confirmando a tolerância do clone VM01 perante o déficit hídrico. Visando a obtenção de genótipos mais tolerantes, foi realizado uma transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, a fim de inserir o gene *OsCPK5*, relacionado principalmente com o fechamento estomático, em plantas do híbrido de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. De acordo com as análises de PCR a inserção do gene de interesse foi realizada com sucesso obtendo quinze plantas geneticamente modificadas contendo o gene *OsCPK5*. Com as análises da expressão dos genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1* verificou-se uma diferença na expressão destes quando comparado com plantas não transformadas, demonstrando o impacto da inserção do gene *OsCPK5* na resposta das plantas de *E. grandis* X *E. urophylla* ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Seca. Genes de referência. RT-qPCR. Engenharia genética.

## ABSTRACT

Aiming the comprehension of drought defenses mechanisms of *Eucalyptus spp.* and to obtain tolerant genotypes, this work evaluated, by RT-qPCR, the expression patterns of six genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* and *EgrDDM1*, in two *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* clones (VM01- drought tolerant and VM05 – drought susceptible) in drought and irrigation conditions. For the expression normalization, reference genes was, firstly, used. Besides, this work aimed the development of an *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* transgenic line with the gene *OsCPK5* and evaluated the effect of its insertion in the expression of four genes related to drought response, *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1*. Primarily, the stability of seven candidates as reference genes (*SAND*, *IDH*, *PP2A-3*, *PP2A-1*, *UBQ*, *TUB* and *EF-1 $\alpha$* ) was evaluated through the *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* and *Delta-Ct* algorithms, in the two clones of *E. camaldulensis* X *E. urophylla* under drought and watered conditions. According to the data found, it was possible to verify a higher stability value of the genes *SAND* and *PP2A-3* in the great part of the samples sets. In addition some studies suggest the normalization using three references genes, selecting the third gene more stable, *EF-1 $\alpha$* . In the second experiment, the expression of the genes *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* and *EgrDDM1* was evaluated in the two clones (VM01 and VM05) in the same conditions tasted before. The reference genes used in the expression normalization was *SAND*, *PP2A-3* and *EF-1 $\alpha$* . In meanwhile, the water potential of all the treatments was observed. When under drought conditions, the clone VM01 showed a higher expression of the *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* and *EgrPYR1* then the clone VM05. Based on previous studies, these genes are related to many signaling and tolerance processes against drought, showing a higher expression in tolerant genotypes. These data are supported by the water potential values, which the VM05 presented a severe reduction in stress conditions, whilst the clone VM01 had a slight decrease. In the third experiment, a genetic transformation was done, through the *Agrobacterium tumefaciens* infection, aiming the insertion of the *OsCPK5* gene in *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* seedlings. Based on the PCR reactions, it was possible to obtain, successfully, fifteen transgenic lines. After the expression analysis of the *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* and *EgrPYR1*, it was verified a difference in the transformed plants when compared with the wild type, showing an impact of the gene insertion through genetic transformation on the drought response of *E. grandis* X *E. urophylla* seedlings.

Keyword: Drought. Reference gene. RT-qPCR. Genetic engineering.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i> .....	12
2.2 Impacto do estresse hídrico na agricultura.....	13
2.3 Bases moleculares de plantas sobre estresse hídrico .....	15
2.4 Sinalização do Ca <sup>2+</sup> e a família CDPK .....	24
2.5 Transformação genética de plantas .....	27
2.6 RT-qPCR e genes de referência .....	30
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>SEGUNDA PARTE .....</b>	<b>46</b>
<b>ARTIGO 1: Seleção de genes de referência para análises de RT-qPCR em clones de <i>Eucalyptus urophylla</i> X <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sob estresse hídrico .....</b>	<b>47</b>
<b>ARTIGO 2: Análise da expressão gênica de dois clones contrastantes do híbrido <i>Eucalyptus camaldulensis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i> sob condições de estresse hídrico .....</b>	<b>76</b>
<b>ARTIGO 3: Transformação genética de <i>Eucalyptus urophylla</i> X <i>Eucalyptus grandis</i> .....</b>	<b>107</b>



**PRIMEIRA PARTE**

Introdução geral

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é uma espécie arbórea distribuída mundialmente devido a sua capacidade de adaptação, desempenhando um importante papel no setor econômico. Esta relevância na economia se deve ao fato de várias espécies de eucalipto e seus híbridos serem matéria prima de diversos produtos, como a celulose, papel, carvão vegetal, serralheria, biomassa, uso farmacológico, entre outros (BLAKE, 2009). Além da grande capacidade de adaptação o gênero *Eucalyptus* apresenta um rápido crescimento em diferentes condições ambientais, facilidade de manejo e alta produtividade, justificando os plantios em larga escala por parte do setor florestal e industrial (FILHO et al., 2011).

Apesar da alta produtividade nacional, nas próximas décadas ocorrerá um aumento da demanda por produtos oriundos das espécies de eucalipto, necessitando assim de genótipos ainda mais produtivos e do aumento na utilização de recursos hídricos (UN WATER, 2014). No entanto, avaliando o contexto do crescimento demográfico, das mudanças climáticas e, conseqüentemente, impactos dos estresses ambientais, como o estresse hídrico, há exigências de novas abordagens para auxiliar na aquisição de genótipos mais tolerantes e produtivos (GOLLE et al., 2009).

A seca representa um dos fatores ambientais que mais limitam o crescimento e a produtividade das culturas. As plantas sob déficit hídrico apresentam danos em processos fisiológicos como a diminuição da pressão de turgor, cavitação dos vasos do xilema, menor assimilação de gás carbônico e síntese de assimilados, menor eficiência no aparato fotossintético, entre outros (CHAVES et al., 2002; ZHANG et al., 2014).

Durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de tolerância para lidar com o déficit hídrico incluindo: regulação osmótica, reparo do estresse ou desintoxicação e, em último caso, inibição do crescimento. Todos os mecanismos citados são iniciados devido o reconhecimento das relações hídricas solo/planta por osmosensores presentes nas membranas, os quais desencadeiam uma sinalização sistêmica pela planta. Esta sinalização por sua vez, ativa genes funcionais que codificam proteínas relacionadas diretamente com a homeostase

celular e do organismo, como, proteínas kinase que atuam no fechamento e abertura estomática, enzimas antioxidantes e biossíntese de osmólitos (KUROMORI et al., 2014).

O fitohormônio ácido abscísico (ABA) é conhecido por ser um dos principais sinalizadores e intermediadores de processos fisiológicos de resposta ao déficit hídrico. Além de participar no fechamento e abertura estomática, o ABA ativa fatores de transcrição como, *ABRE* (*ABA-responsive element*) e MYB/MYC, através do reconhecimento por receptores de ABA *PYR/PYL/RCAR* [*Pyrabactin Resistance1 (Pyr1) /PYR1-Like (PYL)/Regulatory Components of ABA Receptors (RCAR)*], sendo estes responsáveis por desencadear modificações de proteínas *downstream* e a consequente ativação de outros genes. Existem fatores de transcrição que não dependem do fitohormônio ABA para sua expressão, denominados ABA-independente, como por exemplo, o *DREB2* (*DRE-Binding Protein 2*) o qual apresentam um papel muito importante para ativação de genes funcionais a resposta ao déficit hídrico (QIN et al., 2007, SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2011).

Além da biossíntese do ABA e das rotas ABA-independente, a planta sob estresse é capaz de produzir mensageiros secundários que auxiliam em processos e rotas fisiológicas em resposta ao estresse hídrico. Um dos mensageiros secundários conhecidos por participar destas respostas é o íon  $\text{Ca}^{2+}$  (BRANDT et al., 2012). Após a percepção do estresse, o nível de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e em algumas organelas aumenta consideravelmente, sendo reconhecido por certas proteínas kinase como as da família *CDPK* (*Calcium-Dependent Protein Kinase*). Estas proteínas após se ligarem ao  $\text{Ca}^{2+}$  mudam suas conformações, no sentido de deixar o seu domínio kinase exposto e ativo desempenhando diversas funções, como o fechamento estomático, produção de osmólitos, espécies reativas de oxigênio e ativação de fatores de transcrição (OSAKABE et al., 2013).

Outros mecanismos que vem sendo bastante estudados atualmente são as modificações epigenéticas como a remodelagem da cromatina, modificação da cauda das histonas (Acetilação, Metilação, Fosforilação, SUMOilação e/ou Ubiquitinação dos aminoácidos da cauda) e Metilação ou Desmetilação do DNA. Todos esses mecanismos interferem na acessibilidade da maquinaria de transcrição

afetando consequentemente a expressão de genes relacionados a resposta ao déficit hídrico (MEHROTRA et al., 2014).

Várias técnicas biotecnológicas vem auxiliando ainda mais a compreensão dos mecanismos de resposta da planta sob estresse hídrico e a aquisição de genótipos mais tolerantes. Uma dessas técnicas é a transformação genética o qual permite a inserção de um determinado gene de interesse no genoma da planta. Essa inserção pode ser via método direto (Biobalística) ou método indireto (*Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*). Por meio desta técnica é possível realizar uma caracterização funcional de genes de interesse ou então inserir genes candidatos a aumento de tolerância a estresse hídrico.

Outra abordagem bastante utilizada para a caracterização molecular é a análise de expressão gênica, a qual permite a identificação de genes que podem ser usados como marcadores moleculares, para manipulação genética e até para a comparação de plantas intra e interespecífica sob estresse hídrico. Uma das técnicas mais usadas para a análise da expressão gênica é a RT-qPCR, por possibilitar avaliações rápidas e sensíveis (MOURA et al., 2012). No entanto, para a avaliação correta da expressão gênica se torna necessário a presença de genes de referência, os quais contém uma padrão de expressão mais estável, para a normalização dos dados. Em razão desta necessidade é importante a escolha de candidatos a genes de referência para cada condição testada (espécie, tecido e condição ambiental) (WAN et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo avaliar candidatos a genes de referência mais estáveis para a normalização dos dados de expressão gênica de dois clones do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* e avaliar o padrão de expressão de alguns genes relacionados a defesa ao déficit hídrico nos dois clones (VM01 - Tolerante e VM05 - Sensível). Ademais, o trabalho visou a obtenção de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* transgênicos tolerantes ao déficit hídrico, mediante a inserção do gene *OsCPK5* em seu genoma.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero *Eucalyptus*

Nativo da Oceania, o gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, contém cerca de 700 espécies já descritas, além de muitas variedades e híbridos com interesse comercial (JUNIOR e COLODETTE, 2013). O gênero *Eucalyptus* apresenta uma grande adaptabilidade, facilitando sua presença em diversas regiões tropicais e subtropicais. As espécies de maior interesse são ditribuídas nas regiões da América do Sul, Ásia, Austrália, Europa, entre outras regiões, cobrindo em torno de 20 milhões de hectares. Em cada país apresenta uma grande importância econômica por ser matéria prima de diversos produtos (BLAKE, 2009; POKE et al., 2005; TORRE et al., 2014).

No Brasil, as áreas plantadas com eucalipto totalizam 5.102.030 ha, representando um crescimento anual de 4,5% (228.078 ha) em 2013 quando comparado com o ano anterior. De acordo com as estatísticas divulgadas no mesmo ano, o principal fator para esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios, devido à demanda futura das indústrias do segmento de Papel e Celulose. Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul se destacam no cenário nacional como detentores de 87,1% da área total de plantios florestais nacionais, sendo 22,3% (1.491.681 ha) derivado da produção do estado de Minas Gerais (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES, 2014).

O rendimento médio de uma floresta de eucalipto no Brasil varia de 35 a 50 m<sup>3</sup>/ ha/ano e, dependendo da região, podem-se obter valores ainda maiores, sendo esses dados expressivos quando comparados com seu país de origem, a Austrália, que apresenta um rendimento médio de, aproximadamente, 25m<sup>3</sup>/ ha/ano (PINTO et al., 2014).

As empresas que utilizam o eucalipto como matéria prima para a produção de celulose e papel, carvão vegetal, biomassa, construção civil, uso farmacológico, entre outros, se configuram como um dos setores-chave na economia nacional. Este setor demonstra uma importância econômica grande diante ao mercado, o qual

apresentou um bom desempenho em produção, gerando em torno de 2 milhões de empregos gerados, renda e arrecadação de US\$2,5 bilhões, representando 5% do Produto Interno Bruto Nacional (SOARES; MARCIO; SIDNEY, 2014).

Uma das grandes vantagens do gênero *Eucalyptus* que possibilitam este grande desempenho em produção é a facilidade do cruzamento entre espécies, processo conhecido como hibridação. Um dos híbridos mais utilizados e conhecidos no setor florestal e industrial brasileiro é o *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Este cruzamento reúne as melhores características do *E. grandis* (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação e resistência a doenças, particularmente ao fungo, *Cryphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto), sendo ambos os genótipos utilizados para diversos fins como produção de celulose, papel, chapas duras, serraria, carvão e outros (CIB, 2008; PINTO et al., 2014). Outro híbrido plantado, principalmente para a produção de biomassa e carvão vegetal, é o *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla*, no qual junta os fenótipos de tolerância a seca, madeira com alto poder calorífico e boa capacidade de rebrotação do *E. camaldulensis* e os fenótipos citados do *E. urophylla* (STAPE et al., 2010).

Apesar do grande avanço, o melhoramento genético convencional florestal demonstra algumas limitações para a produção de genótipos mais produtivos, como a longo ciclo para que essas plantas atinjam maturidade reprodutiva e fenotípica levando às dificuldades na obtenção de cultivares tolerantes a estresses biótico e abióticos, como o estresse hídrico (GOLLE et al., 2009).

## **2.2 Impacto do estresse hídrico na agricultura**

No cenário mundial, os estresses ambientais que atingem a agricultura como, o estresse hídrico e a salinidade dos solos, podem provocar um grande impacto negativo tanto na área alimentícia quanto na florestal. Estima-se uma profunda alteração na produtividade agrícola se nada for feito para mitigar os efeitos das mudanças climáticas (WILLADINO e CAMARA, 2010).

De acordo com os relatórios da FAO (2011) e da UN WATER (2014), todo recurso hídrico utilizado pela população brasileira, 60% é destinada para a

manutenção da agricultura. No entanto, estima-se um aumento neste consumo em cerca de 20% nos próximos 50 anos em razão da eminente necessidade da maior produtividade, frente a períodos de seca intensos e demanda por mais alimentos e novos produtos. Mesmo com a adoção da irrigação em algumas plantações, o estresse hídrico vem diminuindo acentuadamente a produção de diversas culturas no Brasil, necessitando de outras abordagens adicionais para reduzir os efeitos deste fator ambiental (CHAVES et al., 2002).

A seca afeta severamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal mais do que qualquer outro fator abiótico (ANJUM et al., 2011). As perdas na produtividade nos cultivos e plantações de eucalipto podem chegar até 20%, valor consideravelmente expressivo quando se trata de milhões de hectares (SOCIEDADE DE INVESTIGAÇÕES FLORESTAIS, 2014). De acordo com Stape et al. (2010), em condições de estresse hídrico, diferentes clones de *Eucalyptus spp.* podem sofrer uma diminuição de 28% do incremento anual de madeira.

O déficit hídrico atinge vários processos fisiológicos como a fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos e absorção de íons que, eventualmente, levam a modificações na morfologia e no desenvolvimento da planta (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Tais mudanças incluem o menor crescimento, devido ao fechamento dos estômatos, menor assimilação de CO<sub>2</sub> e síntese de assimilados, diminuição da área foliar, menor eficiência do aparato fotossintético, menor expansão radicular, entre outras (BARTELS e SUNKAR, 2005). Ademais, em *Eucalyptus spp.*, por ser uma espécie lenhosa, o embolismo nos vasos do xilema prejudicam muito o desenvolvimento da planta sob estresse hídrico intenso (CHOAT et al., 2012). Com o solo seco, aumenta a tensão nos vasos do xilema conduzindo a uma maior probabilidade de cavitação e conseqüentemente uma menor condutividade hídrica dos vasos (BRODERSEN et al., 2013). Foi verificado que este declínio na condutividade do xilema está associado com o fechamento estomático e diminuição da eficiência da fotossíntese (MARTORELL et al., 2013).

Apesar do contexto climático e econômico da espécie, a adaptabilidade ao estresse hídrico no gênero *Eucalyptus* tem sido pouco estudada quando comparado com espécies modelos (SHI et al., 2014; WOO et al., 2011; KHOKON et al., 2010;

NISHIMURA et al., 2010). Ainda assim, a maior parte dos resultados obtidos em espécies de *Eucalyptus* foi observada através de estudos fisiológicos, ecofisiológicos e morfológicos. Estudos que consideram a base genética e molecular do eucalipto em estresse hídrico ainda são escassos (BEDON et al., 2011; THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; VILLAR et al., 2011).

Nas últimas décadas, avanços em técnicas de biologia molecular vêm contribuindo para o maior conhecimento do papel de certos genes relacionados com a resposta de plantas sob estresse hídrico. Após o desenvolvimento dos sequenciadores de nova geração, o sequenciamento dos genomas estruturais e funcionais de várias espécies, como a do próprio *Eucalyptus grandis* (MYBURG et al., 2014), possibilitou a caracterização de diversos genes e suas proteínas.

### **2.3 Bases moleculares de plantas sobre déficit hídrico**

Compreender a resposta das plantas ao estresse hídrico vem sendo uma área ativa nas pesquisas atuais. Historicamente, a resposta a este estresse foi estudada, através de inúmeros experimentos fisiológicos, em diversas espécies de plantas (HIRAYAMA e SHINOZAKI, 2010). Em adição aos estudos fisiológicos e morfológicos, um notável progresso nas áreas de biologia molecular e em suas técnicas tem sido observado recentemente, por exemplo, o sequenciamento do genoma funcional e estrutural de espécies de interesse, como no caso, *Eucalyptus spp* (MYBURG et al., 2014). Estes avanços fornecem informações sobre genes estresse-induzidos, a estrutura e a proteína codificada por este gene, contribuindo desta forma para a melhor compreensão das rotas relacionadas à resposta ao estresse hídrico e consequentemente auxiliar na análise e obtenção de plantas mais tolerantes (MIR et al., 2012).

Em condições de seca, as plantas emitem sinalizações imediatamente após a percepção das mudanças nas relações hídricas (UMEZAWA et al., 2010). Esta rápida sinalização é iniciada através do reconhecimento de osmosensores presentes na membrana celular e, posteriormente, induzem outras proteínas e fatores de transcrição relacionados à resposta ao estresse (MAATHUIS, 2014). Apesar da percepção e sinalização primária serem pouco compreendidos, alguns genes



responsáveis pela codificação de osmosensores de membrana vêm sendo identificados, demonstrando aumentar a tolerância ao estresse hídrico de plantas onde estes genes são superexpressos (OSAKABE et al., 2014). Por exemplo, a proteína *AHK1*, uma histidina kinase localizada na membrana plasmática, e proteínas da família *MAPK* (*Mitogen-activated protein kinase*) quando superexpressas aumentam a tolerância ao estresse hídrico de mudas de *Arabidopsis thaliana* devido à rápida percepção e sinalização ao estresse hídrico (URAO et al., 1999).

Após a percepção do estresse, a biossíntese do fitohormônio ácido abscísico (ABA) é estimulada nas raízes e no mesófilo das folhas. Apesar dos tecidos foliares produzirem ABA, estudos comprovaram que grande quantidade deste composto é sintetizada nos tecidos radiculares e transportada, via xilema, para a parte aérea (MILOSAVLJEVIĆ et al., 2012). Este fitohormônio participa de respostas fisiológicas importantes, como o fechamento estomático, ativação de genes *downstream*, produção e acúmulo de íons, solutos e metabolitos visando a proteção da planta à escassez de água (FUJITA et al., 2011). O conhecimento adquirido sobre a biossíntese de ABA, derivado de muitos estudos feitos com *A. thaliana* e outras espécies modelo, é aplicável para outras plantas de interesse agrônomo, pois a rota e os respectivos genes relacionados são conservados (GOLLEC e SZAREJKO, 2013).

A biossíntese do ABA inicia com a epoxidação dos compostos zeaxantina e anteraxatina para violaxatina, sendo essa reação catalisada pela zeaxantina epoxidase (*ZEP*). Após uma série de modificações do composto violaxantina, controlada pela enzima ABA4, este é convertido em 9-cis-epoxycarotenoides (9-cis-neoxantina e 9-cis-violaxantina). Uma clivagem oxidativa desses 9-cis-epoxycarotenoides, pela enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxygenase (*NCED*), produz um composto intermediário C15 chamado xantoxina (Figura 1). A xantoxina, anteriormente encontrada no interior dos plastídeos, é exportada para o citoplasma, onde mais duas reações via ABA-aldeído ocorrem. A primeira etapa é a catalise por uma álcool desidrogenase/reductase (*ABA2*) gerando ABA aldeído, posteriormente a enzima ABA aldeído oxidase (*AAO*) catalisa o último passo na

biossíntese, a conversão do ABA-aldeído no fitohormônio ABA (GOLEC e SZAREJKOG, 2013; CHRISTMANN et al., 2006).

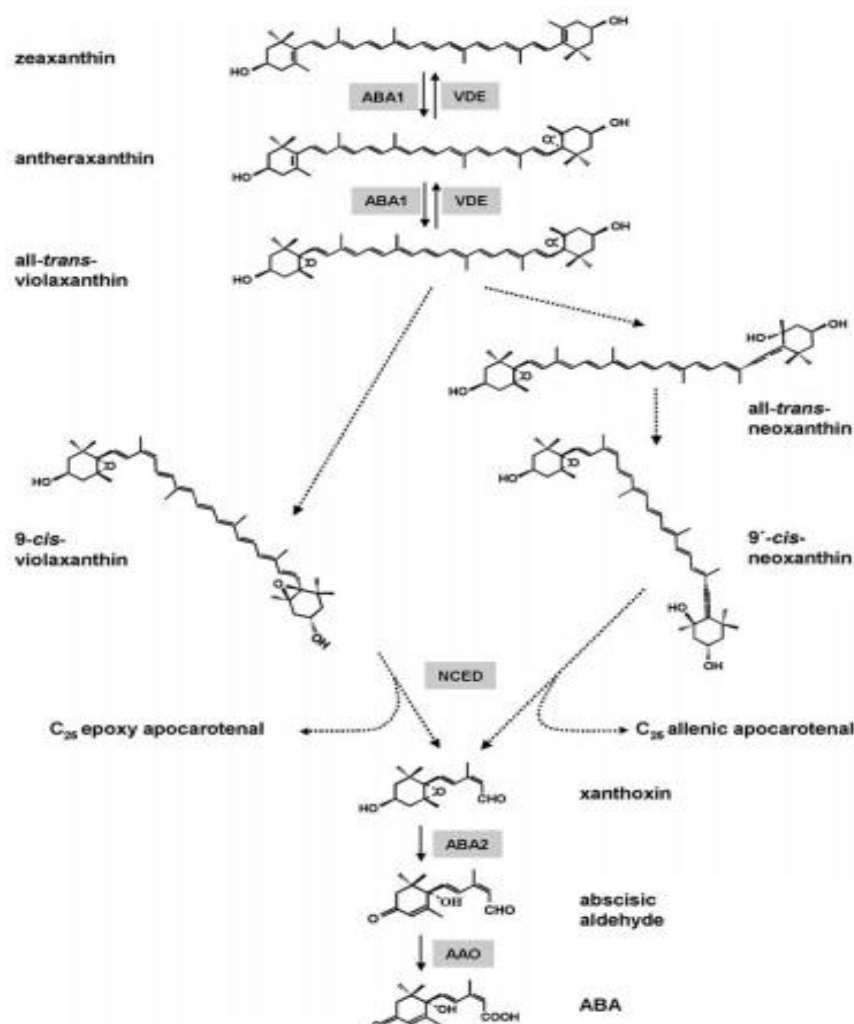


Figure 1. Esquema da rota da síntese do fitohormônio ABA. Fonte: CHRISTMANN et al., 2006.

Dentre os genes que participam da biossíntese do ABA, os da família *NCED*, relacionados com a clivagem oxidativa dos 9-cis-epoxycarotenoides formando o composto xantoxina (Figura 1), são os mais estudados. Através de estudos em *Arabidopsis*, milho, entre outras espécies, verificou-se que o gene *NCED3* é expresso rapidamente e de forma mais acentuada em genótipos tolerantes (IUCHI et al., 2001; WOO et al., 2011).

Após sua biossíntese, o ABA liga-se ao complexo proteico *PYR/PYL/RCAR* [*Pyrabactin Resistance1 (Pyr1) /PYR1-Like (PYL)/Regulatory Components of ABA Receptors (RCAR)*], o qual apresenta domínios hidrofóbicos que reconhecem este fitohormônio, mudando sua conformação para um estado mais compacto (Figura 2) (NISHIMURA et al., 2010). Nesta etapa, inicia-se a cascata responsiva ABA-dependente. Através de análises de interação de proteínas, foi verificado que as proteínas *PYR/PYL/RCAR*, após o reconhecimento e ligação com o ABA, interage com proteínas da família *PP2C* (*2C-type Protein Phosphatases*) (PARK, et al 2009). Em virtude da sua função de defosforilação, *PP2C* apresenta uma interação negativa com proteínas kinase da subclasse III da família *SnRK2* (*SNF1- related protein kinase 2*). No entanto, ao se ligar com as proteínas *PYR/PYL/RCAR*, a *PP2C* diminui a interação, ativando a função kinase das proteínas *SnRK2* (ZHANG et al., 2014), tornando possível a cascata responsiva ABA-dependente (Figura 2).

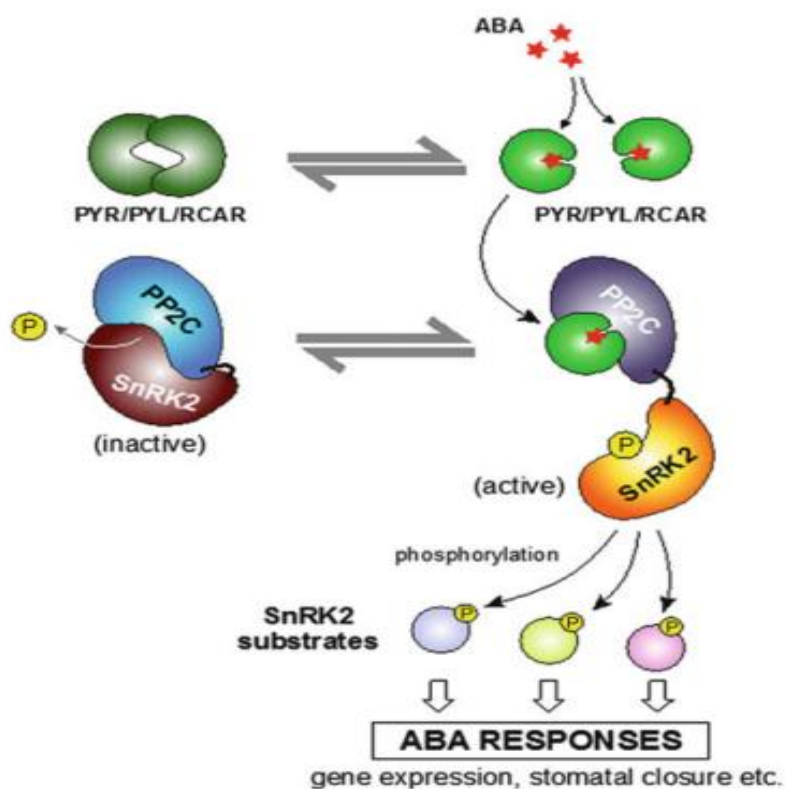


Figure 2. Esquema representativo da sinalização ABA-dependente. Após a biossíntese de ABA, este se liga ao complexo *PYR/PYL/RCAR*, induzindo uma mudança conformacional destas moléculas. As proteínas inativadoras *PP2C*, reconhecem *PYR/PYL/RCAR* + ABA, diminuindo a afinidade com as proteínas *SnRK2*. Assim, as *SnRK2* são capazes de ativar outras proteínas ou fatores de transcrição downstream e assim continuar com a resposta ao estresse hídrico. Fonte: KUROMORI et al., 2014.

A proteína *SnRK2* é conhecida por ativar, através de sua propriedade cinase, vários outros genes *downstream*, inclusive o fator de transcrição *ABRE* (*ABA-responsive element*). Este fator de transcrição reconhece uma sequência conservada de 8 pb (ACGTGG/TC) nas regiões promotoras de genes relacionados a resposta ao estresse hídrico (Figura 3) (SHINOZAKI e YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2005; MISHRA et al., 2014). Para o reconhecimento dos fatores de transcrição *ABRE* é necessário mais de uma cópia da sequência na região promotora para ativar a maquinaria de transcrição. Contudo, algumas vezes a sequência (ACGTGG/TC) é acompanhada de um elemento *cis-acting*, como por exemplo, o *DRE/CRT*, sendo este último reconhecido por fatores de transcrição presentes, principalmente, na via ABA-independente (MARUYAMA et al., 2012).

Apesar da cascata ABA-dependente ser crucial para a resposta da planta ao estresse hídrico, alguns genes se expressam em mutantes, cuja sinalização de ABA foi comprometida, sugerindo uma rota ABA-independente (AGGARWAL et al., 2010). Após a percepção do estresse, fatores de transcrição são expressos e desempenham uma função regulatória em genes denominados funcionais. Uns destes fatores de transcrição reconhecem a sequência DRE (*Dehydration-Responsive Element* - TACCGACAT) presente em vários genes induzidos por desidratação (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013). Vários membros pertencentes à família DREB/CRT (*DRE-Binding Protein/CRT -Binding factor*), já foram caracterizados em diversas espécies, tais como *Arabidopsis thaliana* (LIU et al., 2000), *Glycine max* (MIZOI et al., 2012), *Oriza sativa* (MATSUKURA, et al., 2010), entre outras, demonstrando ter uma alta expressão em plantas sob estresse hídrico, além de aumentar a tolerância em plantas geneticamente modificadas (CHEN et al., 2007; KASUGA et al., 2004).

Além das rotas mediadas por *ABRE* e *DREB/CRT*, existem outros fatores de transcrição que são expressos em condições de estresse hídrico, induzindo mudanças nos padrões de expressão de genes responsivos. Os genes da família *NAC*, regulados tanto pela via ABA-dependente quanto pela via ABA-independente, também desempenham papel regulatório, reconhecendo sequências específicas na região promotora e ativando a transcrição de certos genes (NAKASHIMA et al., 2012). Outros fatores de transcrição conhecidos por participarem da cascata responsiva ao estresse hídrico são os *MYB* e *MYC* (Figura 3). Estes fatores de transcrição reconhecem sequências específicas das regiões promotoras, nomeadas *MYBR* e *MYCR*, de genes funcionais relacionados com estresse hídrico, quando estimulados pela rota ABA-dependente (SHINOZAKI e YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2005).

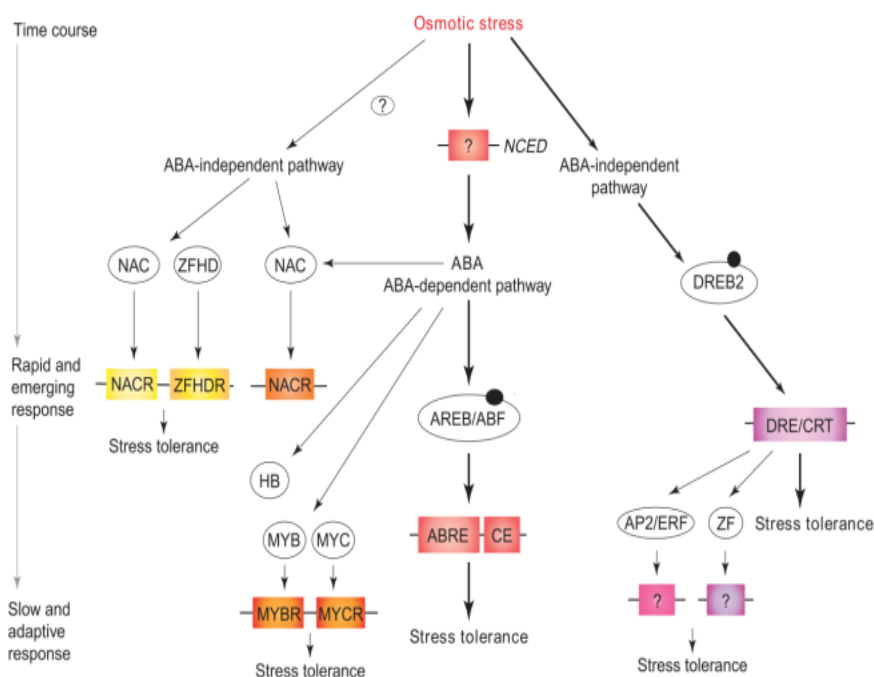


Figure 3. Rede de regulação através de fatores de transcrição e elementos cis-acting envolvidos na expressão de genes responsivos. O estresse hídrico ativa dois tipos de resposta diferentes, ABA-dependente e ABA-independente. Na rota ABA dependente, após a síntese do fitohormônio, fatores de transcrição *AREB/ABF*, e *MYB/MYC* são ativados regulando a expressão de genes responsivos downstream. Na segunda rota, ABA-independente, os fatores de transcrição da família DREB e NAC desempenham papéis importantes nos mecanismos de tolerância, sendo que este último pode também ser dependente de ABA. Fonte: SHINOZAKI e YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2005.

Além da indução da expressão gênica e a consequente resposta fisiológica mediada pelas vias ABA-dependente e ABA-independente, as plantas apresentam mensageiros secundários, como por exemplo, as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), íons  $\text{Ca}^{2+}$  e moléculas de fosfolípídeos, que participam da rápida sinalização do estresse e ativação de várias rotas e processos fisiológicos. Essas moléculas são sintetizadas em consequência a relação hídrica comprometida, sinalização de fitohormônios, osmosensores e influxo/efluxo de canais iônicos presentes nas membranas das células e de organelas (CHENG et al., 2002; ZHU, 2002).

A variedade de classes de lipídeos mensageiros, como o ácido fosfatídico (PA), o diacilglicerol, inositol polifosfato (IP), é formada por causa da modificação dos lipídeos de membrana através da ação de varias enzimas, incluindo kinases

lipídicas e/ou fosfatases (Fosfolipase D). Assim que formados, esses fosfolípidos auxiliam na ativação de proteínas, na sinalização do ABA e na resposta ao estresse oxidativo (HONG et al., 2010). Além disso, moléculas de Inositol Trifosfato (IP3) podem induzir o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativando proteínas receptoras de cálcio (*CDPK* – *Calcium-Dependent Protein Kinase*, *MAPK* - *Mitogen-Activated Protein Kinase*, *SOS/CIPK* - *CBL-inter acting protein kinase*). Estas proteínas kinase são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição ABA-dependentes (*ABRE family*), ABA-independentes (*DREB/CRT family*), modificações de canais iônicos responsáveis pelo fechamento/abertura estomática (*SLAC1*) e regulação de genes funcionais (HIRAYAMA e SHINOZAKI, 2010; MAHAJAN e TUTEJA, 2005).

Dentre os mensageiros secundários envolvidos na sinalização, o  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel muito importante nos processos fisiológicos de defesa da planta ao estresse. As plantas têm múltiplos locais para estoque de cálcio, incluindo o apoplasto, vacúolos, retículos endoplasmáticos, cloroplastos e mitocôndria. Cada estímulo pode extrair este íon de seus diferentes compartimentos através da alteração da atividade de distintos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (BOUDSOCQ e SHEEN, 2012; SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013).

As ERO's em plantas atuam como mensageiros secundários semelhante ao  $\text{Ca}^{2+}$  e alguns fosfolípidos (ANJUM et al., 2011). Essas moléculas ( $\text{NO}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e radicais  $\text{OH}$ ) se formam através do metabolismo do oxigênio de acordo com a atividade de algumas enzimas como a NADPH oxidase, e são armazenadas em peroxissomos, plastídeos e mitocôndrias (FAROOQ et al., 2009). Assim que produzidos, as ERO's são conhecidas por atuar na sinalização do ABA (Interação  $\text{H}_2\text{O}_2$  e proteínas *PP2C*), fechamento e abertura estomática (Óxido Nítrico juntamente com ABA) (KHOKON et al., 2010). No entanto, dependendo da severidade do estresse hídrico, os níveis de ERO's aumentam drasticamente resultando na peroxidação de lípidos, degradação de proteínas, fragmentação do DNA e até a morte celular. Genótipos designados tolerantes tem a capacidade de sintetizar, com maior magnitude, certas proteínas (Superóxido dismutase (*SOD*), Peroxidase (*POD*), Catalase (*CAT*), Ascorbato peroxidase (*APX*)) que atuam na degradação de ERO's garantindo a homeostase celular (YANG et al., 2009).

Por meio de estudos em genômica e transcriptômica, os genes que são induzidos por estresse, os quais funcionam na aquisição da tolerância, foram categorizados em dois grupos. O primeiro grupo são todos os genes que tem função regulatória, incluindo proteínas kinase, componentes da sinalização do ABA, enzimas relacionadas na sinalização lipídica e vários fatores de transcrição (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006), descritos anteriormente. O outro grupo, denominados genes funcionais, são aqueles que codificam proteínas relacionadas diretamente com a homeostase celular e do organismo, incluindo *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*), chaperonas, enzimas antioxidantes e biossíntese de osmólitos (KUROMORI et al., 2014).

Nos últimos anos, estudos demonstraram que modificações epigenéticas afetam drasticamente a resposta das plantas a fatores abióticos. A regulação da cromatina, por meio de modificações das caudas das histonas (Acetilação, Metilação, Fosforilação, SUMOilação e/ou Ubiquitinação dos aminoácidos da cauda) e Metilação ou Desmetilação do DNA, podem dificultar ou induzir o acesso da maquinaria de transcrição ao gene a ser expresso, além de atuar na expressão ou repressão de elementos transponíveis (KURDISTANI et al., 2004; POKHOLOK et al., 2005). Especificamente, a metilação do DNA ocorre em três sequências, CG, CHG e CHH, onde H equivale a uma das três bases A, C ou T, sendo mediada por enzimas metiltransferases, como, a *MET1*. A metilação está presente principalmente em regiões promotoras, impedindo a transcrição, ou então em elementos transponíveis, desempenhando papel crucial na repressão destas sequências e seu translocamento (LAW e JACOBSEN, 2010). Mais fatores são considerados cruciais para a metilação do DNA, como, os genes da família *SnF2* ou remodeladores da cromatina (*DDMI*). Estas enzimas, através da hidrólise de ATP, movem-se ao longo da fita de DNA descompactando os nucleossomos para o acesso das proteínas como a *MET1*, e fatores de transcrição (RYAN e OWEN-HUGHES, 2011).

Os mecanismos de tolerância a déficit hídrico incluem relações de *feedback* entre fitormônios (Ácido jasmônico, Citocininas e o Etileno com o ABA) e entre rotas ABA-dependente, ABA- independente, mensageiros secundários, genes funcionais juntamente com mudanças epigenéticas, como demonstrado



anteriormente. Devido a esta complexidade, mais pesquisas são necessárias para auxiliar a obtenção de genótipos mais tolerantes e, conseqüentemente, mais adaptados às condições adversas (WILLADINO e CAMARA, 2010).

#### 2.4 Sinalização do $\text{Ca}^{2+}$ e a família CDPK

Os íons cálcio encontram-se estocados, em maior quantidade, nos vacúolos das células vegetais (na ordem de mM), mas também estão contidos em outras organelas como cloroplasto, mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático e no citosol, apesar deste último conter uma menor concentração (cerca de 200 nM) em células não estimuladas (CHENG et al., 2002). Após a planta perceber o estresse hídrico, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta consideravelmente, na ordem de 200 nM para 1-2  $\mu\text{M}$ , devido a uma série de sinalizadores (Figura 4) (RUDD e FRANKLIN-TONG, 1999). Um desses sinalizadores, Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), é gerado a partir de fosfolípeidos. Neste caso, após percepção de osmosensores, enzimas Fosfolipases C se tornam ativas e catalisam a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em diacilglicerol e IP3 (MAHAJAN e TUTEJA, 2005).

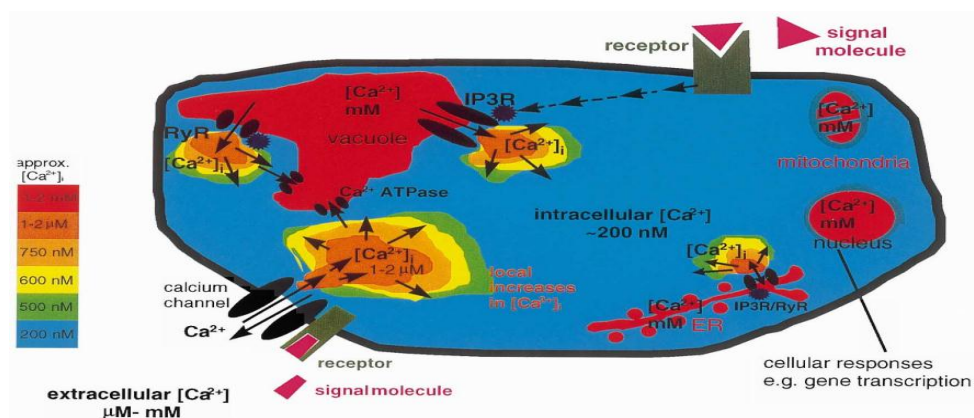


Figure 4. Representação da localização e mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  em células sob estresse hídrico. As cores (barra gradiente no lado esquerdo) representam a magnitude da concentração no meio externo, meio intracelular e nas organelas. Após a percepção do estresse, através de receptores de membrana (lado direito superior), moléculas de Inositol Trifosfato (IP3) são formadas atuando como sinalizadoras. Receptores de IP3 e Rianodina (ou receptores de cálcio) estão presentes nas membranas das organelas no qual possibilitam o efluxo de cálcio para o meio intracelular em células estimuladas. Fonte: RUDD e FRANKLIN-TONG, 1999.

Ao ser formado o IP3 reconhece receptores específicos nas membranas das organelas que estocam este íon, permitindo o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio citosólico. O efluxo de cálcio também pode ser intermediado pelo próprio íon através de receptores específicos, conhecidos como Receptores Rianodina (RyR) (KNIGHT, 1999).

As plantas possuem três famílias de sensores de cálcio: Calmodulinas (CaM), Calcineurina B-Like (CBL) e CDPK (*Calcium-dependent Protein Kinase*). Ao contrário das CaM e CBL, que reconhecem o  $\text{Ca}^{2+}$  e induzem a mudança conformacional em outras proteínas, as CDPK apresenta a característica única de reconhecer o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativar proteínas e fatores de transcrição através de eventos de fosforilação (BOUDSOCQ e SHEEN, 2013).

As proteínas da família CDPK tem uma estrutura molecular conservada, consistindo em um domínio N-terminal variado, seguido de um domínio kinase Ser/Thr e um domínio ativo de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAD) (Figura 5A). O domínio CAD é formado por uma região de pseudo-substrato e um domínio de reconhecimento de cálcio, altamente homólogo a calmodulina (SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013). Dentro do domínio de reconhecimento de cálcio, encontram-se quatro motivos relacionados com Fatores de Elongação, os quais apresentam diferentes afinidades ao  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando em uma diversidade de genes dentro da família CDPK em várias espécies, como em *Arabidopsis* (34 membros), *Oryza sativa* (29 membros), *Triticum aestivum* (20 membros), *Zea mays* (35 membros) e *Populus trichocarpa* (20 membros) (HARMON et al., 2000; ASANO et al., 2005; LI et al., 2008; MA et al., 2013; ZUO et al., 2013).

Baseado em estudos recentes, um modelo para a ativação das proteínas CDPK foi proposto, no qual após o reconhecimento dos íons cálcio pelo domínio CAD uma mudança conformacional é induzida conduzindo à liberação do pseudosubstrato do local ativo (Figura 5B) (LIES e ROMEIS, 2013). Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , a região do pseudosubstrato e N-terminal da CAD formam duas  $\alpha$ -hélices extensas que bloqueiam o sitio ativo do domínio Kinase. Após o estresse hídrico, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  em compartimentos específicos, inclusive no citosol e no núcleo, aumenta sendo reconhecido e ligado nos domínios CAD das proteínas CDPK's. Após esta ligação, a quebra da conformação  $\alpha$ -hélices é feita, induzindo a

rotação de todo este domínio regulatório em torno da região Kinase, liberando-a para auto-fosforilação ou então fosforilação de proteínas *downstream* (ASANO et al., 2012).

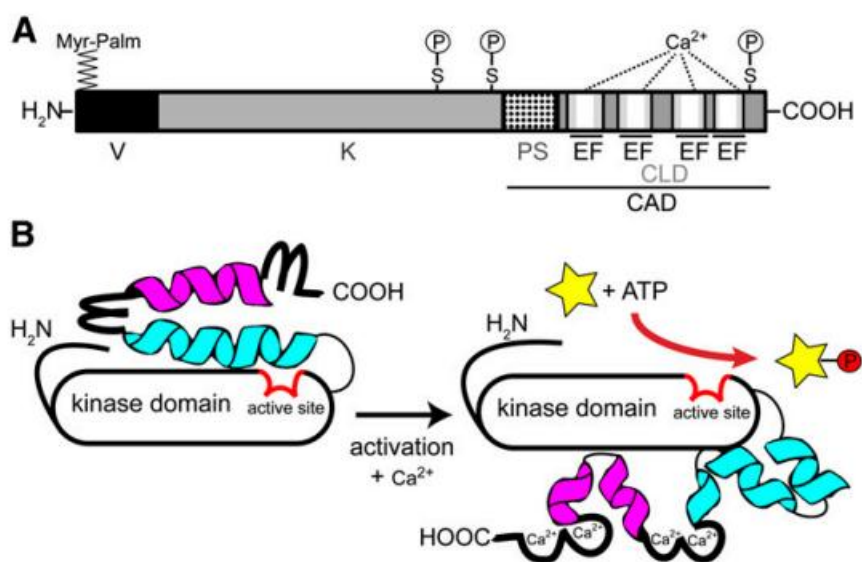


Figure 5. Representação dos domínios conservados da família CDPK e do papel destes e da ligação do cálcio na atividade kinase. Na figura 5A estão demonstrados todos os domínios da família: o domínio variável N-terminal (Em preto), o domínio Kinase (Em Cinza) e, em seguida, o domínio CAD (Pseudosubstrato juntamente com os quatro fatores de alongação EF). Na figura 5B, está representado a conformação antes (lado direito) e depois (lado esquerdo) do reconhecimento e ligação do cálcio no domínio CAD. Fonte: SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013.

Devido a diferença de afinidade pelo Ca<sup>2+</sup> no domínio CAD, assim como variabilidade no domínio N-terminal, a família CDPK desempenha diversas funções no desenvolvimento da planta e na percepção, sinalização e resposta ao estresse hídrico (BOUDSOCQ e SHEEN, 2013). Através de estudos com transformação genética, mutantes, proteômica e expressão gênica, verificou-se que as funções dentro da família CDPK variam desde sinalização da rota ABA-dependente (*AtCPK10*, *AtCPK12*, *AtCPK30* e *AtCPK32* compartilham substrato/genes downstream com a proteína SnRK2), até produção de ERO's, osmólitos e fechamento/abertura estomática (BOUDSOCQ e SHEEN, 2013; FRANZ et al., 2011; GEIGER et al., 2010; ZOU et al., 2010).

O fechamento estomático é um processo extremamente importante para a tolerância da planta ao estresse hídrico, impedindo ou diminuindo a perda de água por evapotranspiração. O  $\text{Ca}^{2+}$  é um componente essencial para a sinalização nas células guarda dos estômatos (ZOU et al., 2010). Muitas proteínas da família CDPK foram comprovadas por reconhecer o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol, devido a sinalização do ABA e  $\text{IP}_3$  dentro das células guarda, se ligar e ativar canais iônicos induzindo o fechamento estomático. Especificamente, foi demonstrado que a proteína *AtCPK6* ativa o efluxo de íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através de modificações dos canais *SLAC1* (*Slow-type Anionic Channels*) e *SLAH3* (*SLAC 1 Homolog3*), resultando em uma modificação do potencial hídrico da célula, a perda de água devido a sua difusão e o fechamento estomático (BRANDT et al., 2012; MORI et al., 2006). Além disso, as proteínas *AtCPK6* induzem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e também a biossíntese de ERO's e prolina. De acordo com Xu et al. (2010), ao desenvolver plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *AtCPK6*, verificou uma maior tolerância destas comparadas com o grupo controle.

## 2.5 Transformação genética de plantas

A modificação genética baseada na tecnologia do DNA recombinante possibilita a transferência de genes de interesse entre espécies de gêneros e até reinos diferentes. A transformação genética de plantas é realizada por meio de diferentes métodos que podem ser agrupados em duas categorias: transformação indireta e transformação direta. O método direto pode ser realizado por métodos físicos e químicos, ressaltando-se a técnica da biobalística, na qual consiste em bombardear o tecido-alvo com micropartículas de ouro ou tungstênio recobertas pelo plasmídeo no qual está o gene de interesse. As micropartículas variam entre 0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e podem ser aceleradas com ar comprimido (hélio), onda de choque elétrico ou pólvora. Nesse método, as micropartículas são disparadas na direção do tecido-alvo para penetrar a parede celular e transferir o DNA exógeno para o interior das células (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010; MATEUS e SILVA, 2013).

No método de transformação indireta, a transferência de genes é intermediada por bactérias do gênero *Agrobacterium*, as quais são capazes de infectar plantas naturalmente e produzir um sintoma conhecido como galha da coroa, no caso da espécie *A. tumefaciens*. Essas bactérias possuem um plasmídeo denominado Ti (*Tumor-inducing*), o qual contém as regiões necessárias para a translocação e a inserção do T-DNA (segmento de DNA contendo genes de auxina/citocinina e genes de opina). Sendo assim, há possibilidades de utilizar linhagens de *Agrobacterium* como vetores no processo de transformação de plantas. Para tal, são excluídos os oncogenes (T-DNA), obtendo-se uma linhagem “desarmada” e o segmento de DNA de interesse é inserido entre as extremidades da região-T ou então é utilizado um vetor binário contendo esse segmento flanqueado pelas bordas esquerda e direita indispensáveis para o procedimento de infecção (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010; QUOIRIN, 2006; SARTORETTO et al., 2008). O sistema de transformação utilizando *A. tumefaciens* possui como vantagem um custo mínimo em equipamentos e protocolos relativamente fáceis e, também, plantas transformadas por esse método normalmente apresentam um baixo número de cópias do DNA, evitando, assim, um possível silenciamento gênico (ANDRADE, 2001).

Na transformação genética são necessários alguns pré-requisitos como, por exemplo, a construção de um vetor contendo o gene de interesse, um bom método de infecção, incluindo condições de co-cultivo e o tipo de cepa bacteriana, seleção do tecido transgênico através de um agente seletivo específico e um eficiente protocolo de regeneração de plantas (GIRIJASHANKAR, 2011).

Dentre os principais fatores que interferem na eficiência de transformação estão as cepas de *A. tumefaciens* e o método de infecção empregado. Diversas cepas já foram utilizadas para transformação genética de eucalipto, destacando a cepa LBA4404, a qual foi utilizada em trabalhos prévios, obtendo eficiência na transformação das espécies *Eucalyptus tereticornis* (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2011), *E. camaldulensis* (AHAD; MAQBOOL; MALIK, 2014) e do híbrido *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla* (LIU et al., 2010). Vários métodos de infecção já foram descritos, entre os quais o uso da sonicação (TORRE et al., 2014), agitação (ALCANTARA; FILHO; QUOIRIN, 2011) e infiltração a

vácuo (CACHE-MOO et al., 2006). Balieiro (2013), após testar os três protocolos de infecção citados em clones do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, verificou uma melhor eficiência com o método de infiltração a vácuo.

Em relação à taxa de regeneração, foi estabelecido, recentemente, um eficiente protocolo de organogênese indireta através da indução de ápices caulinares do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Os calos induzidos demonstraram uma taxa de regeneração relativamente alta, com aproximadamente 50 brotos por calo (BATISTA, 2012). Através de métodos que apresentam uma alta taxa de regeneração a probabilidade de obter um evento transformante pode aumentar.

Na fase de seleção, os tecidos vegetais que passaram pela etapa de infecção ficam em contato com um agente seletivo resultando na sobrevivência das plantas transformadas, contendo o gene de interesse assim como um gene que confere resistência a essa substância específica (MALNOY et al., 2010). Um dos genes marcadores de seleção mais utilizados é o gene *bar* que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (PPT), cujo princípio ativo é o glufosinato de amônio (JARDAK-JAMOUSSI et al., 2008). Este herbicida causa a inibição da enzima glutamina sintetase e, conseqüentemente, diminui a eficiência do sistema fotossintético, aumentando a concentração de  $\text{NH}_4^+$  e diminuindo o conteúdo de glutamina, glutamato, aspartato, asparagina, serina e glicina na planta, podendo leva-la à morte (WENDLER; BARNISKA; WILD, 1990; BARBERIS, 2012). O gene *bar* codifica uma enzima chamada fosfinotricina acetil transferase que inativa o princípio ativo do herbicida através de acetilação, ou seja, se a planta contiver inserido em seu genoma este gene *bar*, ela será resistente ao PPT (ÁY et al., 2012). Para o início da fase de seleção é crucial realizar experimentos para a validação da concentração do PPT para o genótipo e tecido utilizado (Curva de Mortalidade), a fim de aumentar a eficiência de seleção dos eventos transformantes (FENG et al., 2008; SELAVARAJ et al., 2010).

Estudos recentes mostram a utilização da transformação genética de eucalipto via *Agrobacterium spp.*, com a finalidade de modificação e biossíntese de celulose, aumento da biomassa e modificação do conteúdo de lignina (HUSSEY et al., 2011; QUANG et al., 2012; TIAN et al., 2013; SHINYA et al., 2014; TORRE

et al., 2014). Muitos estudos ainda visam à otimização de protocolo de transformação genética de algumas espécies e híbridos, utilizando genes repórteres, de genótipos com interesse comercial (BALIEIRO, 2013; MENDONÇA et al., 2013).

Tendo em vista a importância econômica das espécies de eucalipto, a biotecnologia, juntamente com o melhoramento convencional, vem sendo utilizada para o aumento de ganhos em produtividade. Especificamente, a engenharia genética de eucalipto, apesar de estar em fase inicial devido a certos obstáculos como, por exemplo, a alta dos custos de geração de plantas transgênicas, patentes, biossegurança, entre outras, oferece a possibilidade de um aumento de produtividade, diminuindo a perda decorrente por estresses bióticos e abióticos como o estresse hídrico (GRATTAPAGLIA e RESENDE, 2010).

## 2.6 RT-qPCR e genes de referência

A quantificação da expressão gênica é uma análise crescente em várias áreas no campo da biologia. A avaliação dos padrões da expressão de genes chave para determinados processos fisiológicos é extremamente importante para a compreensão deste processo em si e na caracterização de genes relevantes com a mesma função biológica em espécies pouco estudadas (VANDESOMPELE et al., 2002). Varias técnicas foram desenvolvidas a fim de estudar estes padrões, destacando a RT-qPCR (*Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*), um método amplamente utilizado para análise da expressão de genes devido a sua sensibilidade, rapidez, reprodutibilidade e alta precisão na quantificação (PFAFFL, 2004).

No entanto, para a acurácia e reprodutibilidade na quantificação da expressão de genes alvo, alguns fatores devem ser observados, como a quantidade e qualidade de material inicial, presença de inibidores nas diferentes amostras, desenho de *primers*, extração de RNA, degradação do DNA genômico e a eficiência da reação da transcriptase reversa para a síntese de cDNA (ALMEIDA et al., 2010). Devido a esses fatores é fundamental a normalização dos dados obtidos, através da utilização de genes com expressão constante e estável em diferentes

condições, tecidos e genótipos, para a aquisição de resultados confiáveis. Caso a normalização seja realizada por meio de genes não validados ou instáveis, isso implicará em um impacto significativo na quantificação da expressão gênica podendo levar a conclusões errôneas. Neste caso, se tornou evidente a necessidade de validação da estabilidade de expressão de genes de referência candidatos, particularmente, para cada sistema experimental (GUENIN et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2008; HUGGETT et al., 2005).

Um gene de referência ideal deve, preferencialmente, apresentar um padrão de expressão estável entre as amostras, incluindo diferentes tecidos e células, estágios de desenvolvimento e condições ambientais (WAN et al., 2010; WONG; MEDRANO, 2005). Com o reconhecimento da importância da escolha e validação de genes de referência para a normalização dos dados de RT-qPCR, vários genes foram avaliados e indicados como candidatos para este processo (MAFRA et al., 2012). Anteriormente, acreditava-se que os genes que apresentavam função celular básica, *housekeeping genes*, como o 18S rRNA, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), Fator de alongação-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), Poliubiquitina (*UBQ*), Actina (*ACT*) e Tubulina (*TUB*) eram ideais para a normalização dos dados para a quantificação da expressão gênica (CASSAN-WANG et al., 2012). Entretanto, estudos recentes já demonstraram que a expressão destes genes varia de acordo com a espécie e com as condições experimentais. Além disso, outros genes foram indicados como genes estáveis para a normalização de dados (CASTONGUAY; MICHAUD; DUBÉ, 2015; DA SILVA et al., 2015). Particularmente, poucos estudos sobre validação de genes de referência foram feitos em *Eucalyptus spp.*, mas a maioria deles verificaram estabilidade ao analisar os genes Fator de alongação-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), Proteína fosfatase subunidade 2A (*PP2A-1* e *PP2A-3*), SAND protein (*SAND*), Poliubiquitina (*UBQ*), NADP Isocitrato desidrogenase (*IDH*), entre outros (BOAVA et al., 2010; CASSAN-WANG et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2010; MOURA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Para classificar os genes de referência com base em sua variabilidade de expressão e estabilidade entre amostras, quatro principais algoritmos, *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN, JENSEN e ORNTTOFT, 2004), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004) foram desenvolvidos,



possibilitando a avaliação dos candidatos a gene de referência e a escolha dos mais estáveis para a normalização dos dados de expressão gênica.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of selected elite clone(s) of *Eucalyptus tereticornis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Verlag, v.33, n.5, p.1603–1611, 2011.

AHAD, A.; MAQBOOL, A.; MALIK, K. A. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Eucalyptus camaldulensis*. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v. 46, n.2, p. 735-740, 2014.

ALCANTARA, G. B.; FILHO, L. C. B.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.68, n.2, p. 246-251, 2011.

ALMEIDA, M. R., et al. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC molecular biology**, Porto Alegre v.11, n.1, p.1-12. 2010.

ANDERSEN C.L.; JENSEN J.L.; ORNTOFT T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Denmark, v.64, n.1, p.5245–5250, 2004.

ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética de *E. grandis* via *Agrobacterium***. 2001. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, 2001.

ANJUM, S. A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v.6, n.9, p. 2026-2032, 2011.

ASANO, T., et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis

of the CDPKs gene family in rice. **Plant and Cell Physiology**, Ibaraki, v.46, n.2, p.356-366. 2005.

ASANO, T., et al. CDPK-mediated abiotic stress signaling. **Plant signaling & behavior**, Tsukuba, v.7, n.7, p.817-821. 2012.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Anuário estatístico**: ano base 2013. Brasília, 2014. 80 p. Disponível em: <http://www.emobile.com.br/site/industria-e-marcenaria/relatorio-iba-2014-dados-sobre-o-setor-industrial-de-arvores-plantadas/> > Acesso em 10/07/2015.

ÁY, Z., et al. The Effect of High Concentrations of Glufosinate Ammonium on the Yield Components of Transgenic Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Constitutively Expressing the bar Gene. **The Scientific World Journal**, Szeged, v.2012, n.1, p.1-9, 2012.

BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BARBERIS, L.R.M.; **Metodologia para determinação de efeitos fisiológicos e metabólicos do glufosinato em soja**. 2012, 75p. Tese (Doutorado em Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP, Botucatu, 2012.

BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, Bann, v.24, n.1, p.23-58. 2005.

BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BEDON, F, et al. Interaction between environmental factors affects the accumulation of root proteins in hydroponically grown *Eucalyptus globulus* (Labill.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Montpellier v.49, n.1, p.69–76. 2011.

BLAKE, E. S. T. **VARIAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DA MADEIRA E DO CARVÃO DE UM CLONE DE *Eucalyptus grandis* W . Hill ex Maiden x** Universidade Federal de Lavras - [S.l.]. 2009.

BOAVA, L. P., et al. Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. **BMC research notes**, Botucatu, v.3, n.1, p.43-52. 2010.

BOTREL, M. C. G., et al. Genetic improvement of *Eucalyptus* charcoal properties. **Revista Árvore**. Lavras, v. 31, n. 3, p.391-398, 2007.

BRANDT, B., et al. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Purdue, v.109, n.26, p.10593-10598, 2012.

BRODERSEN, C., et al. In vivo visualizations of drought-induced embolism spread in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology**, Florida v.162,n.4, p.1–10. 2013.

BOUDSOCQ, M., SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. **Trends in plant science**, Boston, v.18, n.1, p.30-40. 2013.

CACHE-MOO, R. L. R., et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Calle, v. 84,n.3, p.373–377, 2006.

CARRERA, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. São Paulo, v. 24, n.70, p. 149-164, 2010.

CASSAN-WANG, H., et al. Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription–PCR analysis of gene expression in organs and tissues of *Eucalyptus* grown in various environmental conditions. **Plant and Cell Physiology**, Toulouse, v.53, n.12, p.2101-2116. 2012.

CASTONGUAY, Y., MICHAUD, J., DUBÉ, M. P. Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Environmentally and Developmentally Regulated Gene Expression in Alfalfa. **American Journal of Plant Sciences**, Québec, v.6, n.1, p.1-11. 2015.

CHAVES, M. M., et al. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of botany**, Lisboa, v.89, n.7, p.907-916, 2002.

CHAVES, M. M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, Lisboa, v.103, n.4, p.551-560, 2009.

CHENG, S. H., et al. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. **Plant Physiology**, Boston, v.129, n.2, p.469-485, 2002.

CHEN, M., et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and biophysical research communications**, Beijing, v.353, n.2, 299-305. 2007.

CHOAT, B., et al. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, Richmond, v.491, n.7426, p.752-755, 2012.

CHRISTMANN, A., et al. Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. **Plant Biology**. München v.8, p.314 – 325, 2006.

**CIB. Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável.** Disponível em:  
[http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf)  
Acesso em: 10/07/2015.

DA SILVA, H. A. P., et al. Evaluation of Reference Genes for RT-qPCR Normalization in Cowpea under Drought Stress during Biological Nitrogen Fixation. **Crop Science**. Rio de Janeiro, v.55, n.1, p.1–13, 2015.

FAO, **FAOSTAT: production-crops**. Disponível em:  
<http://faostat3.fao.org/browse/E/EW/E2011>> Acesso em: 12/07/2015.

FAROOQ, M., et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: **Sustainable Agriculture**. Springer.Netherlands. p.153-188, 2009.

FENG, Y., et al. Enhanced sensitivity for deoxyribonucleic acid electrochemical impedance sensor: gold nanoparticle/polyaniline nanotube membranes. **Analytica chimica acta**, Quigdao, v.616, n.2, p.144-151, 2008.

FERNÁNDEZ, M., et al. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, Concepción, v.24, n.6, p.1109-1116, 2010.

FILHO, W., et al. Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Cascavel, v.31, n.65, p.37. 2011

FUJITA, Y., et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of plant research**, Ibaraki, v.124, n.4, p.509-525, 2011.

FRANZ, S., et al. Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, Berlin, v.4, n.1, p.83-96, 2011.

GEIGER, D., et al. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Stanford, v.107, n.17, p.8023-8028. 2010.

GIRJASHANKAR, V. Genetic transformation of *eucalyptus*. **Physiology Molecular Biology Plants**, Andhra Pradesh, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2011.

GOLLE, D. P., et al. Forestry improvement: emphasis on biotechnology application. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1606-1613, 2009.

GOLLEC, A. D.; SZAREJKO, I. Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. In. VAHDATI, K.; LESLIE, C. **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. Taiwan: inTech, 2013, 103p.

GRATTAPAGLIA, D.; RESENDE, M. D. V. Genomic selection in forest tree breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 241-255, 2010.

GUENIN, S., et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**. Amiens, v.60, n.2, p.487-493. 2009.

GUTIERREZ, L., et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-

PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**. Umea, v.6, n.6, p.609–618. 2008.

HARMON, A. C., et al. CDPKs—a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal?. **Trends in plant science**, Gainesville. v.5, n.4, p.154-159. 2000.

HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. **The Plant Journal**, Yokohama, v.61, n.6, p.1041-1052. 2010.

HONG, Y., ZHANG, W., WANG, X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. **Plant, cell & environment**, Wuhan, v.33, n.4, p.627-635. 2010.

HUGGETT, J., et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, London, v.6, n.4, p.279-284. 2005.

HUSSEY, S. G., et al. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus. **BMC Plant Biology**. Pretoria, v 11, n. 173, p.1-17, 2011.

IUCHI, S., et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, Ibaraki, v.27, n.4, p.325-333, 2001.

JARDAK-JAMOSSI, R., et al. The use of phosphinothricin resistance as selectable marker for genetic transformation of grapevine. **VITIS-Journal of Grapevine Research**, Hammam-lif, v.47, n.1, p.35-37, 2015.

JUNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Viçosa, v. 33, n. 76, p. 429-428, 2013.

KASUGA, M., et al. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, Ibaraki, v.45, n.3, p.346-350. 2004.

KHOKON, M. A. R., et al. Yeast elicitor-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. **Plant and cell physiology**, Okayama, v.51, n.11, p.1915-1921. 2010.

KNIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **International review of cytology**, Oxford, v.195, , n.1, p.269-324. 1999.

KURDISTANI, S. K., et al. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. **Cell**, Los Angeles, v.117, n.6, p.721-733. 2004.

KUROMORI, T., et al. Drought stress signaling network. In: HOWELL, S. H. (eds.). **Molecular Biology**. New York. Springer p. 383-409. 2014.

LAW, J. A., JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, Los Angeles, v.11, n.3, p.204-220. 2010.

LI, X., The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. **Biomaterials**, Enschede, v.29, n.23, p.3306-3316. 2008.

LIESE, A., ROMEIS, T. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Berlin, v.1833, n.7, p.1582-1589. 2013.

LIU, Q., et al. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v.45, n.11, p.970-975. 2000.

MA, P., et al. Genome-wide identification of the maize calcium-dependent protein kinase gene family. **Applied biochemistry and biotechnology**, Yangling, v.169, n.7, p.2111-2125. 2013.

MAFRA, V., et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PloS one**, São Paulo, v.7, n.2, p.312-323. 2012.

- MAHAJAN, S., TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, New Delhi, v.444, n.2, p.139-158. 2005.
- MALNOY, M., et al. Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. **Tree genetics & genomes**, Trento, v.6, n.3, p.423-433. 2010.
- MARTORELL, S., et al. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. **Plant, cell & environment**, Palma de Mallorca, v.37, n.3, p.617-626. 2014.
- MATEUS, R. P. G.; SILVA, C. M. Biotechnological advances in the soybean. **Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 23-27, 2013.
- MATSUKURA, S., et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Tokyo, v.283, n.2, p.185-196. 2010.
- MAATHUIS, F. J. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. **Journal of experimental botany**, York, v.65 n.3, p.849-858. 2014.
- MARUYAMA, K., et al. Identification of cis-acting promoter elements in cold-and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. **DNA research**, Ibaraki, v.19, n.1, p.37-49. 2012.
- MEHROTRA, R. et al. Abscisic acid and abiotic stress tolerance—Different tiers of regulation. **Journal of plant physiology**, Rajasthan v.171, n.7, p.486-496. 2014.
- MENDONÇA, E. G., et al. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrolistic method. **Revista Árvore**, Lavras, v.37, n.3, p.419-429, 2013.
- MILOSAVLJEVIĆ, A., et al. The effects of drought on the expression of TAO1, NCED and EIL1 genes. **Archives of Biological Sciences**. Belgrade v.64, n.1, p.297-306, 2012.



- MIR, R. R., et al. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. **Theoretical and Applied Genetics**, Hyderabad, v.125, n.4, p.625-645. 2012.
- MISHRA, S., et al. Identification, occurrence, and validation of DRE and ABRE Cis-regulatory motifs in the promoter regions of genes of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of integrative plant biology**, Lucknow, v.56, n.4, p.388-399. 2014.
- MIZOI, J., et al. GmDREB2A; 2, a canonical DREB2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates DRE-dependent gene expression. **Plant Physiology**, Tokyo, v.10, p. 112-132. 2012.
- MORI, I. C., et al. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and stomatal closure. **PLoS Biology**, La Jolla, v.4, n.10, p.327-341. 2006.
- MOURA, J. C. M. S., et al. Validation of reference genes from *Eucalyptus spp.* under different stress conditions. **BMC research notes**, Uberaba, v.5, n.1, p.634-644. 2012.
- MYBURG, A. A., et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, Pretoria, v.510, n.7505, p.356-362. 2014.
- NAKASHIMA, K., et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, Ibaraki, v.1819, n.2, p.97-103. 2012.
- NAVARRO, M., et al. Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. **Plant Biotechnology Journal**, Toulouse, v. 9, n.1, p.50-63, 2011.
- NISHIMURA, N., et al. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, La jolla. v.61, n.2, 290-299. 2013.
- OLIVEIRA, L. A., et al. Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. **Plant and Cell Physiology**, Porto Alegre, v.53, n.2, p.405-422. 2012.

- OSAKABE, Y., et al. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. **New phytologist**, Ibaraki, v.202, n.1, p.35-49. 2014.
- PARK, S. Y., et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, Riverside, v.324, n.5930, p.1068-1071. 2009.
- PFAFFL M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Munich. v.26, n.6, p.509–515, 2004.
- PINTO, D. S., et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Florestalis**, Paragominas, v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.
- POKE, F. S., et al. Genomic research in Eucalyptus. **Genetica**, Tasmania, v. 125, n. 1, p. 79-101, 2005.
- POKHOLOK, D. K., et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. **Cell**, Cambridge, v.122, n.4, p.517-527. 2005.
- QUANG, T. H., et al. Expression of genes of cellulose and lignin synthesis in *Eucalyptus urophylla* and its relation to some economic traits. **Trees**. Uppsala, v.26, n. 3, p. 893-901, 2012.
- QUOIRIN, M.; QUISEN, R. Advances in genetic transformation of Eucalyptus species. In: Franche C (eds) **Molecular Biology Tropical Plants**. Research Signpost, Kerala, pp 41–56, 2006.
- ROYCHOUDHURY, A., PAUL, S., BASU, S. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant cell reports**, West Bengal, v.32, n.7, p.985-1006. 2013.
- RUDD, J. J., FRANKLIN-TONG, V. E. Calcium signaling in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, Birmingham v.55, n.2, p.214-232. 1999.

- RYAN, D. P., OWEN-HUGHES, T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. **Current opinion in chemical biology**, Dundee, v.15, n.5, p.649-656. 2011.
- SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética : estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.861-871, 2008.
- SELVARAJ, N., et al. Evaluation of green fluorescent protein as a reporter gene and phosphinothricin as the selective agent for achieving a higher recovery of transformants in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Poinsett76) via *Agrobacterium tumefaciens*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Tamil Nadu, v.46, n.4, p.329-337. 2010.
- SHINYA, T.; et al., A. Transcript Level Analysis of Lignin and Flavonoid Biosynthesis Related Genes in *Eucalyptus globulus*. **American Journal of Plant Sciences**. Tokyo, v. 5, n.18, p. 2764-2772, 2014.
- SCHULZ, P., HERDE, M., ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. **Plant physiology**, Berlin, v.163, n.2, p.523-530. 2013.
- SOARES, N. S.; MARCIO, L. S.; SIDNEY, A. C.; Produto Interno Bruto do setor florestal brasileiro, 1994 a 2008. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n.4, p.725-732, 2014.
- SOCIEDADE DE INVESTIGAÇÕES FLORESTAIS. **Seca pode afetar a produtividade das florestas de eucalipto**. 2014, 1p. Disponível em <<http://www.sif.org.br/noticia/seca-pode-afetar-a-produtividade-das-florestas-de-eucalipto>> Acesso: 28/06/2015
- STAPE, J. L., et al. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. **Forest Ecology and Management**, Raleigh, v. 259, n.9, p.1684-1694, 2010.
- 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**, Acton, v.13, n.1, p.364-385. 2012.

TIAN, Q., et al. Functional characterization of the poplar R2R3-MYB transcription factor PtoMYB216 involved in the regulation of lignin biosynthesis during wood formation. **Plos One**, Chongqing, v. 8, n. 10, p. 1-10. 2013.

TORRE, F., et al.; Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascularspecific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, Vigo, v. 84, v.117, p.77–84, 2014.

TSUCHIHARA, A., et al. Effect of overexpression of radish plasma membrane aquaporins on water-use efficiency, photosynthesis and growth of *Eucalyptus* trees. **Tree Physiology**. Ibaraki, v. 30, n.3, p. 417-430, 2010.

UMEZAWA, T., et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. **Plant and cell physiology**, Ibaraki, v.51, n.11, p.1821-1839. 2010.

UN WATER:**Water and energy**. Disponível em:  
<http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/218614/2014-> Acesso em: 02/07/2015.

URAO, T., et al. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. **The Plant Cell**, Ibaraki, v.11, n.9, p.1743-1754.1999.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, Ghent, v.3, n.7, p.1-12, 2002.

VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, Uppsala, v.79, n. 21, p. 263–276, 2013.

VILLAR, E., et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC genomics**, Montpellier, v.12, n.1, p.538-546. 2011.

WAN, H., et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical biochemistry**, Jiangsu, v.399, n.2, p.257-261.2010.

WENDLER, C., BARNSIKE, M., WILD, A.; Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. **Photosynthesis Research**, Mainz, v. 24, n.1, p.55-61, 1990.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.6, n.11, p.1-23, 2010.

WONG, M. L., MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, Davis, v.39, n.1, p.1-11. 2005.

WOO, D. H. et al. Arabidopsis lenc1 mutant displays reduced ABA accumulation by low AtNCED3 expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, Busan, v.168, n.2, p.140–147, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. **Trends in plant science**, Tokyo, v.10, n.2, p.88-94. 2005.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, Tokyo, v.57, n.1, p.781-803. 2006.

YANG, S. L., et al. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. **Journal of plant physiology**, Beijing, v.166, n.15, p.1694-1699. 2009.

ZHANG, M., et al. Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of proteomics**, Beijing, v.109, n.23, p.290-308. 2014.

XU, J., et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. **Planta**, Shanghai, v.231, n.6, p.1251-1260. 2010.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, Tucson, v.53, n.1, p.247-272. 2002.

ZUO, R., et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*). **Molecular biology reports**, Qingdao, v.40, n.3, p.2645-2662. 2013.

ZOU, J. J., et al. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid-and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress. **Plant Physiology**, Beijing, v.154, n.3, p.1232-1243. 2010.

**SEGUNDA PARTE**

Artigos

**ARTIGO 1:** Seleção de genes de referência para análises de RT-qPCR em clones de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus camaldulensis* submetidos ao déficit hídrico



## SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES DE RT-qPCR EM CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus camaldulensis* SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO

### RESUMO

A RT-qPCR é uma técnica muito utilizada para a análise da expressão de genes relacionados com processos fisiológicos importantes. Apesar de sua sensibilidade, rapidez, reprodutibilidade e alta precisão nas análises dos perfis de expressão gênica, a técnica está sujeita a variações devido aos erros provenientes das etapas iniciais, como a fonte do material, a extração de RNA e eficiência da transcriptase reversa. Para isso, a normalização dos dados, através de genes de referência, se torna essencial para minimizar os efeitos destes fatores. Os genes de referência possuem expressão relativamente estável em diferentes órgãos, tecidos, condições ambientais e experimentais, para a normalização correta da expressão gênica. Neste trabalho foram avaliados as estabilidades e os perfis de expressão de sete candidatos a genes de referência (*UBQ*, *SAND*, *PP2A-3*, *PP2A-1*, *IDH*, *TUB*, *EF-1 $\alpha$* ) em tecidos foliares de dois clones (VM01 e VM05) do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* em condições de seca e irrigação. Os algoritmos geNorm, NormFinder e BestKeeper foram utilizados para avaliar e classificar os genes candidatos de acordo com sua estabilidade de expressão em cinco conjuntos amostrais: todas as amostras, somente no clone VM01, somente no VM05, em todas as mudas em condições de seca e em todas as mudas em condições de irrigação. Os resultados mostraram que os genes *SAND*, *PP2A-3* obtiveram maior estabilidade na maioria dos conjuntos amostrais de acordo com os algoritmos geNorm e NormFinder, com exceção às amostras do clone VM05 que verificaram uma diferença na classificação dos genes mais estáveis. A classificação dos genes mais estáveis adquirida a partir do programa BestKeeper demonstrou uma maior variação na classificação dos candidatos a genes de referência, no entanto, as amostras do clone VM01 apresentaram menor coeficiente de variação e desvio padrão do que os outros conjuntos amostrais. Analisando o resultado do BestKeeper os genes *EF-1 $\alpha$*  e *SAND* apresentaram menor variação.

Portanto, para a normalização da expressão gênica para híbridos *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* sugere-se os genes *SAND*, *PP2A-3* os quais demonstraram uma expressão mais estável na maioria dos conjuntos amostrais.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus*, com cerca de 700 espécies, é uma das principais fontes de produtos madeireiros, como a celulose, papel, serragem, biomassa e carvão vegetal (JUNIOR e COLDETTE, 2013). Muitas espécies de eucalipto e híbridos comerciais são conhecidas pelo rápido crescimento, grande valor nas propriedades da madeira, adaptabilidade para diversos solos e climas e a possibilidade de propagação clonal através de estaquia (STAPE; BINKLEY; RYAN, 2004). Especificamente, os híbridos de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* une os fenótipos de tolerância à seca, madeira com alto poder calorífico e boa capacidade de rebrotação do *E. camaldulensis* e a densidade média alta da madeira do *E. urophylla*, tornando este híbrido de bastante interesse para a produção de carvão vegetal e biocombustível (STAPE et al., 2010).

Com a emergente tecnologia de sequenciamento de nova geração, os genomas das espécies *E. grandis* e *E. globulus* estão agora disponíveis. O genoma do *E. grandis* no qual 94% do DNA foi sequenciado e 36.376 proteínas foram anotadas recentemente (MYBURG et al., 2014). Há mais tempo, o genoma de 600 Mb do *E. globulus* também foi sequenciado (STEANE, 2005). Estes avanços tornaram possível a caracterização de genes responsáveis pela regulação de processos complexos como crescimento e desenvolvimento da planta e também de genes relacionados com respostas a estresses bióticos ou abióticos (CHAN e SHI, 2015). Muitos genes relacionados às respostas envolvidas no estresse hídrico vêm sendo estudados, a fim de desenvolver variedades mais tolerantes (BHARGAVA e SAWANT, 2013; LOPES et al., 2011).

A RT-qPCR (*Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) é considerada uma das técnicas mais sensíveis, simples e específicas para verificar a expressão gênica. Quando utilizada, é crucial realizar uma normalização apropriada dos dados obtidos para uma quantificação exata e confiável dos níveis

de expressão (BUSTIN et al., 2009). A normalização, através de genes de referência, é necessária para minimizar os efeitos da variabilidade biológica e de fatores experimentais, como a variação da concentração de RNA ou a eficiência da transcriptase reversa, os quais podem afetar a acurácia na determinação da variabilidade de transcritos entre amostras biológicas (CASTONGUAY; MICHAUD; DUBÉ, 2015).

Os genes de referência são aqueles em que seu nível de expressão tem um padrão mais estável entre diferentes órgãos, tecidos e em diferentes condições ambientais e experimentais, permitindo uma comparação acurada entre a expressão de genes de interesse nas diferentes amostras, uma vez que irá normalizar as variações resultantes da quantidade e qualidade das amostras de RNA a ser analisado, bem como erros experimentais durante a preparação de amostras (HUGGETT et al., 2005). A análise da estabilidade de expressão de genes considerados como referência é essencial quando as amostras são originadas de indivíduos, tecidos/órgãos, estágios de desenvolvimento e condições ambientais diferentes (DA SILVA et al., 2015).

Inicialmente, os genes que eram responsáveis por processos celulares básicos, tais como 18S rRNA (*18S*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), Fator de alongação-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), Poliubiquitina (*UBQ*), Actina (*ACT*) e Tubulina (*TUB*) eram considerados como genes de expressão estáveis em qualquer condição (*Housekeeping genes*) (CHANG et al., 2012; GUENIN et al., 2009). No entanto, o crescente uso da técnica RT-qPCR revelou que esses genes variavam sua expressão em diferentes tecidos e condições, tornando-se necessário o estudo de genes mais estáveis para a condição experimental em estudo (ARTICO et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2008).

Para facilitar a escolha e o uso de múltiplos genes de referência, uma série de algoritmos foram desenvolvidos para possibilitar a comparação da estabilidade desses genes no contexto experimental. Os quatro algoritmos mais usados, o *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), o *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004) e *Delta-Ct* (SILVER et al., 2006) são comumente utilizados para a avaliação de genes de referência, a partir de diferentes abordagens.

Poucos estudos de seleção e validação de genes de referência foram desenvolvidos em espécies arbóreas (DEKKERS et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2008; HRUZ et al., 2011). Apesar de alguns genes de referência terem sido descritos para *Eucalyptus spp.* em diferentes condições (CASSAN-WANG et al., 2012; FERNANDEZ et al., 2010; MOURA et al., 2012), estes não foram avaliados para o híbrido *E. camaldulensis* X *E. urophylla* em condição de estresse hídrico. Neste estudo, sete genes (*SAND*, *IDH*, *PP2A-1*, *PP2A-3*, *TUB*, *EF-1 $\alpha$*  e *UBQ*) foram selecionados de acordo com estudos anteriores realizados com as espécies *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus urograndis* X *Eucalyptus globulus* (BOAVA et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2010; MOURA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). A estabilidade gênica foi avaliada em tecidos foliares de dois clones do mesmo híbrido sob diferentes períodos de seca e irrigação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Para este experimento, 42 mudas dos clones VM01 (tolerante) e VM05 (sensível) do híbrido *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus camaldulensis* com 3 meses de idade, disponibilizados pela empresa Vallourec Florestal Ltda., foram plantadas em vasos contendo 1500 mL do substrato CSC<sup>®</sup> (Turfa de Sphagno, Vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK [traços]). Após o plantio, as mudas permaneceram em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas, durante 10 dias. As plantas foram irrigadas constantemente durante esse período, de acordo com a capacidade de campo do substrato (400 mL).

### **Amostragem e Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e cada amostragem foi composta por três repetições biológicas. Cada repetição

biológica foi constituída por 4 folhas, de ambos os clones em constante irrigação e em estresse hídrico, foram realizadas coletadas em 4 períodos diferentes (0, 5, 10 e 15 dias). As folhas coletadas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada e armazenadas em ultra freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

### **Extração de RNA**

A extração de RNA foi realizada utilizando o protocolo descrito por Chang et al. (1993) com modificações. Primeiramente, 200 mg de tecido foi macerado em N<sub>2</sub> líquido seguida da adição de 950 µL do tampão CTAB (2% p/v de CTAB, 2% p/v de PVP-40, 2,0 M de NaCl, 100 mM de tris-HCl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0 e 0,5 g L<sup>-1</sup> de spermidina), pré-aquecido a 65°C, juntamente com 60 µL de β-mercaptoetanol. A amostra foi homogeneizada por 2 minutos e acrescida de 900 µL de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1 v/v). Após centrifugação de 10 minutos a 9.000 g (4°C) uma sucessiva lavagem com Clorofórmio:Álcool Isoamílico foi realizada. Para a primeira precipitação, 150µL cloreto de lítio (10 M) foi adicionado ao sobrenadante coletado, permanecendo por um período mínimo de 5 horas à 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 9.000 g (4°C) e o precipitado adquirido foi ressuscitado em solução de SSTE (1,0 M de NaCl; 0,5% SDS; 10 mM de TrisHCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) pré-aquecida a 37°C. Na mesma solução, isopropanol foi adicionado e as amostras permaneceram a -20°C durante 1 hora, seguido de uma centrifugação a 10.000 g durante 20 minutos (4°C). O *pellet* foi lavado com etanol 75 % e ressuscitado em água tratada com DEPC (Dietilpirocarboneto).

### **Tratamento do RNA e síntese de cDNA**

Após a extração, as amostras foram tratadas com o *Kit Turbo DNA-free* (Ambion) para a remoção total de DNA genômico. A quantidade e pureza do RNA foram mensuradas em *Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*, observando um grau de pureza entre 1,8 e 2,3. A síntese do cDNA, a partir do RNA tratado, foi

realizada através da utilização do *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* usando 1000 ng de RNA.

### **Genes de referência e síntese de primers**

Os genes de referência selecionados para a avaliação de sua expressão nos diferentes clones (VM01 e VM05) submetidos a condições de estresse hídrico e irrigação foram: proteína SAND (*SAND*), Fator de alongação-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), Proteína fosfatase subunidade 2A (*PP2A-1* e *PP2A-3*), Poliubiquitina (*UBQ*), NADP Isocitrato desidrogenase (*IDH*) e Tubulina (*TUB*).

Primeiramente, as sequências dos genes selecionados foram encontradas no proteoma do *Eucalyptus grandis* através da base de dados Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). O alinhamento das sequências foram realizadas através da ferramenta BLASTx, com a sequência de entrada sendo os genes ortólogos presentes na espécie modelo, *Arabidopsis thaliana*. O resultado dos alinhamentos foram sequências peptídicas expressas pelos genes ortólogos em *Eucalyptus grandis*. As sequências das proteínas foram utilizadas para obter as sequências de nucleotídeos do gene específico.

Após a obtenção das sequências dos genes selecionados, os pares de primers foram desenhados utilizando o programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen), de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho do primer (18 a 23), conteúdo GC (40 a 60%), Tm dos primers (58 a 64°C) e o tamanho do amplicon (80 a 130 pb). A qualidade das sequências foram verificadas *in silico* através do programa OligoAnalyser™ IDT.

### **RT-qPCR e eficiência dos primers**

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *ABI Fast7500 System (Applied Biosystems)* em um volume total de 10  $\mu$ L contendo 1  $\mu$ L de cDNA diluição 1:5, 5  $\mu$ L de 1X *SYBR® Green (Applied Biosystems)* e 0,2  $\mu$ M de primers. As amplificações ocorreram durante 10 minutos a 95°C, 5 segundos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos 60°C. Após os 40 ciclos, curvas de

dissociação (*Melting curve*) foram verificadas para confirmar a especificidade dos *primers*, por aquecimento de 60°C para 95°C. Todas as reações foram realizadas contendo triplicata biológica e técnica, incluindo amostra interensaio para assegurar a reprodutibilidade técnica entre as placas.

A eficiência de cada par de *primers* foi determinada através do método de curva padrão utilizando um *pool* de DNA genômico de ambos genótipos em uma diluição serial de cinco vezes. Após as reações, a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foram verificadas (Tabela1).

### **Análise dos dados**

Os níveis de expressão dos candidatos a genes de referência foram determinados a partir dos valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos automaticamente pelo valor limiar de fluorescência do programa 7500 versão 2.0.5 (*Applied Biosystems*). A avaliação da estabilidade e triagem dos candidatos a genes de referência foi realizada nos quatro algoritmos *geNorm* (VANDESOMELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004) e *Delta-Ct* (SILVER et al., 2006) integrados na ferramenta *RefFinder* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). *RefFinder* compara e classifica os candidatos a genes de referência testados baseado nos *rankings* obtidos de cada um dos programas, atribui um peso adequado a um gene individual e calcula a média geométrica dos seus pesos para o *ranking* geral final (ZHANG, 2014). Os dados de entrada na ferramenta *RefFinder* foram os valores Cq corrigidos pela eficiência de cada par de *primers* através do programa *GenEx Enterprise* (<http://genex.gene-quantification.info/>).

Os diagramas de caixa foram analisados através do programa *SigmaPlot* versão 11.0 para ilustrar os níveis e variações de expressão dos genes avaliados. A análise foi realizada em cinco conjuntos amostrais: (1) todas as amostras do clone VM01; (2) todas as amostras do clone VM05; (3) amostras em condição de seca dos clones VM01 e VM05; (4) amostras em condição de irrigação dos clones VM01 e VM05; (5) todas as amostras.

## Validação dos genes de referência

Para a validação dos genes de referência, a expressão do gene *EgrCPK26*, foi normalizada através dos genes mais estáveis e dos genes mais instáveis selecionados. Através da plataforma Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>), onde o genoma e o proteoma do *Eucalyptus grandis* foi recentemente depositado, as sequências deste gene foi encontrada. O alinhamento da sequência foi realizada através da ferramenta BLASTx, com a sequência de entrada sendo os genes ortólogos presentes na espécie modelo, *Arabidopsis thaliana*. O *EgrCPK26* está relacionado com a abertura e fechamento estomático através da ativação dos canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando consequentemente a perda de água e a assimilação de carbono (BOUDSOCQ e SHEEN, 2012) e é homólogo ao *AtCPK6* (NM\_127284.2). A fórmula de Pfaffl (2001) foi utilizada para a avaliação da expressão relativa do gene *EgrCPK26* em todas as amostras. As informações sobre os primers do gene estão presentes na tabela 1.

## RESULTADOS

### Eficiência dos primers

A fim de comparar as expressões e verificar a estabilidade dos genes selecionados entre os diferentes conjuntos amostrais, o método da curva padrão foi utilizado para calcular a eficiência dos primers. A partir da inclinação da curva padrão para cada par de primers, foram obtidos valores do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e eficiência (E). Os valores de eficiência dos primers variaram de 92% (*IDH*) a 100% (*SAND*) (Tabela 1). De acordo com as curvas de dissociação, os primers demonstraram especificidade de reação confirmada pela presença de um pico único na curva.



### Perfis de expressão dos genes de referência

Valores do Cq, derivados das curvas de amplificação, foram usados para medir os níveis de expressão dos genes de referência. Para todos os conjuntos amostrais avaliados, o Cq médio variou de 20 a 27 (Figura 1).

Entre todas as amostras, o nível de expressão do gene *PP2A-3* foi o maior entre os candidatos, com um Cq médio de 22,13. Contrariamente, o gene *EF-1 $\alpha$*  obteve um Cq médio de 26,81, representando a menor expressão. O gene que apresentou uma maior variação nos valores Cq foi o *UBQ* (mín-19,14/máx-33,01), enquanto que o gene *SAND* demonstrou uma menor variação (mín-21,64/máx-29,42).

Nas amostras somente do clone tolerante (VM01), o Cq médio variou de 20,90 a 26,62. O gene que foi mais expresso neste clone também foi o *PP2A-3*, com um valor de Cq médio equivalente a 21,52, enquanto que o *EF-1 $\alpha$*  apresentou um Cq médio de 26,62. O *PP2A-1* foi o gene que menos variou entre os candidatos (mín-22,57/máx-27,4) e o *UBQ* que obteve maior variação (mín-20,9/máx-33,01). Na análise referente apenas ao clone sensível (VM05), os genes *IDH* e *EF-1 $\alpha$*  demonstraram uma maior e menor expressão com valores de Cq médio equivalentes a 21 e 27, respectivamente. Diferente do clone tolerante, o gene com menor variação foi o *IDH* (mín-18,67/máx-23,93) e o com maior variação foi o *PP2A-1* (mín-22,6/máx-33,27).

Os padrões de expressão dos candidatos a genes de referência foram similares nas amostras submetidas à irrigação e nas amostras em condição de estresse hídrico. Em ambos os conjuntos amostrais o *PP2A-3* e o *EF-1 $\alpha$*  foram os genes com maior e menor expressão, respectivamente. Enquanto que o gene com maior variabilidade foi o *UBQ* (mín-19,30/máx-33,01) e o menos estável foi o *SAND* (mín-21,64/máx-29,72) em ambos os conjuntos amostrais citados.

### Análise geNorm

Para determinar a classificação dos genes de referência, um dos algoritmos utilizados foi o *geNorm* (VANDESOMELE et al., 2002), o qual calcula

o valor da variação média da estabilidade (M) de cada gene comparado aos todos os outros testados. Baseado no algoritmo do *geNorm*, os genes com menor valor de M são considerados mais estáveis e os genes com maior valor são os mais instáveis. Este algoritmo não separa o valor de M dos dois primeiros genes, portanto sendo considerados os genes de referência mais estáveis para a normalização (Figura 2, 3 e 4).

Com exceção do conjunto amostral do clone sensível (VM05) (Figura 3), no qual os genes mais estáveis foram *SAND* e *UBQ*, todos os outros conjuntos amostrais analisados, apresentaram como os genes mais estáveis o *SAND* e *PP2A-3*, com valores de M entre 0,95 e 0,69. Ao contrário dos genes com maior estabilidade, os mais instáveis variaram entre os conjuntos amostrais. Entre todas as amostras, nas plantas submetidas a condição de estresse hídrico e nas irrigadas, os genes mais instáveis foram o *PP2A-1* e *IDH*, com valores de M entre 2,23 e 1,65, respectivamente. Os genes mais instáveis das amostras do clone tolerante (VM01) e do clone sensível (VM05) foram o *UBQ/TUB* e *PP2A-1/EF-1 $\alpha$* , respectivamente (Figura 2, 3 e 4).

### **Análise NormFinder**

*NormFinder* é baseado em um modelo matemático que estima a variação da expressão dos candidatos a gene de referência entre as amostras a serem estudadas. Este modelo leva em consideração as variações intra e interamostras para o cálculo de um valor de estabilidade da expressão. O gene de referência mais estável apresenta valores de estabilidade baixos, enquanto que os genes mais instáveis exibem valores maiores (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

Semelhante ao algoritmo *geNorm*, os dois melhores genes de referência encontrados na análise do *NormFinder* foram o *SAND* e *PP2A-3*, demonstrando valores da estabilidade de expressão mais baixos do que os outros candidatos, entre 0,3 e 0,8, respectivamente (Tabela 2). O terceiro gene mais estável varia entre *EF-1 $\alpha$* , *IDH* e *TUB* nos diferentes conjuntos amostrais. Para todas as amostras, clone sensível (VM05), estresse hídrico e irrigação, os dois genes mais instáveis foram o *PP2A-1* e *IDH* apresentando um valor de estabilidade entre 2 e 1,05,

respectivamente. Em exceção aos outros conjuntos amostrais, os dois candidatos a genes de referência mais instáveis no clone tolerante (VM01) foram TUB e UBQ, com valores de 1,62 e 1,75, respectivamente.

### **Análise BestKeeper**

O algoritmo *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004), baseado no Microsoft Excel, sintetiza uma série de valores permitindo uma visão global da variação das amostras analisadas. Este algoritmo fornece dados do coeficiente de variação (CV) e do desvio padrão com base no Cq médio de cada candidato a gene de referência. Observando todos os conjuntos amostrais, nota-se um coeficiente de variação e desvio padrão entre  $3,68\% \pm 0,92$  e  $11,01\% \pm 2,81$ , respectivamente. Entre todas as amostras, os genes que menos variaram foram o *SAND* ( $CV = 6,7 \pm 1,6$ ) e *EF-1 $\alpha$*  ( $CV = 6,23 \pm 1,67$ ), enquanto os que obtiveram maiores valores de CV e desvio padrão foram *PP2A-1* ( $8,05 \pm 2,05$ ) e *PP2A-3* ( $9,58 \pm 2,12$ ) (Tabela 3).

De acordo com os dados obtidos, observa-se uma discrepância entre os genes com maior e menor variação entre os diferentes conjuntos amostrais. De forma geral, os genes *IDH*, *PP2A-1*, *SAND*, *TUB* e *EF-1 $\alpha$*  foram os genes mais estáveis nos diferentes conjuntos amostrais com ordem de classificações variáveis, enquanto que *PP2A-3*, *UBQ*, *PP2A-1* e *IDH* demonstraram maior variação de estabilidade. Além disso, todos os candidatos a gene de referência nas amostras do clone tolerante (VM01) apresentaram menor variação quando comparados aos outros conjuntos amostrais.

### **Análise Delta Ct**

O método *Delta-Ct* analisa o índice de variabilidade entre os valores Cq das amostras testadas, o menor valor é considerado mais estável (SILVER et al., 2006). Ao analisar todas as amostras os genes mais estáveis foram *SAND*, *PP2A-3* e *EF1 $\alpha$*  apresentando valores de 1.55, 1.65 e 1.73, respectivamente. Em contrapartida os genes mais instáveis foram *UBQ*, *PP2A-1* e *IDH* apresentando índices de variabilidade de 1.98, 2.19 e 2.65, respectivamente (Tabela 4). Nos

clones testados, VM01 e VM05, somente o terceiro gene mais estável não coincidiu, de acordo com os valores do índice de variabilidade. No VM01 o terceiro gene mais estável foi o *IDH*, enquanto que nas amostras do clone VM05 foi o gene *TUB*. Nos conjuntos amostrais dos dois clones os genes mais instáveis variaram, de modo que no clone VM01 foram *PP2A-1*, *TUB* e *UBQ*, enquanto que no VM05 foram os *EF1 $\alpha$* , *IDH* e *PP2A-1*. Em ambos conjuntos amostras Irrigação e Estresse Hídrico, apresentaram os mesmos *ranks* dos três genes mais estáveis, *SAND*, *PP2A-3* e *EF1 $\alpha$* , assim como dos genes mais instáveis, *UBQ*, *PP2A-1* e *IDH*.

### **Classificação geral e análise da expressão do gene *EgrCPK26***

Além de fornecer os valores de estabilidade gerados pelos quatro algoritmos apresentados, a ferramenta *RefFinder* disponibiliza a classificação geral dos candidatos a gene de referência com base em sua média geométrica. Os genes *SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$*  foram os três genes mais estáveis na maioria dos conjuntos amostras (todas as amostras, estresse hídrico e irrigação) (Tabela 5). Os genes mais instáveis também coincidiram nos conjuntos citados, sendo *UBQ*, *PP2A-1* e *IDH*. Nas amostras dos clones VM01 e VM05 somente um gene variou entre os três mais estáveis e os três mais instáveis.

Através da classificação geral os três genes mais estáveis (*SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* ) e os mais instáveis (*UBQ*, *PP2A-1* e *IDH*) foram selecionados para a normalização da expressão do gene *EgrCPK26* nas diferentes amostras, para a validação. A análise com os três genes mais estáveis demonstra que a expressão do gene *EgrCPK26* é mais acentuada no clone VM01 nos primeiros tempos de déficit hídrico, enquanto que no clone VM05 somente no tempo de 10 dias houve maior atividade deste gene (Figura 5). Com exceção do clone VM05 aos 15 dias, todos os outros tratamentos irrigados apresentaram menor expressão. Ao normalizar os dados de expressão com os genes mais instáveis, observou-se uma superestimação dos dados de expressão relativa de todas as amostras, apesar de este fato ter sido nitidamente mais visível nos tratamentos do clone VM01 (Figura 6).

## DISCUSSÃO

A técnica de RT-qPCR é considerada uma ferramenta importante para compreender a expressão de genes de vários sistemas biológicos. Para uma análise eficaz, genes de referência são necessários para a normalização dos dados de expressão, a fim de minimizar os erros provenientes das etapas anteriores a RT-qPCR (YANG et al., 2014; ZHU et al., 2013). Um gene de referência apropriado deve apresentar poucas mudanças no seu perfil de expressão entre as condições experimentais testadas. Por não existir um gene de referência universal, o qual corresponde a expressão estável em diferentes espécies, tecidos e condições experimentais, torna-se necessária a identificação de genes de referência adequados para a normalização dos transcritos nas condições de estudo (CZECHOWSKI et al., 2005; IMAI et al., 2014).

Muitos estudos utilizam a técnica RT-qPCR para a avaliação do perfil de expressão de genes de interesse em plantas sob estresses abióticos, como o estresse hídrico (KIDOKORO et al., 2015; OKAMOTO et al., 2013; WANG et al., 2011). Entretanto, há a necessidade da seleção de genes de referência apropriados para o genótipo, tecido e severidade do estresse avaliado (IMAI et al., 2014). Em espécies de *Eucalyptus*, nota-se pouco progresso em relação à avaliação de genes de referência para os contextos experimentais (BOAVA et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2010; MOURA et al., 2012).

A estabilidade de sete candidatos a gene de referência foi analisada em dois genótipos de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla*, sendo um clone considerado tolerante a estresse hídrico (VM01) e o outro clone sensível (VM05) a esta condição. Ambos os clones foram submetidos, paralelamente, a quinze dias de estresse hídrico e quinze dias de irrigação constante. Nas análises com os algoritmos *geNorm*, *NormFinder* e *Delta-Ct* não houve diferença na classificação dos dois genes mais estáveis (*SAND/PP2A-3*), exceto nas amostras analisadas pelo *geNorm* relacionadas ao clone sensível em que os genes mais estáveis foram *SAND/UBQ*. No entanto, o terceiro gene mais estável demonstrou uma variação entre os conjuntos amostrais e entre estes três algoritmos. A avaliação do terceiro gene mais estável se torna essencial devido à necessidade de normalização dos

dados de expressão gênica utilizando no mínimo três genes de referência, de acordo com estudos prévios de validação (CHAN et al., 2014; DA SILVA et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2010). Alguns estudos não demonstraram consistência na estabilidade dos candidatos a genes de referência em tecidos, genótipos e condições ambientais diferentes (MAFRA et al., 2012; SINHA et al., 2015). Entretanto, assim como nos dados apresentados, outros estudos verificaram uma semelhança entre os genes de referência mais estáveis de acordo com os resultados obtidos do *NormFinder* e *geNorm* (DA SILVA et al., 2015; MOURA et al., 2012).

Informações a respeito da variabilidade (CV e desvio padrão) desses diferentes genes em condições experimentais adversas, são informadas por meio do programa *BestKeeper*, obtendo uma estatística descritiva dos dados de expressão (MAKSUP et al., 2013; REDDY et al., 2013). Com base nos dados obtidos é possível observar uma maior discrepância na classificação, dos genes com maior variabilidade, obtida pelo programa *BestKeeper*, quando comparado com a consistência dos resultados do *geNorm*, *NormFinder* e *Delta-Ct*. Isso se deve ao fato do modelo matemático utilizado pelo *BestKeeper* divergir muito dos outros dois, obtendo resultados diferentes (PFAFFL et al., 2004; ZHU et al., 2013).

Ao observar a estabilidade dos candidatos a genes de referência nos dois clones testados, é possível constatar uma diferença, principalmente, nos algoritmos usados pelos programas *geNorm* e *BestKeeper*. Os dois genes mais estáveis no clone tolerante (VM01), de acordo com o programa *geNorm*, foram *SAND/PP2A-3* seguido do *EF-1 $\alpha$*  enquanto que no clone sensível (VM05) os dois genes mais estáveis foram *SAND/UBQ* seguido do *PP2A-3*. De acordo com os valores fornecidos pelo programa *BestKeeper*, o CV e desvio padrão de todos os genes avaliados nas amostras do clone tolerante (VM01) foram mais baixos do que os demais conjuntos amostrais, inclusive do clone sensível (VM01) ao estresse hídrico. Nos estudos que envolveram diferentes genótipos e tecidos de *Eucalyptus spp.* submetidos ao estresse hídrico, verificou-se uma mudança na estabilidade de certos genes, modificando, principalmente, a classificação dos candidatos mais estáveis entre espécies diferentes (BOAVA et al., 2010; MOURA et al., 2012). Como verificado neste trabalho, variações da expressão e estabilidade dos

candidatos a genes de referência são presentes até mesmo dentro da mesma espécie.

Em ordem de ilustrar a adequabilidade da seleção dos três genes de referência mais estáveis neste estudo, as expressões relativas dos transcritos do gene *EgrCPK26* nos dois genótipos sob condições de déficit hídrico e irrigação usando diferentes genes de referência para a normalização foram comparadas. Os resultados da pesquisa demonstram uma superestimação dos dados de expressão gênica e reforçam que a utilização de genes de referência instáveis podem levar a dados imprecisos e inconfiáveis (YANG et al., 2014). A família CDPK (*Calcium Dependent Protein Kinase*) é uma importante família relacionada com várias rotas de defesa a condições de estresse incluindo o déficit hídrico (SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013). O gene *CPK6* em *Arabidopsis thaliana*, órtologo ao gene estudado *EgrCPK26*, é conhecido por participar de modificações dos canais iônicos, principalmente nas células guarda, atuando na abertura e fechamento estomático, assim como em outras funções fisiológicas na tolerância a seca (XU et al., 2010). De acordo com os dados de expressão podemos observar uma maior expressão relativa deste gene no clone VM01, criando a hipótese de uma maior atividade das células guarda, no sentido de fechamento estomático, em condições de déficit hídrico e conseqüentemente menor perda de água pelas plantas. Este resultado não foi observado tanto pelas plantas do clone VM05 sob déficit hídrico quanto pelas plantas irrigadas.

## CONCLUSÃO

A variação na estabilidade dos genes analisados foi presente em todos os conjuntos amostrais, entretanto os genes *SAND*, *PP2A-3* seguido pelo *EF-1 $\alpha$*  apresentaram maior estabilidade de expressão em unanimidade nas análises, demonstrando serem os genes mais adequados para normalização dos dados de RT-qPCR em híbridos de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus camaldulensis* tanto em condições irrigadas como em seca.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN C.L.; JENSEN J.L.; ORNTOFT T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Denmark, v.64, p.5245–5250, 2004.
- ARTICO, S., et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**. Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.1-12. 2010.
- BHARGAVA, S., SAWANT, K.. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, Maharashtra, v.132, n.1, p. 21-32. 2013.
- BOAVA, L. P., et al. Selection of endogenous genes for gene expression studies in Eucalyptus under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. **BMC research notes**, Botucatu, v.3, n.1, p.43-52. 2010.
- BOUDSOCQ, M., SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. **Trends in plant science**, Boston, v.18, n.1, p.30-40. 2013.
- BUSTIN, S.A., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, London, v.55, n.4, p.611-622. 2009.
- CASTONGUAY, Y., MICHAUD, J., DUBÉ, M. P. Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Environmentally and Developmentally Regulated Gene Expression in Alfalfa. **American Journal of Plant Sciences**, Québec, v.6, n.1, p.132-145. 2015.
- CASSAN-WANG, H., et al. Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription–PCR analysis of gene expression in organs and tissues of Eucalyptus grown in various environmental conditions. **Plant and Cell Physiology**, Toulouse, v.53, n.12, p.2101-2116. 2012.
- CHANG, E., et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) Using Real-Time PCR. **Plos one**, Beijing, v.7, n.3, p.1-10, 2012.



CHANG, S., et al. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular biology reporter**, Texas, v.11, n.2, p.113-116. 1993.

CHAN, Z., SHI, H. Improved abiotic stress tolerance of Bermuda grass by exogenous small molecules. **Plant signaling & behavior**, Wuhan, v,10, n.3, p.1-4, 2015.

CHAN, P. L. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue culture. **Plos one**. Selangor, v. 9, n.6, p.1-13. 2014.

CZECHOWSKI, T., et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**. Potsdam, v.139,n.1, p.5–17. 2005.

DA SILVA, H. A. P., et al. Evaluation of Reference Genes for RT-qPCR Normalization in Cowpea under Drought Stress during Biological Nitrogen Fixation. **Crop Science**. Rio de Janeiro, v.55, n.1, p.1–13, 2015..

DEKKERS, B. J., et al. Identification of reference genes for RT–qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds. **Plant and Cell Physiology**, Wageningen v.53, n.1, p.28-37. 2012.

FERNÁNDEZ, M., et al. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, Concepción, v.24, n.6, p.1109-1116, 2010.

GUENIN, S., et al. Normalization of qRT–PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**. Amiens, v.60, n.2, p.487–493. 2009.

GUTIERREZ, L., et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**. Umea, v.6, n.6, p.609–618. 2008.

- HRUZ, T., et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. **BMC genomics**, Zurich, v.12, n.1, p.156-170. 2011.
- HUGGETT, J., et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, London, v.6, n.4, p.279-284. 2005.
- IMAI T, et al. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. **Plos one**. Ibaraki, v.9. n.1, p.1-11. 2014.
- JUNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Viçosa, v. 33, n. 76, p. 429-428, 2013.
- KIDOKORO, S., et al. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. **The Plant Journal**, Tokyo, v.81, n.3, p.505-518. 2015.
- LOPES, M. S., et al. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, Texcoco, v.62, n.9, p.3135-3153. 2011.
- MAFRA, V., et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos one**, São Paulo, v.7, n.2, p.312-323. 2012.
- MAKSUP S, et al. High-quality reference genes for quantifying the transcriptional responses of *Oryza sativa* L. (*ssp. indica* and *japonica*) to abiotic stress conditions. **Chinese Science Bulletin**, Bangkok, v.58, n.16, p.1919– 1930. 2013.
- MOURA, J. C. M. S., et al. Validation of reference genes from *Eucalyptus spp.* under different stress conditions. **BMC research notes**, Uberaba, v.5, n.1, p.634-644. 2012.
- MYBURG, A. A., et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, Pretoria, v.510, n.7505, p.356-362. 2014.

OKAMOTO, M., et al. Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Riverside, v.110, n.29, p.12132-12137. 2013.

OLIVEIRA, L. A., et al. Reference genes for the normalization of gene expression in Eucalyptus species. **Plant and Cell Physiology**, Porto Alegre, v.53, n.2, p.405-422. 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 1; 29(9): e45, 2001.

PFAFFL M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Munich. v.26, n.6, p.509–515, 2004.

REDDY D. S., et al. Evaluation and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR based gene expression studies in peanut. **Plos One**, Andhra Pradesh, v;8, n.10, p.1-14, 2013.

SCHULZ, P., HERDE, M., ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. **Plant physiology**, Berlin, v.163, n.2, p.523-530. 2013.

SILVER N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol Biol** v.7, n.33, p.1-9, 2006.

SINHA, P., et al. Evaluation and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Under Drought Stress Conditions. **PlosOne**, Hyderabad , v.10, n.4, p.1-15, 2015.

STAPE J.L., BINKLEY, D., RYAN, M.G. Eucalyptus production and the supply, use and efficiency of use of water, light and nitrogen across a geographic gradient in Brazil. **Forest Ecology and Management**, Piracicaba, v.193, n.2, p.17 –31. 2004.

STAPE, J. L., et al. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. **Forest Ecology and Management**, Raleigh, v. 259, n.9, p.1684-1694, 2010.

STEANE, D. A. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). **DNA Research**, Tasmania, v.12, n.3, p.215-220. 2005.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, Ghent, v.3, n.7, p.1-12, 2002.

WANG, T., et al. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. **BMC genomics**, Beijing, v.12, n.1, p.367-378. 2011.

XU, J., et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. **Planta**, Shanghai, v.231, n.6, p.1251-1260. 2010.

YANG Q., et al. Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. **Molecular Biology Report**, Hohhot, v.41, n.4, p.2325–2334. 2014.

ZHU J., et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. **Plos One**, Beijing, v.8, n.1, p. 1-10. 2013.

## Tabelas

Tabela 1. Informações gerais dos sete candidatos a genes de referência.

Gene	Definição	Acesso	Sequência ortóloga A. thaliana	Score/E-value	Sequência do primer (5' – 3') Forward/Reverse	Tm (°C)	Amplicon (pb)	E (%)	R <sup>2</sup>
<i>UBQ</i>	PoliUbiquitina	Eucgr.F04448.1	AT1G31340	787/3,6e-82	F: TGTCTCCATCTTGTGCTTG R: GTCGATTCACACTGCAAACG	59,83 60,31	105	98,5	0,978
<i>SAND</i>	Proteína SAND	Eucgr.B02502.1	AT2G28390	2213/0,0	F: CGTGTATGTCAATGGGTGAAAG R: TAGCAGGCAATACATCACCAAG	60,28 60,15	86	100	0,999
<i>IDH</i>	NADP Isocitrato Desidrogenase	Eucgr.F02901.1	AT1G54340	2258/0,0	F: TCCGTCTCGCTCTCTCTCTC R: CTTCTCGAAACCCATTGCTC	59,97 59,81	95	92	0,994
<i>TUB</i>	Tubulina	Eucgr.B03604.2	AT5G19780	2439/0,0	F: TTCCATTTCCATTTCCGAAG R: CTGCCCAATGTGTATGCTT	59,87 60,91	139	93	0,990
<i>PP2A-3</i>	Fosfatase Subunidade 2A-3	Eucgr.B03031.1	AT1G13320	3301/0,0	F: TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT R: GTCCTTTCTTCCGAGAGCAC	60,10 61,78	124	99	0,997
<i>PP2A-1</i>	Fosfatase Subunidade 2A-1	Eucgr.B03386.1	AT1G69960	1880/0,0	F: TGGAGAGAACATGGACCAGA R: CTGTGAACCGCATTACAAA	59,18 59,59	135	97	0,996
<i>EF-1a</i>	Fator de elongação 1a	Eucgr.B02473.1	AT5G60390	2587/0,0	F: TGCTTTGCTCGCTTTCCTC R: TTCATCGTACCTTGCTTGG	61,77 61,02	100	98	0,994
<i>EgrCPK26</i>	Calcium-Dependent Protein Kinase 26	Eucgr.I01536.1	NM_127284.2	912,5/0,0	F: CAAGATTCATCCAACCCTTCA R: ATGTGTTGCCATAAAAGACG	59,92 59,88	123	100	0,995

(E) – Eficiência de amplificação dos pares de primers, em % - Valor ideal: entre 90-100%; (R)- Coeficiente de regressão da curva padrão obtida

Tabela 2. Classificação com base nos valores de estabilidade, a partir do algoritmo do *NormFinder*, dos candidatos a genes de referência nos cinco conjuntos amostrais.

Rank	Todas Amostras		VM01 (Tolerante)		VM05 (Sensível)		Estresse Hídrico		Irrigação	
	Gene	Valor de estabilidade	Gene	Valor de estabilidade	Gene	Valor de estabilidade	Gene	Valor de estabilidade	Gene	Valor de estabilidade
1	SAND	0,5433	SAND	0,4196	PP2A-3	0,5371	PP2A-3	0,5433	SAND	0,3057
2	PP2A-3	0,8528	PP2A-3	0,8365	SAND	0,5773	SAND	0,8528	PP2A-3	0,782
3	EF-1 $\alpha$	0,976	IDH	0,844	TUB	0,7223	TUB	0,976	EF-1 $\alpha$	0,9634
4	TUB	1,196	EF-1 $\alpha$	1,1454	UBQ	0,8005	UBQ	1,196	TUB	1,4756
5	UBQ	1,3761	PP2A-1	1,3531	EF-1 $\alpha$	0,9621	EF-1 $\alpha$	1,3761	UBQ	1,5321
6	PP2A-1	1,7669	TUB	1,6235	IDH	1,0545	IDH	1,7669	PP2A-1	1,8796
7	IDH	2,3691	UBQ	1,7485	PP2A-1	1,2907	PP2A-1	2,3691	IDH	2,3413

Tabela 3. Valores do Coeficiente de Variação (CV) e do desvio padrão (SD), fornecidos pelo programa *BestKeeper*, de cada candidato a gene de referência nos cinco conjuntos amostrais.

Rank	Todas Amostras		VM01 (Tolerantes)		VM05 (Sensível)		Estresse Hídrico		Irrigação	
	Gene	CV $\pm$ SD	Gene	CV $\pm$ SD	Gene	CV $\pm$ SD	Gene	CV $\pm$ SD	Gene	CV $\pm$ SD
1	SAND	6,7 $\pm$ 1,6	IDH	3,68 $\pm$ 0,92	SAND	6,72 $\pm$ 1,64	IDH	6,2 $\pm$ 1,48	EF-1 $\alpha$	6,12 $\pm$ 1,62
2	EF-1 $\alpha$	6,23 $\pm$ 1,67	PP2A-1	4,51 $\pm$ 1,10	IDH	7,72 $\pm$ 1,66	TUB	6,84 $\pm$ 1,8	SAND	6,53 $\pm$ 1,56
3	TUB	6,79 $\pm$ 1,74	EF-1 $\alpha$	4,49 $\pm$ 1,19	UBQ	7,54 $\pm$ 1,71	EF-1 $\alpha$	6,73 $\pm$ 1,83	PP2A-1	6,85 $\pm$ 1,73
4	UBQ	7,61 $\pm$ 1,75	TUB	5,18 $\pm$ 1,32	EF-1 $\alpha$	7,84 $\pm$ 2,12	SAND	7,6 $\pm$ 1,87	TUB	7,24 $\pm$ 1,84
5	IDH	8,36 $\pm$ 1,94	SAND	5,63 $\pm$ 1,32	TUB	8,38 $\pm$ 2,17	UBQ	8,22 $\pm$ 1,95	PP2A-3	9,45 $\pm$ 2,08
6	PP2A-1	8,05 $\pm$ 2,05	PP2A-3	7,2 $\pm$ 1,55	PP2A-3	10,78 $\pm$ 2,45	PP2A-1	9,5 $\pm$ 2,49	UBQ	9,67 $\pm$ 2,24
7	PP2A-3	9,58 $\pm$ 2,12	UBQ	8,05 $\pm$ 1,88	PP2A-1	10,55 $\pm$ 2,81	PP2A-3	11,01 $\pm$ 2,54	IDH	10,35 $\pm$ 2,37

Tabela 4: Classificação com base nos valores de estabilidade, a partir do algoritmo do *Delta Ct*, dos candidatos a genes de referência nos cinco conjuntos amostrais.

Rank	Todas Amostras		VM01 (Tolerantes)		VM05 (Sensível)		Estresse Hídrico		Irrigação	
	Gene	CV±SD	Gene	CV±SD	Gene	CV±SD	Gene	CV±SD	Gene	CV±SD
1	SAND	1.55	SAND	1.36	SAND	0.570	SAND	1.78	SAND	1.56
2	PP2A-3	1.65	PP2A-3	1.48	PP2A-3	0.636	PP2A-3	1.91	PP2A-3	1.65
3	EF-1	1.73	IDH	1.52	TUB	0.712	EF-1	2.10	EF-1	1.78
4	TUB	1.88	EF-1	1.66	UBQ	0.854	TUB	2.26	TUB	2.09
5	UBQ	1.98	PP2A-1	1.81	EF-1	0.928	UBQ	2.38	UBQ	2.10
6	PP2A-1	2.19	TUB	1.96	IDH	1.053	PP2A-1	2.70	PP2A-1	2.30
7	IDH	2.65	UBQ	2.08	PP2A-1	1.325	IDH	2.84	IDH	2.64

Tabela 5: Rank geral da estabilidade dos candidatos a genes de referência de todos os conjuntos amostrais, de acordo com a ferramenta *RefFinder*.

Rank	Todas Amostras		VM01 (Tolerantes)		VM05 (Sensível)		Estresse Hídrico		Irrigação	
	Gene	Geomean of ranking values	Gene	Geomean of ranking values	Gene	Geomean of ranking values	Gene	Geomean of ranking values	Gene	Geomean of ranking values
1	SAND	1.00	SAND	1.50	SAND	1.19	SAND	1.41	SAND	1.19
2	PP2A-3	2.30	PP2A-3	2.21	UBQ	2.00	PP2A-3	2.30	PP2A-3	2.11
3	EF-1	2.71	IDH	2.45	PP2A-3	3.13	EF-1	3.00	EF-1	2.28
4	TUB	3.94	EF-1	3.46	TUB	3.41	TUB	3.56	TUB	4.23
5	UBQ	4.47	PP2A-1	3.98	IDH	4.82	IDH	4.30	UBQ	4.95
6	PP2A-1	6.00	TUB	5.42	EF-1	4.95	UBQ	4.73	PP2A-1	5.05
7	IDH	6.44	UBQ	7.00	PP2A-1	7.00	PP2A-1	6.00	IDH	7.00

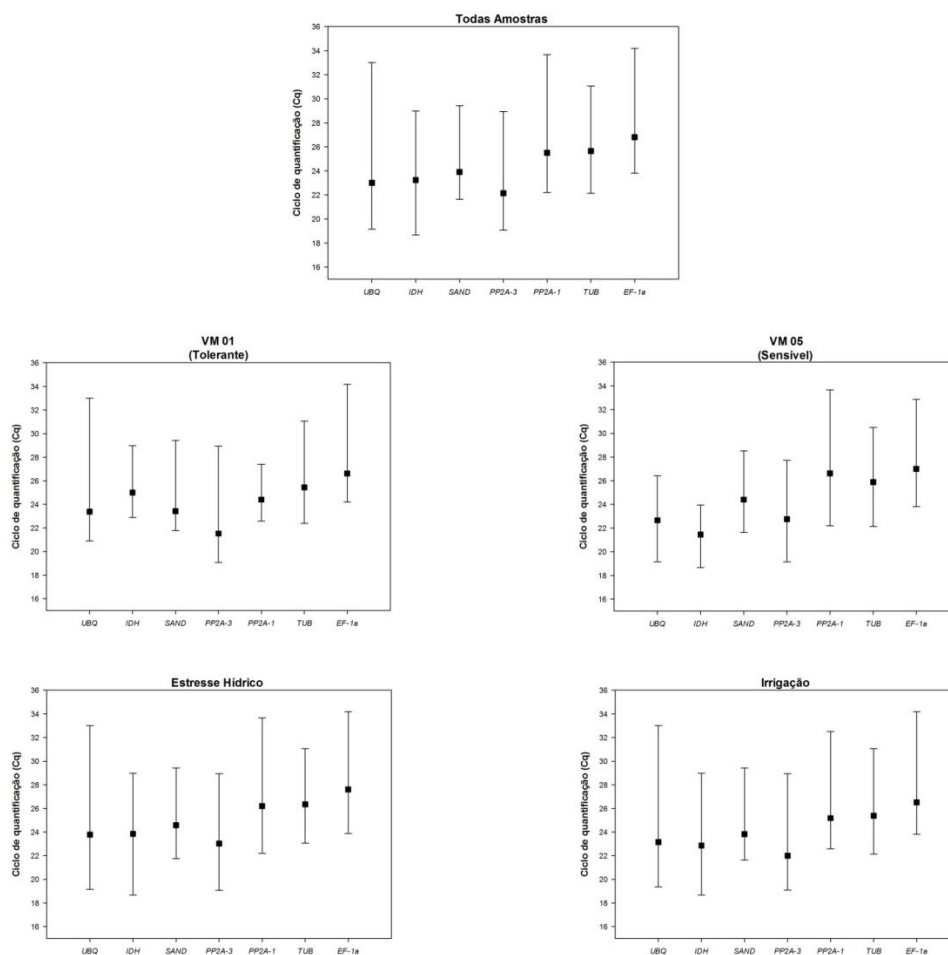


Figure 1. Perfis de expressão dos candidatos a genes de referência. Os níveis de expressão de cada gene são apresentados com valores Cq a partir da análise dos cinco conjuntos amostrais. Barras indicam os valores Cq máximo e mínimo. Quadrados representam os valores Cq médio.



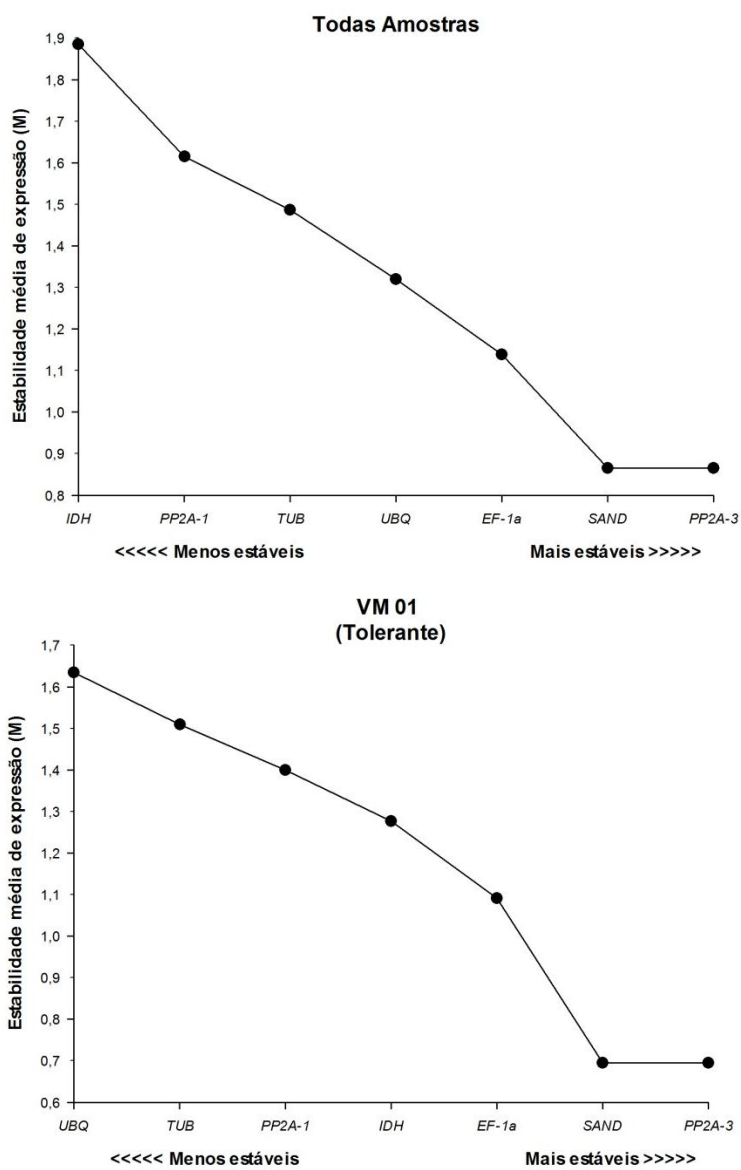


Figure 2. Estabilidade média de expressão (M) dos candidatos a genes de referência nos conjuntos de todas as amostras e do clone VM01, desde o menos estável (à esquerda) até o mais estável (à direita), de acordo com o algoritmo *geNorm*.

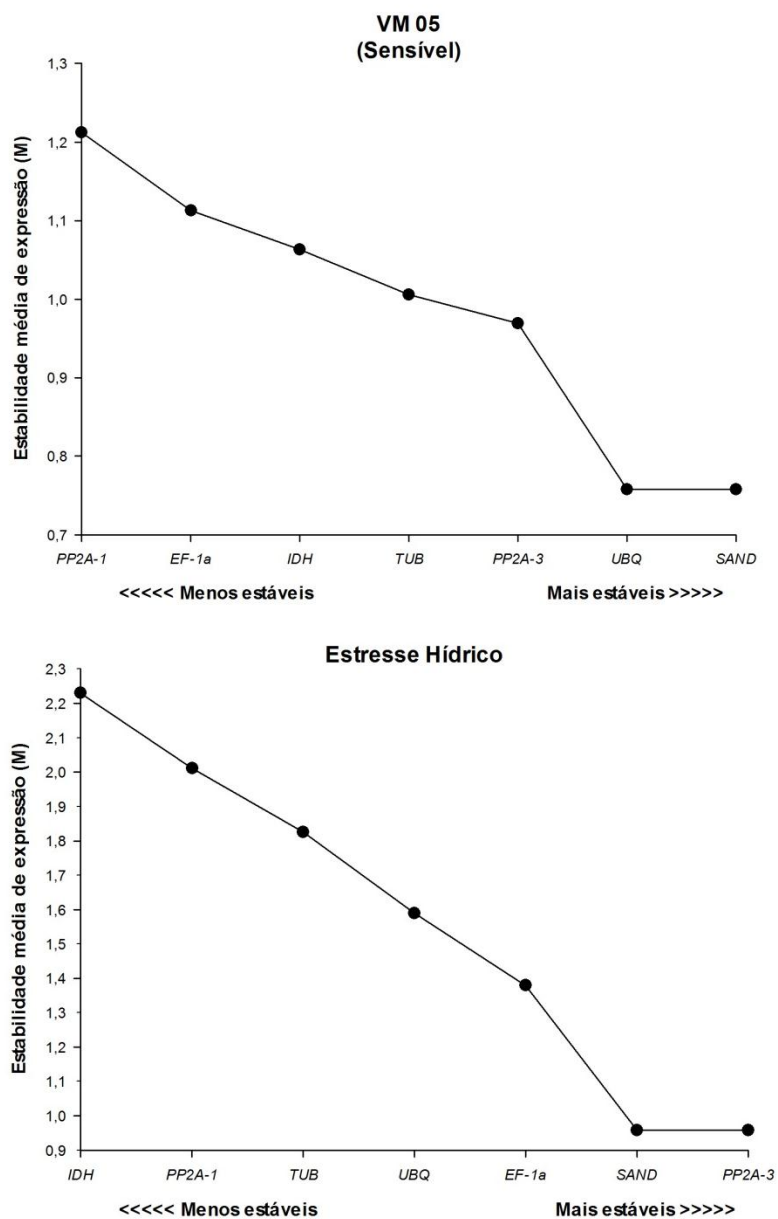


Figure 3: Estabilidade média de expressão (M) dos candidatos a genes de referência nos conjuntos amostrais do clone VM05 e Estresse hídrico, desde o menos estável (à esquerda) até o mais estável (à direita), de acordo com o algoritmo *geNorm*.

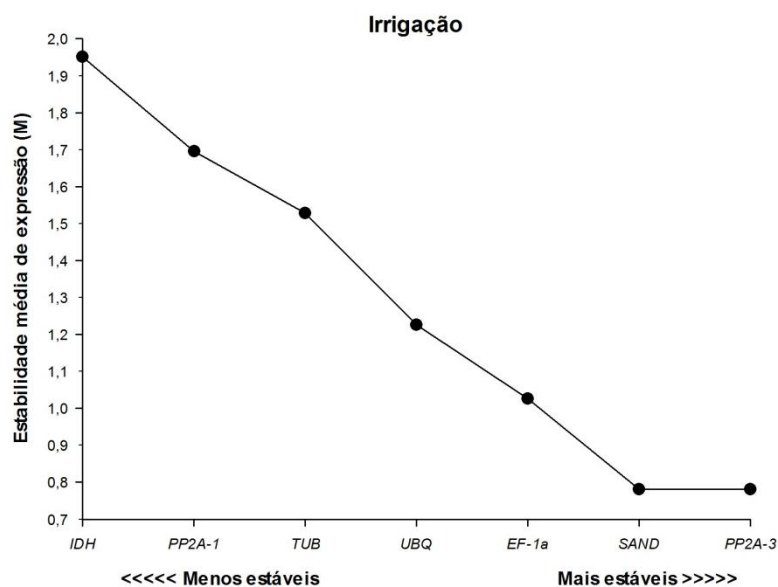


Figure 4: Estabilidade média de expressão (M) dos candidatos a genes de referência no conjunto amostral Irrigação, desde o menos estável (à esquerda) até o mais estável (à direita), de acordo com o algoritmo *geNorm*.

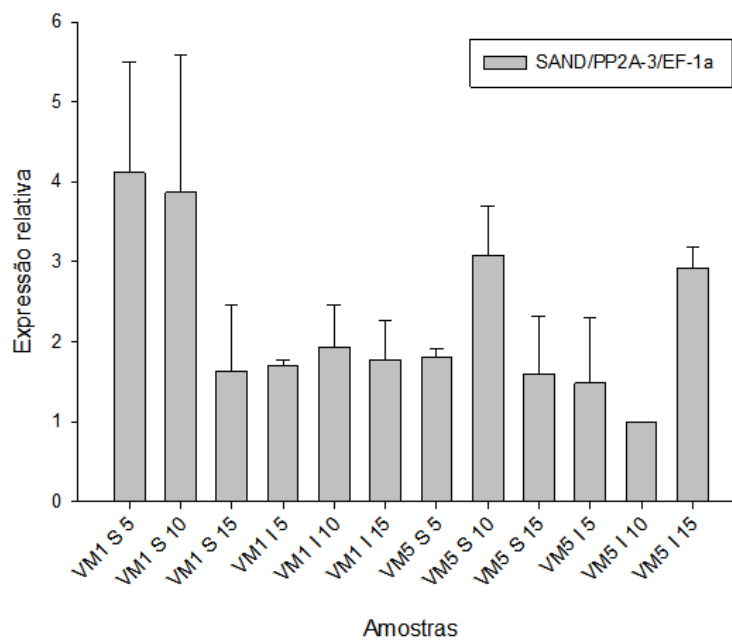


Figure 5: Expressão relativa do gene *EgrCPK26* nas diferentes amostras testadas, normalizada com os três genes mais estáveis

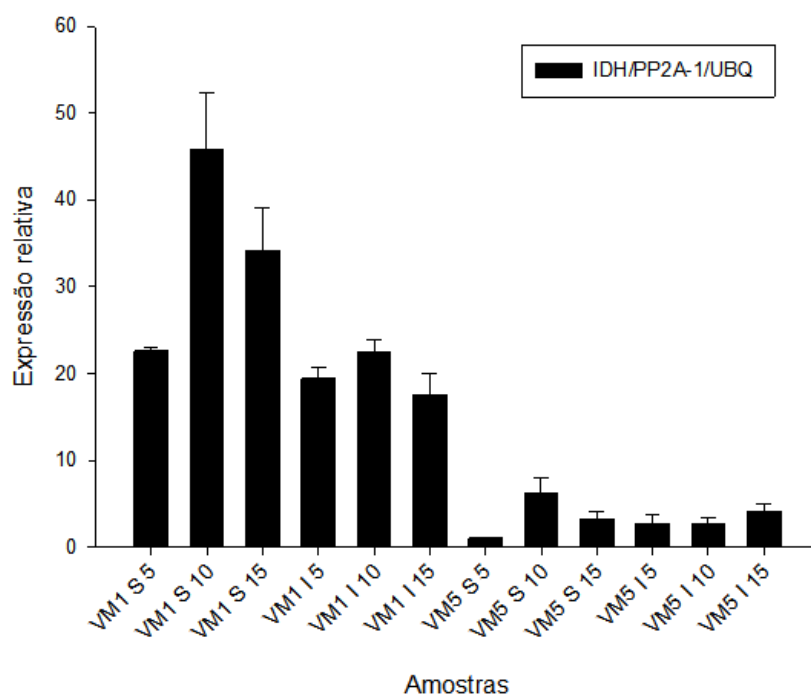


Figure 6: Expressão relativa do gene *EgrCPK26* nas diferentes amostras testadas, normalizada com os três genes mais instáveis.

**ARTIGO 2:** Análise da expressão gênica de dois clones contrastantes do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* em condições de déficit hídrico

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE DOIS CLONES CONTRASTANTES DO HÍBRIDO *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

**RESUMO**

O déficit hídrico afeta severamente a produtividade das espécies de eucalipto por interferir em processos vitais para o desenvolvimento e sobrevivência da planta. Vários processos fisiológicos e moleculares estão envolvidos na percepção, sinalização e indução da resposta da planta sob condições de seca. O fitohormônio Ácido Abscisico (ABA), através da cascata ABA-dependente, desempenha diversos papéis cruciais na resposta da planta ao déficit hídrico. Além das rotas ABA-dependente, a planta contém genes que não são induzidos por ABA, presente na rota ABA-independente, e mensageiros secundários, como o  $Ca^{2+}$ , que apresentam funções importantes para a tolerância da planta. Nos últimos anos, verificou-se que as modificações epigenéticas interferem na expressão de genes e, conseqüentemente, na resposta da planta à seca. Julgando pela complexidade dos processos envolvidos na resposta ao estresse hídrico, torna-se necessário estudos a respeito das sinalizações e mecanismos de resposta ao déficit hídrico através de técnicas moleculares, como a RT-qPCR, a fim de avaliar os padrões de expressão de genes de interesse e inferir o comportamento de diferentes genótipos e espécies. Neste trabalho foram avaliadas as expressões de seis genes (*EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* e *EgrDDM1*) via RT-qPCR, assim como o potencial hídrico de dois clones contrastantes (VM01 – tolerante e VM05 – sensível), sob condições de seca e irrigação. Em condições de déficit hídrico, o VM01 apresentou maior expressão dos genes *EgrNCED3* e *EgrPYR1*, inferindo que este clone apresenta maior biossíntese de ABA e a sucessiva indução da cascata ABA-dependente pelo complexo receptor *PYR/PYL/RCAR*, quando comparado ao clone VM05 nas mesmas condições. O clone tolerante demonstrou também maior expressão do gene *EgrDREB2*, representante da cascata ABA-independente, e do gene *EgrCPK26*, relacionado com a

abertura e fechamento estomático. Entretanto, o clone VM05 expressou mais os genes *EgrMET1* e *EgrDDM1* em todas os tratamentos, quando comparado com o clone tolerante, mostrando o impacto das modificações epigenéticas na tolerância ao déficit hídrico. Através deste trabalho foi possível inferir mecanismos de tolerância ao déficit hídrico do clone VM01 perante o clone VM05, em razão dos padrões de expressão dos genes avaliados.

## INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é uma das condições que mais ameaçam a produção de *Eucalyptus spp.*, afetando processos vitais como a fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos e absorção de íons. Com objetivo de evitar ou diminuir este impacto, as plantas induzem mudanças bioquímicas e morfológicas, naturalmente, a fim de aclimatar às condições do estresse (BARTELS e SUNKAR, 2005; CHAVES et al., 2009). Essas alterações são consequências de um espectro de processos fisiológicos e moleculares envolvidos na resposta da planta ao déficit hídrico. Em razão de sua complexidade, torna-se crucial a compreensão dos mecanismos da planta sob condições de déficit hídrico, para auxiliar na obtenção e seleção de genótipos tolerantes (AHUJA et al., 2010).

O fitohormônio ácido abscísico (ABA) desempenha papéis importantes em várias respostas ao déficit hídrico, como, o fechamento estomático, indução de proteínas responsivas ao estresse e acúmulo de vários metabólitos para a proteção da célula (UMEZAWA et al., 2010). Dentre os genes relacionados à biossíntese de ABA, o *NCED3* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) foi estudado em várias espécies como em *Arabidopsis* (WOO et al., 2011), Feijão (KHODAMBASHI; SHIRAN; GHARAGHANIPUR, 2013), Milho (SU et al., 2011), Tabacco (ZHANG et al., 2009), entre outras, demonstrando que sua maior expressão está diretamente relacionada com a maior produção de ABA e às respostas posteriores induzidas por este

fitohormônio em plantas sob déficit hídrico (GOLLEC e SZAREJKO, 2013; IUCHI et al., 2001).

Após a biossíntese do ABA, três componentes principais desempenham papéis primordiais para a sinalização e resposta ABA-dependente: as proteínas receptoras *PYR/PYL/RCAR* (*Pyrabactin Resistance / PYR1-like/ Regulatory Component of ABA Receptor*), proteínas *PP2C* (*Protein Phosphatase 2C*) e as proteínas *SnRK2* (*SNF1-related protein*) (MEHROTRA et al., 2014). Os receptores *PYR/PYL/RCAR* se ligam ao ABA intracelular sofrendo mudanças conformacionais que possibilitam a ligação com as proteínas *PP2C*. Estas por sua vez, serão inativadas permitindo que as proteínas *SnRK2*, uma proteína quinase, induzam a expressão de genes e fatores de transcrição ABA-dependentes (GONZALEZ-GUZMAN et al., 2012).

Além das sinalizações e respostas mediadas por ABA, análises moleculares revelaram rotas ABA-independentes, mediadas por vários fatores de transcrição, os quais regulam a expressão de genes importantes para diversos processos fisiológicos estresse-responsivos (KUROMORI et al., 2014). Os fatores de transcrição *DREB* (*DRE-binding protein*) desempenham este papel através do reconhecimento de sequências *DRE* (*Dehydration responsive elements*) A/GCCGAC, nas regiões promotoras (AGARWAL e JHA, 2010). Genes que codificam o fator de transcrição *DREB* já foram descritos e avaliados em várias espécies tais como *Arabidopsis thaliana* (LIU et al., 2000), *Glycine max* (MIZOI et al., 2012), *Oryza sativa* (MATSUKURA et al., 2010) executando papéis importantes na tolerância ao estresse hídrico.

Um terceiro mecanismo de sinalização e defesa da planta a seca é mediado por mensageiros secundários como, por exemplo, o íon  $Ca^{2+}$ . Após a percepção do estresse, ocorre um aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  no citosol e em algumas organelas. Com este aumento, proteínas da família *CDPK* (*Calcium-Dependent Protein Kinase*) reconhecem o  $Ca^{2+}$ , resultando em mudanças conformacionais e na ativação destas proteínas (BOUDSOCQ e



SHEEN, 2012). A família multigênica *CDPK* participa de vários processos de ativação e repressão de enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição. Dentre os vários genes pertencentes a esta família, o *AtCPK6*, incluindo seus genes ortólogos, participam do fechamento estomático, por ativar canais iônicos *SLAC1* (*Slow Anion Channel1*) e nos canais de cálcio, assim como participam também na produção de osmólitos como a prolina, induzindo a tolerância ao déficit hídrico em espécies onde este gene é altamente expresso (SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013; XU et al., 2010).

A expressão ou a repressão de genes é totalmente influenciada pelo epigenoma da planta no momento do estresse. As mudanças epigenéticas mais estudadas na resposta da planta ao estresse hídrico são as modificações das histonas, remodelação da cromatina e a metilação do DNA (HAN e WAGNER, 2013). Apesar de pouco compreendido, estudos mostraram modificações globais nos padrões de metilação do DNA e na descompactação da cromatina em plantas sob déficit hídrico, sendo estas mudanças catalisadas por enzimas metiltransferases e remodeladores da cromatina, respectivamente (KARAN et al., 2012; KIM et al., 2014).

Uma das abordagens mais usadas para a caracterização molecular de plantas é a análise da expressão gênica que possibilita a identificação de marcadores moleculares, manipulação genética e avaliação da tolerância de acordo com o perfil de expressão de genes candidatos (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). A técnica mais comumente utilizada é a RT-qPCR (*Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*), a qual apresenta como vantagem sua rapidez, sensibilidade e especificidade (PFAFFL, 2004). Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de seis genes relacionados as diferentes rotas de resposta ao déficit hídrico (*EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrMET1* e *EgrDDM1*) em tecidos foliares de dois clones do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* (VM01- Tolerante e VM05- Sensível), via RT-qPCR, e relacionar esta expressão com o padrão morfológico e fisiológico destes genótipos sob condições de déficit hídrico e irrigação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e condição de crescimento**

Inicialmente, 42 mudas rustificadas de dois clones de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus urophylla* (VM01 – tolerante ao estresse hídrico/ VM05 – Sensível), com 3 meses de idade, foram plantadas em vasos contendo 1500 mL de substrato CSC<sup>®</sup> (Composição: Turfa de Sphagno, Vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK [traços]). Antes do experimento, todas as mudas permaneceram 10 dias em casa de vegetação com temperatura e umidade controlada, sob constante irrigação.

### **Tratamento de estresse hídrico e amostragem**

Após o período de 10 dias, as mudas de ambos os clones foram submetidas a duas condições diferentes, déficit hídrico e irrigação constante. O experimento foi composto por três períodos de coleta (5, 10 e 15 dias). Em todos os dias determinados, quatro folhas foram coletadas de três mudas (triplicata biológica) dos dois clones sob as condições de déficit hídrico e irrigação, totalizando 21 mudas por clone. Em seguida, as folhas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

### **Análise do potencial hídrico**

O potencial hídrico das mudas, de ambos os clones (VM01 e VM05) sob as condições de estresse hídrico e irrigação, foi medido utilizando uma bomba de pressão do tipo Scholander, na antemanhã (no período entre 02:00 e 04:00 horas da manhã), sobre folhas maduras e completamente expandidas

localizadas no terço mediano da muda. Esta análise foi realizada no mesmo dia das coletas das folhas para a extração de RNA.

### **Extração de RNA e quantificação**

O protocolo descrito por Chang et al. (1993) com algumas modificações foi utilizado para a extração do RNA das folhas coletadas. Após a maceração de 200 mg de tecido, o tampão CTAB pré-aquecido a 65°C (2% p/v de CTAB, 2% p/v de PVP-40, 2M NaCl, 100mM tris-HCl pH8,0; 25mM EDTA pH 8,0 e 0,5g/L de Espermidina), juntamente com  $\beta$ -mercaptoetanol, foi adicionado à amostra. Esta foi homogeneizada por 2 minutos e acrescida de 900  $\mu$ L de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1 v/v). Após centrifugação de 10 minutos a 9.000 g(4°C) uma segunda lavagem com Clorofórmio:Álcool Isoamílico foi realizada. Para a primeira precipitação, cloreto de lítio (10 M) foi adicionado ao sobrenadante coletado, permanecendo por um período de 6 horas à 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 9.000 RPM (4°C) e o precipitado foi ressuspenso com uma solução SSTE (1 M NaCl; 0,5% SDS; 10 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecida a 37°C. Na mesma solução, isopropanol foi adicionado e as amostras permaneceram a -20°C durante 1 hora, seguido de centrifugação a 10.000 g durante 20 minutos (4°C). O precipitado final foi lavado com etanol 75% e ressuspenso com água DEPC.

### **Tratamento do RNA e síntese do cDNA**

Para o tratamento das amostras de RNA, a fim de retirar o DNA presente nas soluções, o *Kit Turbo DNA-free (Ambion)* foi utilizado, de acordo com o protocolo do fabricante. O grau de pureza das amostras foi analisado utilizando espectrofotômetro (*Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*), observando valores de absorvância (A280/260-A260/230) de 1,8 a

2,3, respectivamente. Em seguida, a síntese do cDNA a partir do RNA tratado foi realizada através do *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems).

### **Desenho e eficiência dos primers**

Através da plataforma Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>), onde o genoma e o proteoma do *Eucalyptus grandis* foi recentemente depositado, as sequências dos genes selecionados foram encontradas. O alinhamento das sequências foram realizadas através da ferramenta BLASTx, com a sequência de entrada sendo os genes ortólogos presentes na espécie modelo, *Arabidopsis thaliana*. O resultado dos alinhamentos foram sequências peptídicas expressas pelos genes ortólogos em *Eucalyptus grandis*. As sequências das proteínas foram utilizadas para obter as sequências de nucleotídeos do gene específico.

Os genes avaliados neste trabalho foram o *EgrCPK26* (*Calcium-Dependent Protein Kinase*), *EgrDREB2* (*DRE-Binding Protein 2*), *EgrNCED3* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3*), *EgrPYR1* (*Pyrabactin Resistance1*), *EgrMET1* (*DNA Methyltransferase 1*) e *EgrDDM1* (*Nucleosome Remodeler 1*). Após a escolha dos genes, de acordo com os resultados do alinhamento, os primers foram desenhados através do programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen). Os parâmetros utilizados para o desenho dos primers foram: tamanho do primer (18 a 23 nucleotídeos), conteúdo de GC (40 a 60%), Tm dos primers (58 a 64°C) e o tamanho do amplicon (80 a 130 pb). A qualidade destas sequências foi verificada, primeiramente, *in silico*, através do programa OligoAnalyser™ IDT.

O cálculo da eficiência (E) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) para cada par de primers foram obtidos através de uma curva padrão, resultado de uma RT-qPCR da diluição seriada de cinco vezes do pool de cDNA (Tabela 1).

## Reação de Amplificação e Análise dos dados

As reações de RT-qPCR, para a análise da expressão dos genes foram realizadas mediante o uso do equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*. Para a amplificação, cada amostra apresentava um volume total de 10  $\mu$ L, contendo 200 ng de cDNA, 5  $\mu$ L 1X SYBR® Green (*Applied Biosystems*) e 0,2  $\mu$ M do *primer* específico. As condições para todas as reações foram: 5 minutos a 95°C, 5 segundos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 10 segundos a 60 °C. A especificidade dos *primers* foi analisada de acordo com uma curva de dissociação (*Melting Curve*), após os 40 ciclos.

Os dados de expressão foram quantificados relativamente pela fórmula de Pfaffl (2001) e a normalização foi feita com a expressão dos genes de referência *SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* . Para a análise de expressão relativa, diferentes calibradores foram utilizados dependendo do gene avaliado: *EgrNCED3* (VM05 Irrigado – 10 dia), *EgrPYR1* (VM01 Irrigado – 5 dias), *EgrDREB2* (VM05 Irrigado – 15 dias), *EgrCPK26* (VM05 Irrigado – 10 dias), *EgrDDM1* (VM01 Déficit hídrico – 15 dias), *EgrMET1* (VM01 Irrigado – 5 dias). Todas as análises foram feitas em triplicatas biológicas e triplicatas técnicas, incluindo amostra interensaio para assegurar a reprodutibilidade técnica entre as placas. Os dados de expressão foram utilizados para a construção de gráficos, via programa *SigmaPlot* versão 11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise morfológica e do potencial hídrico

Através de análises visuais dos dois clones estudados (VM01 – Tolerante e VM05 – Sensível), não foram verificadas diferenças morfológicas nos primeiros 10 dias (Figura 1A, 1B – Figura 2A, 2B) em

todos os tratamentos sob déficit hídrico. Com 15 dias de déficit hídrico, as plantas do clone VM01 apresentaram sintoma de murcha das folhas em todas as repetições (Figura 1C, 1D). De uma maneira mais drástica, as mudas do clone VM05 demonstraram, visualmente, sintomas de murcha em todas as repetições e também folhas senescentes devido ao impacto do estresse hídrico (Figura 2C, 2D).

Com a avaliação do potencial hídrico, foi possível inferir o status hídrico das mudas dos clones VM01 e VM05 com 5, 10 e 15 dias de seca e irrigação. Ambos os clones, quando irrigados constantemente, não apresentaram diminuição de seu potencial hídrico ao longo dos dias, variando de -0,3 a -0,6 MPa (Figura 3). Sob condições de déficit hídrico, não houve diminuição do potencial hídrico do clone VM01 até o 10º dia, enquanto que o VM05 alcançou um potencial de -0,7 MPa neste período. Com 15 dias de estresse, as mudas do VM01 tiveram seu status hídrico mais alto, com -0,8 MPa, comparado com o VM05, o qual obteve um potencial de -1,45 MPa.

Com a redução da disponibilidade hídrica nos solos, as plantas induzem um progressivo fechamento estomático, de acordo com a severidade da seca, para evitar a perda de água por transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2004). A resposta estomática à desidratação apresenta variações intra e interespecíficas, de modo que espécies mais tolerantes são capazes de manter o uso eficiente da água em razão do rápido fechamento estomático evitando a perda de água (ANJUM et al., 2011). De acordo com estas informações e com os dados obtidos, cria-se a hipótese de que o clone VM01 induziu com maior rapidez o fechamento estomático evitando a perda de água por um período maior quando comparado com o VM05, em razão de manter um maior potencial hídrico durante o período de déficit hídrico. Estudos em que genótipos contrastantes sob condições de déficit hídrico foram avaliados, mostraram que genótipos tolerantes apresentaram maior valor do potencial hídrico, menor taxa de transpiração e mantiveram o turgor das células. Em razão da maior perda de água, os genótipos sensíveis

apresentaram maior temperatura foliar, danos no aparato fotossintético, menor conteúdo de clorofila, estresse oxidativo e senescência foliar (ANJUM et al., 2011; COSTA E SILVA et al., 2009; DAMATTA et al., 2003; YANG e MIAO, 2010).

### **Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

#### **Eficiência dos *primers***

Através da curva padrão obtida foi possível verificar a eficiência dos pares de *primers* de cada gene, incluindo os genes de referência (*SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* ) utilizados para a normalização dos dados. Os valores de eficiência entre os genes de interesse variaram de 90 a 100%, enquanto que os genes de referência apresentaram eficiência entre 98 e 100% (Tabela 1). Curvas de dissociação foram obtidas após cada reação demonstrando pico único para todos os genes avaliados.

#### **Expressão de genes relacionados ao ABA**

O fitohormônio ABA é conhecido por desempenhar papéis importantes na resposta da planta ao déficit hídrico. As plantas acumulam ABA quando sujeitas a condições de seca e este participa da indução de vários genes relacionados à defesa da planta, como os que codificam proteínas da família *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*), fatores de transcrição, proteínas kinase e fosfatase, proteínas de canais e transportadoras, enzimas relacionadas à síntese de osmoprotetores, sinalização de fosfolipídeos, fechamento estomático, entre vários outros (CUTLER et al., 2010; FUJITA et al., 2011; URANO et al., 2009). A maior biossíntese de ABA está correlacionada com a alta expressão de alguns membros da família *NCED* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) em tecidos foliares e radiculares (ZHANG et al., 2008). Estes genes participam da última etapa de produção

do ABA dentro dos plastídeos e são responsáveis pela clivagem oxidativa dos carotenoides para o composto xantoxina, sendo este transportado, posteriormente, para o citosol (GOLLEC e SZAREJKOG, 2013). Dentre os genes pertencentes à família *NCED*, o *NCED3* demonstra estar mais relacionado à produção de ABA na resposta da planta ao déficit hídrico quando comparado com os outros genes da mesma família (ENDO et al., 2008).

No clone tolerante (VM01), a expressão do gene *EgrNCED3* foi maior nos tratamentos de seca quando comparados com as mudas que foram constantemente irrigadas, enquanto que no clone sensível (VM05) este gene foi mais expresso somente após o 10º dia de seca (Figura 4). Ao comparar os dois clones, verificou-se uma maior expressão do gene *EgrNCED3* no clone tolerante em todos os tempos de seca em relação ao clone sensível, inferindo a maior biossíntese de ABA. Os dois clones expressaram mais este gene após 10 dias de seca, contudo, o clone tolerante obteve uma expressão quase 10x maior que o clone sensível no mesmo período. Nas análises do potencial hídrico, o VM05 apresentou uma queda em seu status hídrico (-0,7 MPa), enquanto que o VM01 manteve o potencial constante (-0,4 MPa) no 10º dia de seca (Figura 3). Este resultado pode ser em razão de um possível aumento nos níveis de ABA no clone tolerante e a conseqüente indução do fechamento dos estômatos, evitando a perda de água por transpiração (KIM e MAIK, 2010; YOSHIDA et al., 2015; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

O segundo gene avaliado, relacionado com a sinalização e cascata ABA-dependente, foi o *EgrPYR1*, o qual codifica uma proteína integrante do complexo receptor de ABA, *PYR/PYL/RCAR*. Através de vários estudos com *A. thaliana*, um modelo de percepção e sinalização de ABA foi sugerido, envolvendo a participação de três componentes principais: o complexo *PYR/PYL/RCAR*, as proteínas da família *PP2C* e as proteínas *SnRK2* (MEHROTRA et al., 2014). Estudos sobre estrutura e interações de proteínas em plantas submetidas a condições de seca demonstraram que o complexo



*PYR/PYL/RCAR* se liga ao ABA, sofre uma mudança conformacional e induz a inativação das proteínas do tipo *PP2C* (MIYAZONO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2009). Com a inativação dessas proteínas, as proteínas *SnRK2*, as quais eram defosforiladas pelas *PP2C*, são capazes de ativar vários fatores de transcrição, canais iônicos e genes responsivos ao déficit hídrico, tornando possível a cascata ABA-dependente (GONZALEZ-GUZMAN et al., 2012; YOSHIDA, 2015).

O padrão de expressão do gene *EgrPYRI* no clone tolerante, sob déficit hídrico, acompanhou a expressão do gene *EgrNCED3* em todos os tratamentos de déficit hídrico. As mudas apresentaram a maior expressão no 10º dia, decaindo, posteriormente, para uma menor expressão com 15 dias de seca (Figura 4). Diferentemente, o clone sensível não apresentou o mesmo padrão do VM01, de modo que a expressão do *EgrPYRI* manteve-se alta tanto no 5º e no 10º dia de seca, diminuindo no último dia avaliado. A expressão deste gene manteve-se relativamente constante nas mudas sujeitas a irrigação, não apresentando diferenças significativas. A atividade receptora de ABA das proteínas *PYRI* no complexo *PYR/PYL/RCAR*, justifica o padrão semelhante de expressão dos genes *EgrNCED3*, relacionado à produção de ABA, e do gene *EgrPYRI* no clone VM01. Entretanto a expressão do gene *EgrPYRI* não apresentou o mesmo padrão, se mantendo elevada nos primeiros dias de análise. Estudos recentes demonstraram uma possível interação do *PYRI* com a proteína *AP2C1*, membro da família *PP2C*. Esta proteína demonstrou afetar a atividade de canais iônicos de  $K^+$  (*KAT - Potassium Channel in Arabidopsis thaliana 1*), induzindo o fechamento estomático (BROCK et al., 2010; JONES et al., 2014). Através destes dados sugere-se a participação da proteína *EgrPYRI* nas respostas estomáticas do clone VM05, devido às expressões elevadas nos primeiros dias de análise.

### Expressão do gene *EgrCPK26*

Além da sinalização mediada pelo ABA, o  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel muito importante na resposta contra o estresse hídrico, atuando como mensageiro secundário. Após a percepção do estresse, a planta induz o aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e em organelas onde é reconhecido por proteínas quinase (KUDLA; BATISTIČ; HASHIMOTO, 2010). A família multigênica de proteínas quinase *CDPK* (*Calcium-Dependent Protein Kinase*), desempenha uma variedade de funções em plantas sobre estresse hídrico. Um dos membros da família, o *AtCPK6* participa de modificações nos canais iônicos *SLAC1* (*Slow Anion Channel1*), nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células guarda, na produção de osmoprotetores (Prolina) e no controle das Espécies reativas de oxigênio (ERO's) (GEIGER et al., 2010). Com a ativação dos canais iônicos, o efluxo dos íons  $\text{K}^+$  é estimulado, modificando o potencial hídrico das células guarda em relação ao meio extracelular, ocasionando a diminuição do turgor celular e o fechamento estomático.

Dentre todos os genes citados, o *EgrCPK26*, ortólogo do *AtCPK6*, demonstrou a menor expressão em todos os tratamentos em condições de seca. Nas duas primeiras análises (5 e 10 dias) o clone VM01 apresentou a maior expressão do gene, decaindo no 15º dia de seca, enquanto que somente no 10º dia o clone VM05 apresentou aumento da expressão (Figura 5). Quando as mudas de ambos os clones foram irrigadas, a expressão do gene *EgrCPK26* não sofreu alteração. De acordo com estes dados, infere-se, novamente, a resposta estomática mais eficiente do clone tolerante submetida à condição de déficit hídrico, além da maior atividade de outras rotas influenciada pelo gene *EgrCPK26*.

### **Expressão dos gene *EgrDREB2***

O gene *EgrDREB2*, ortólogo do *AtDREB2*, pertence a família ERF (*Ethylene Responsive Element Binding Factors*) de fatores de transcrição. Estas proteínas reconhecem a sequência A/GCCGAC, denominada DRE (*Dehydration responsive element*), nas regiões promotoras de genes relacionados à resposta da planta ao estresse hídrico (MATSUKURA et al., 2010). O fator de transcrição *DREB2* já foi identificado e caracterizado em várias espécies como *Arabidopsis* (LIU et al., 1998), trigo (SHEN et al., 2003), milho (QIN et al., 2007), soja (CHEN et al., 2007), entre outras, atuando na expressão de diversos genes dentro da cascata ABA-independente. Em todas as espécies estudadas, a alta expressão do *DREB2* estava relacionada com a ativação de genes que codificam proteínas LEA, deidrinas, biossíntese de osmoprotetores e enzimas antioxidantes em genótipos tolerantes e plantas transgênicas (CHEN et al., 2007; KHAN, 2011).

A crescente expressão do gene *EgrDREB2* nas mudas do VM01, juntamente com o perfil dos genes *EgrNCED3* e *EgrPYR1* no decorrer dos 15 dias de análise, reforça a capacidade de percepção da condição e ativação de genes responsáveis pela homeostase celular, resultando em uma maior tolerância a seca (Figura 5). Além disso, o clone VM01, apresentou uma alta expressão em déficit hídrico, quando se compara com o mesmo clone em constante irrigação. De acordo com caracterizações funcionais dos genes *DREB2* em várias espécies, torna-se possível inferir a alta expressão do gene *EgrDREB2* no clone VM01 com a ativação das enzimas relacionadas com a homeostase e reparo celular, como as proteínas LEA e às enzimas antioxidantes (KHAN et al., 2011). Ao contrário do clone tolerante, não houve aumento da expressão do gene *EgrDREB2* em nenhum tratamento no clone VM05.

### **Expressão dos genes *EgrMET1* e *EgrDDM1***

Estudos recentes confirmaram que a regulação epigenética é um importante mecanismo envolvido em vários processos fisiológicos, como a defesa da planta à seca. Estas regulações incluem modificações das histonas, metilação do DNA e remodeladores da cromatina (LUO et al., 2012). A metilação do DNA é encontrada nas sequências CG, CHG e CHH (onde H pode ser qualquer base, exceto G) das regiões promotoras e codificadora dos genes, impedindo ou estimulando a expressão destes. A metilação do DNA também é encontrada em elementos transponíveis, atuando, principalmente, na repressão destas sequências. Esta modificação epigenética é catalisada por enzimas metiltransferase, como a MET1 (*DNA methyltransferase 1*), a qual adiciona grupamentos metil nas sequências CG de maneira específica (LAW e JACOBSEN, 2010). Apesar de pouco compreendida, estudos recentes verificaram modificações globais dos padrões de metilação de algumas espécies e repressão de genes relacionados à seca, devido a metilação de regiões promotoras e codificadoras (CHOI e SANO, 2007; SONG et al., 2012). Simultaneamente, através da análise do transcriptoma de *A. thaliana* foi verificado que o alto nível de metilação de regiões codificadoras induziu a alta expressão de alguns genes, reforçando a complexidade de mecanismos epigenéticos (ZHANG et al., 2006; SAZE et al., 2012).

Outro tipo de regulação epigenética que afeta a expressão gênica é a remodelagem da cromatina pelas enzimas *DDM1*. Estas enzimas, através da hidrólise de ATP, movem-se ao longo da fita de DNA, descompactando os nucleossomos, possibilitando o acesso dos fatores de transcrição aos genes alvo e o acesso das enzimas metiltransferases ao DNA (RYAN e OWEN-HUGHES, 2011).

Ambos os genes *EgrDDM1* e *EgrMET1* demonstraram altas expressões em todos os tratamentos do clone VM05 e uma expressão basal no clone tolerante (Figura 6). Em *A. thaliana*, a alta expressão do gene *DDM1* está

diretamente correlacionada com o elevado nível de heterocromatina do genoma, região em que há uma maior compactação do DNA, interferindo na expressão gênica (ZEMACH et al., 2013). Além disso, neste trabalho a atividade da proteína *DDMI* demonstrou ser importante para a atividade de enzimas metiltransferase, modificando o metiloma da planta. De acordo com os dados visuais, fisiológicos e de expressões anteriores, supõem-se que as atividades dos genes relacionados à resposta da planta à seca estão comprometidas devido ao grau de compactação da cromatina do clone VM05, necessitando de uma maior atividade das enzimas *DDMI*, a fim de facilitar o acesso da maquinaria de transcrição. Já no clone VM01, onde as expressões dos genes *EgrDREB2*, *EgrNCED3*, *EgrPYR1* e *EgrCPK26* foram maiores, a atividade de ambos os genes relacionados com as modificações epigenéticas foram menores.

De acordo com estudos recentes em epigenética, a metilação do DNA demonstrou estar associada tanto na ativação de genes, através da metilação de regiões codificadoras, quanto na repressão gênica (SAHU et al., 2013). Song et al.(2012) demonstraram que, em plantas de soja sujeitas a salinidades do solo, a expressão dos fatores de transcrição da família *MYB*, *DREB* e *b-ZIP* foram afetados devido a metilação da sequência dos respectivos genes, resultando na atividade de enzimas metiltransferase. No entanto, devido à complexidade dos mecanismos epigenéticos, demonstrar onde a metilação catalisada pela enzima *EgrMET1* está ocorrendo necessita de técnicas mais específicas.

## CONCLUSÃO

Foi possível relacionar a expressão dos genes avaliados (*EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrMET1* e *EgrDDMI*), somados às análises fisiológicas e visuais, com a maior tolerância do clone VM01, comparando os resultados com outros estudos destinados a caracterização funcional de genes ortólogos. Ademais, não foram encontrados na literatura

estudos que relacionem a tolerância de genótipos à expressão de genes estresse-responsivos em *Eucalyptus spp.* Portanto, este trabalho poderá auxiliar em pesquisas futuras sobre caracterização funcional de genes, identificação de marcadores moleculares, transformação genética e avaliação da tolerância de outras espécies e híbridos de eucalipto em condições de déficit hídrico.

### REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K., JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, Gujarat , v.54, n.2, p.201-212. 2010.
- AHUJA I. et al. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science**, Trondheim , v.15, n.12, p.664– 674, 2010.
- ANJUM, S. A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v.6, n.1-9, p. 2026-2032, 2011.
- BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, Bonn, v.24, n.1, p.23-58. 2005.
- BOUDSOCQ, M., SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. **Trends in plant science**, Boston, v.18, n.1, p.30-40. 2013.
- BROCK, A.K., et al. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. **Plant Physiology**. Tuebingen v.153, n.3, p.1098–1111. 2010
- CHANG, S., et al. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular biology reporter**, Texas, v.11, n.2, p.113-116. 1993.

CHAVES, M. M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, Lisboa, v.103, n.4, p.551-560, 2009.

CHEN, M., et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and biophysical research communications**, Beijing, v.353, n.2, 299-305. 2007.

CHOI, C. S., SANO, H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. **Molecular Genetics and Genomics**, Nara, v.277, n.5, p.589-600. 2007

COSTA E SILVA, F. C., et al. Acclimation to short-term low temperatures in two Eucalyptus globulus clones with contrasting drought resistance. **Tree physiology**, Lisboa, v. 29, n.1, p.77-86. 2009.

CUTLER, S. R., et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Reviews Plant Biology**, Riverside, v.61, p.651-679. 2010.

DAMATTA, F. M., et al. Drought tolerance of two field-grown clones of Coffea canephora. **Plant Science**, Botucatu, v.164, n.1, p.111-117. 2003.

ENDO, A., et al. Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. **Plant Physiology**, Tokyo, v.147, n.4, p.1984-1993. 2008.

FUJITA, Y., et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of plant research**, Ibaraki, v.124, n.4, p.509-525, 2011.

GACHON, C., MINGAM, A., CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, Paris, v.55, n.402, p.1445-1454. 2004.

GEIGER, D., et al. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Stanford, v.107, n.17, p.8023-8028. 2010.

GOLLEC, A. D.; SZAREJKO, I. Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. In. VAHDATI, K.; LESLIE, C. **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. Taiwan: inTech, 2013, 103p.

GONZALEZ-GUZMAN, M., et al. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. **The Plant Cell Online**, Valencia, v.24, n.6, p.2483-2496. 2012.

HAN, S. K.; WAGNER, D. Role of chromatin in water stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, Pennsylvania, v.1, p.1-15. .2013.

IUCHI, S., et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, Ibaraki, v.27, n.4, p.325-333, 2001.

JONES, A.M., et al. Abscisic acid dynamics in roots detected with genetically encoded FRET sensors. **eLife**, Heidelberg v.3, p.1-30. 2014.

KARAN, R., et al. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. **PloS one**, Louisiana, v.7, n.6, p.1-10. 2012.

KHAN, M. S. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Tsukuba, v.25, n.3, p.2433-2442. 2011.

KIM, T. H., et al. Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. **Nature**, Massachusetts, v.506, n.7489, p.511-515. 2014.



KIM, T. H.; MAIK, B. Ć. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. **Annual review of plant biology**, La jolla, v.61, n.1, p.561-591. 2010.

KHODAMBASHI, M. SHIRAN, B. E GHARAGHANIPOUR, N. Differential Expression of CA7 and NCED Genes in Common Bean Genotypes under Drought Stress. **Journal of Agricultural Science and Technology**. Shahrekord, v. 15, n.1, p.1491-1499. 2013.

KUDLA, J., BATISTIĆ, O., HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, Münster, v.22, n.3, p.541-563. 2010.

KUROMORI, T., ET AL. Drought stress signaling network. In: HOWELL, S. H. (eds.). **Molecular Biology**. New York. Springer p. 383-409. 2014.

LAW, J. A., JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, Los Angeles, v.11, n.3, p.204-220. 2010.

LIU, Q., et al. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v.45, n.11, p.970-975. 2000.

LIU, Q., et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Ibaraki, v.10, n.8, p.1391-1406. 1998.

LUO, M., et al. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, Guangzhou, v.1819, n.2, p.129-136. 2012.

MATSUKURA, S., et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Tokyo, v.283, n.2, p.185-196. 2010.

MEHROTRA, R. et al. Abscisic acid and abiotic stress tolerance—Different tiers of regulation. **Journal of plant physiology**, Rajasthan v.171, n.7, p.486-496. 2014.

MIZOI, J., et al. GmDREB2A; 2, a canonical DREB2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates DRE-dependent gene expression. **Plant Physiology**, Tokyo, v.10, p. 112-132. 2012.

MIYAZONO, K. I., et al. Structural basis of abscisic acid signalling. **Nature**, Tokyo, v.462, n.7273, p.609-614. 2009.

PFÄFFL M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Munich. v.26, n.6, p.509–515, 2004.

QIN, F., et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, Ibaraki, v.50, n.1, p.54-69. 2007.

RYAN, D. P., OWEN-HUGHES, T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. **Current opinion in chemical biology**, Dundee, v.15, n.5, p.649-656. 2011.

SAHU, P. P., et al. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. **Plant cell reports**, New Delhi, v.32, n.8, p.1151-1159. 2013.

SANTIAGO, J., et al. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature**, Valencia, v.462, n.7273, p.665-668. 2009

SAZE, H., et al. DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. **Plant and Cell Physiology**, Saitama, v.53, n.5, p.766-784. 2012.

SCHULZ, P., HERDE, M., ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. **Plant physiology**, Berlin, v.163, n.2, p.523-530. 2013.

SHEN, Y. G., et al. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. **Theoretical and Applied Genetics**, Beijing, v.106, n.5, p.923-930. 2003.

SONG, Y., et al. The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. **PLoS one**, Shandong, v.7, n.7, p.1-11. 2012.

SONG, J., et al. Vernalization—a cold-induced epigenetic switch. **Journal of Cell Science**, Norwich, v.125, n.16, p.3723-3731. 2012.

SU, Z. et al. Association Analysis of the *nced* and *rab28* Genes with Phenotypic Traits Under Water Stress in Maize. **Plant Molecular Biology Report**, Beijing, v.29, p.714–722. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

UMEZAWA, T., et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. **Plant and cell physiology**, Ibaraki, v.51, n.11, p.1821-1839. 2010.

URANO, K., et al. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. **The Plant Journal**, Ibaraki, v.57, n.6, p.1065-1078. 2009.

YANG, F., MIAO, L. F. Adaptive Responses to Progressive Drought Stress in Two Poplar Species Originating from Different Altitudes. **Forestry**. Wuhan, v.44, n.1, p.23-37. 2010.

YOSHIDA, T., et al. Omics Approaches Toward Defining the Comprehensive Abscisic Acid Signaling Network in Plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.56, n.6, p.1043–1052. 2015.

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**, Tokyo, v.21, p.133-139. 2014.

XU, J., et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. **Planta**, Shanghai, v.231, n.6, p.1251-1260. 2010.

WOO, D. H. et al. Arabidopsis lenc1 mutant displays reduced ABA accumulation by low AtNCED3 expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, Busan, v.168, n.2, p.140–147, 2011.

ZEMACH, A., et al. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. **Cell**, Berkeley, v.153, n.1, p.193-205. 2013.

ZHANG, Y., et al. Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 cis -epoxycarotenoid dioxygenase influence H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production and antioxidant defences. **Plant, Cell and Environment**. Guangzhou, v.32, n.5, p.509–519. 2009.

ZHANG, Y., et al. Overexpressing SgNCED1 in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities, and stress tolerance. **Journal of Plant Growth Regulation**, Guangzhou, v.27, n.2, p.151-158. 2008.

ZHANG, X., et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. **Cell**, Los Angeles, v.126, n.6, p.1189-1201. 2006.

## TABELAS

Tabela 1. Informações gerais sobre os 6 genes analisados e os 3 genes de referências (*SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* ) utilizados para a normalização.

Gene	Definição	Acesso	Sequência ortóloga em <i>A. thaliana</i>	BLAST Score/E-value (Phytozome)	Sequência do primer (5' – 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon (pb)	E (%)	R <sup>2</sup>
<i>EgrCPK26</i>	<i>Calcium-Dependent Protein Kinase 26</i>	Eucgr.I01536.1	NM_127284.2	912,5/0,0	F: CAAGATTCATCCAACCTTCA	59,92	123pb	100	0,995
					R: ATGTGTTGCCCATAAAAGACG	59,88			
<i>EgrDREB2</i>	<i>DRE-Binding Protein 2</i>	Eucgr.G03094.2	NM_001036760.1	114,8/1,4e-29	F: AGTGACTATGCCGTGGATGAC	60,01	94pb	100	0,990
					R: GCTCCATCTTGACATCTGAGG	59,82			
<i>EgrNCED3</i>	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>	Eucgr.F01409	NM_112304.2	810,1/0,0	F: GAGCGAGAGATTTGAGGAACC	61,57	102pb	100	0,998
					R: CAGAGCAGCGAGAGAATAAGCA	62,18			
<i>EgrPYR1</i>	<i>Pyrabactin Resistance1</i>	Eucgr.E00279.1	NM_117896.2	247,3//4e-82	F: TCGCTTTTCCGTCTTTGAT	59,82	100pb	96,8	0,985
					R: CTCCAAGAACGAACTGCAT	60,26			
<i>EgrMET1</i>	<i>DNA Methyltransferase 1</i>	Eucgr.I00036.1	NM_124293.3	1863/0,0	F: CGACAACAACCAGGCTTATCA	61,06	124 pb	90	0,992
					R: TCCTCTTGCTCCTCAATGCA	60,93			
<i>EgrDDM1</i>	<i>Nucleosome Remodeler 1</i>	Eucgr.I02455.1	NM_126073.2	942,2/0,0	F: ACAAGAGGGTCCAAATGAAGAA	59,98	100pb	90	0,999
					R: CAACTTCCACCAGTCAACAAG	59,67			
<i>SAND</i>	<i>SAND protein</i>	Eucgr.B03031.1	NM_128399.3	2213/0,0	F: CGTGTATGTCATGGGTGAAAG	60,28	86	100	0,999
					R: TAGCAGGCAATACATCACCAAG	60,15			
<i>PP2A-3</i>	<i>Phosphatase Subunit 2A-3</i>	Eucgr.B03386.1	NM_129811.3	3301/0,0	F: TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT	60,10	124	99	0,997
					R: GTCCTTTCTTCTCCGAGAGCAC	61,78			
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>Elongation fator 1<math>\alpha</math></i>	Eucgr.B02473.1	NM_001203500.1	2587/0,0	F: TGCTTTGCTCGCTTCACTC	61,77	100	98	0,994
					R: TTCATCGTACCTTGCTTGG	61,02			

(E) – Eficiência de amplificação dos pares de *primers*, em %

(R)- Coeficiente de regressão da curva padrão obtida.

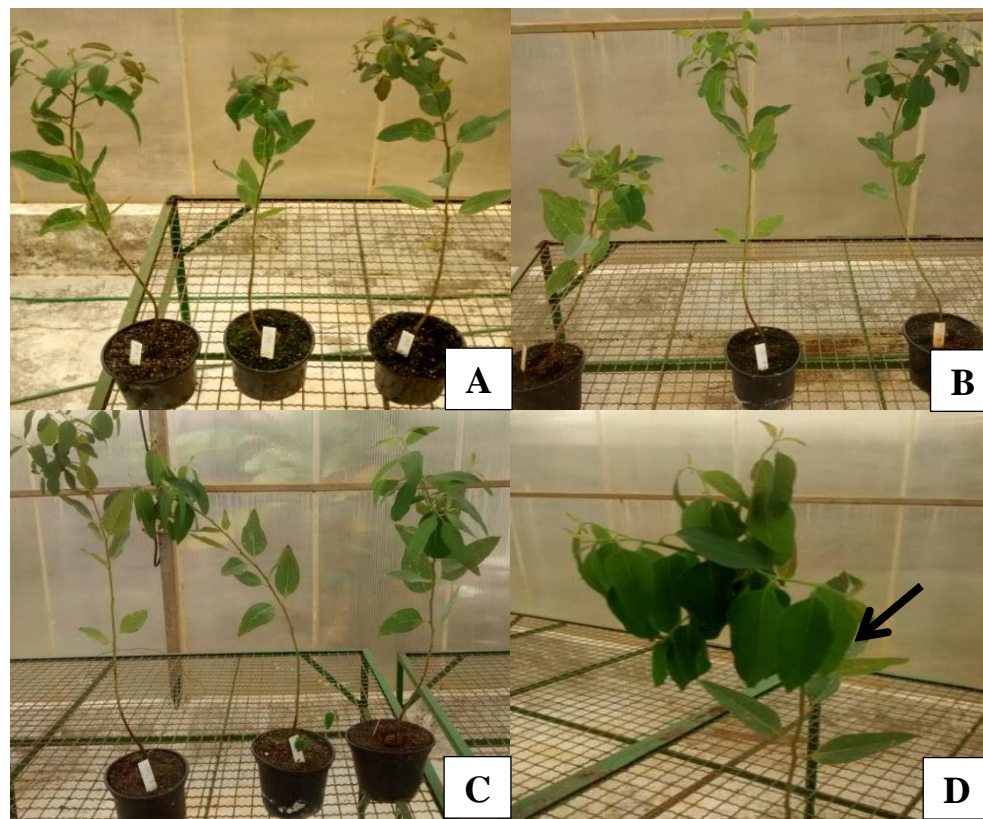


Figura 1. Padrão das mudas do clone VM01 nos diferentes dias de déficit hídrico. A: Mudas do VM01 no 5º dia de seca; B: Mudas no 10º dia de seca; C: Mudas no 15º dia de seca; D: Sintoma de murcha das folhas (Seta preta) das mudas após 15 dias de análise.

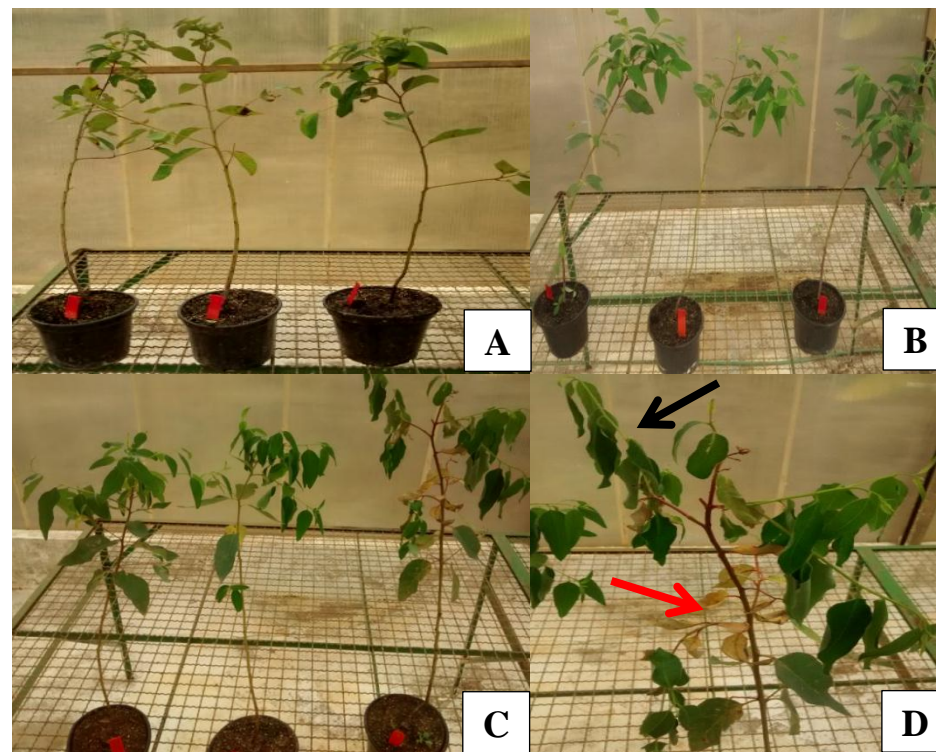


Figura 2. Padrão das mudas do clone VM05 nos diferentes dias de estresse hídrico. A: Mudas do VM05 no 5º dia de seca; B: Mudas no 10º dia de seca; C: Mudas no 15º dia de seca; D: Sintoma de murcha (Seta preta) e senescência (Seta vermelha) nas folhas após 15 dias de análise.

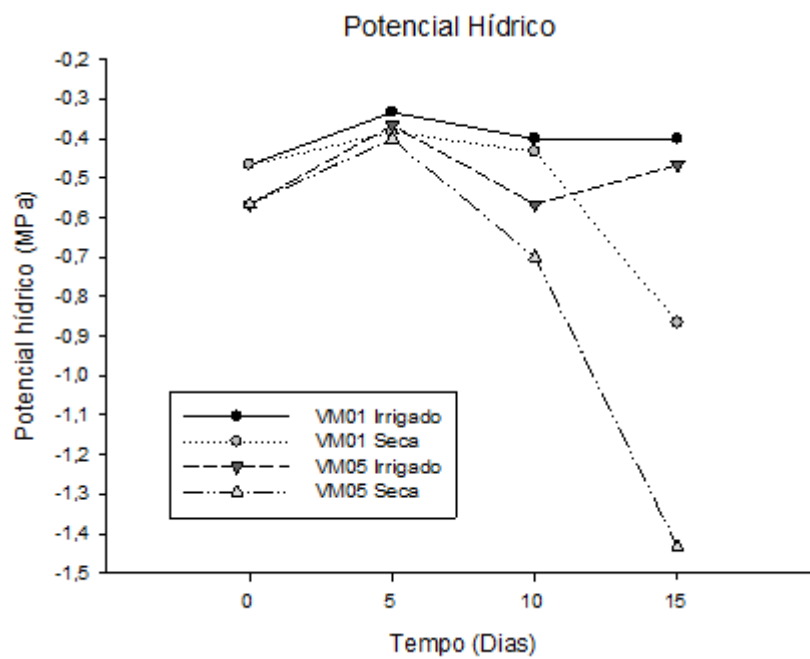


Figura 3. Análise do potencial hídrico dos clones VM01 e VM05 submetidos às condições de seca e irrigação em função do tempo (Dias).



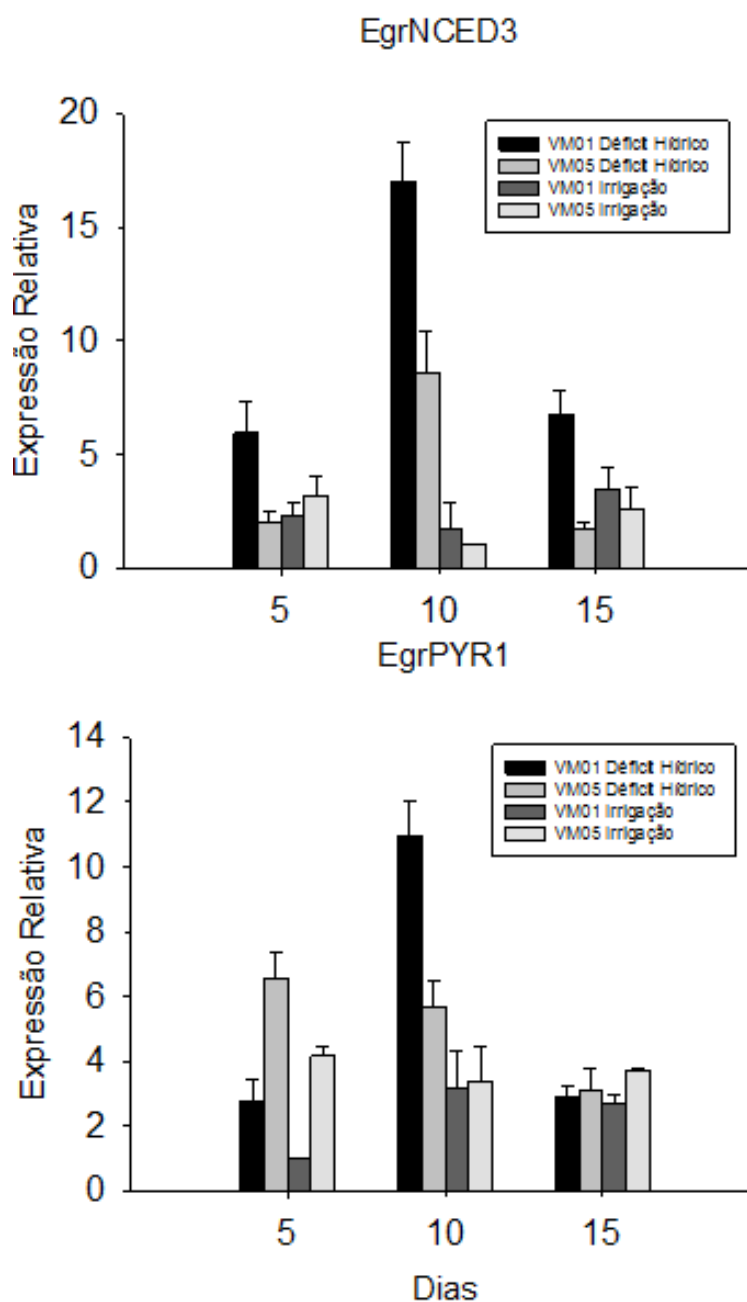


Figura 4. Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, dos genes *EgrNCED3* e *EgrPYR1*, em razão dos dias de análise (5, 10 e 15 dias). As barras correspondem ao clone avaliado (VM1 ou VM5) e a condição (Déficit hídrico ou Irrigação). Controle endógeno: *SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* . Calibradores: *EgrNCED3*- amostra VM5 Irrigado 15 dias; *EgrPYR1* – amostra VM1 Irrigado 5 dias.

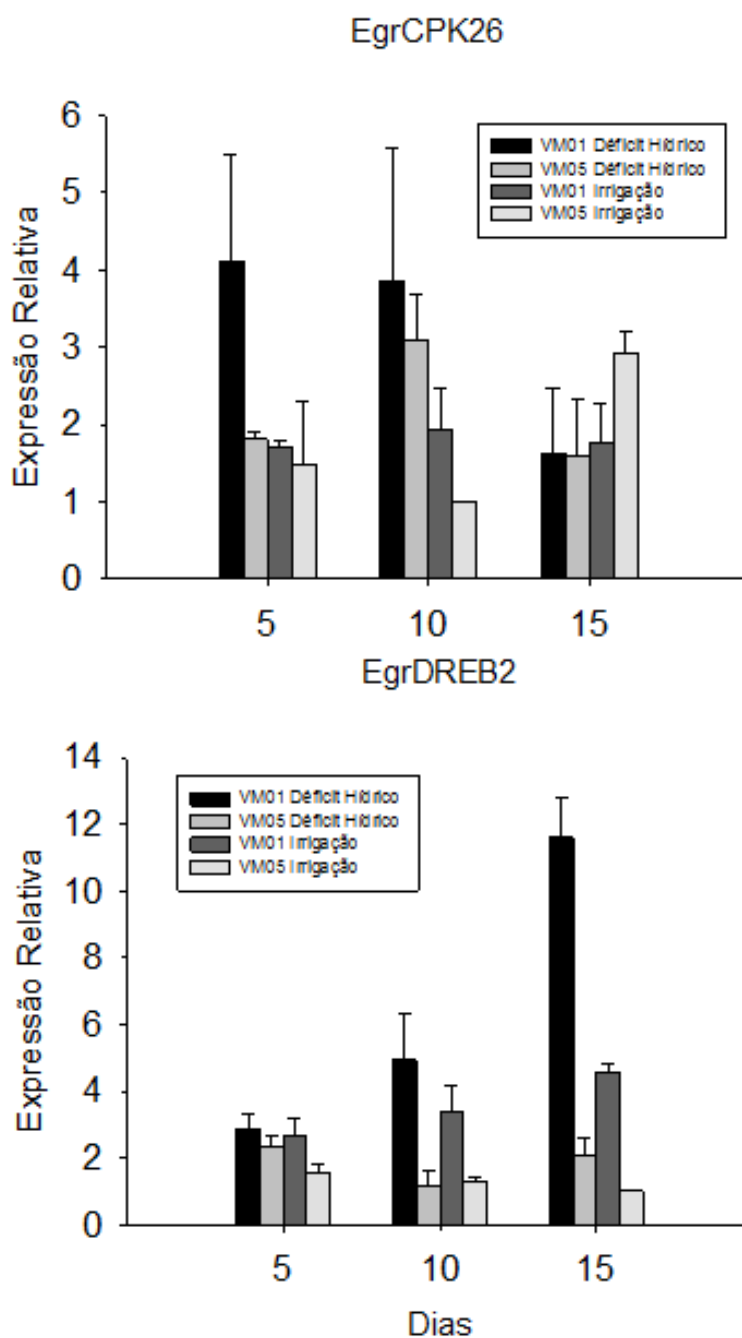


Figura 5. Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, dos genes *EgrCPK26* e *EgrDREB2*, em razão dos dias de análise (5, 10 e 15 dias). As barras correspondem ao clone avaliado (VM1 ou VM5) e a condição (Déficit hídrico ou Irrigação). Controle endógeno: *SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* . Calibradores: *EgrCPK26* – amostra VM5 Irrigado 10 dias; *EgrDREB2* – amostra VM5 Irrigado 15 dias.

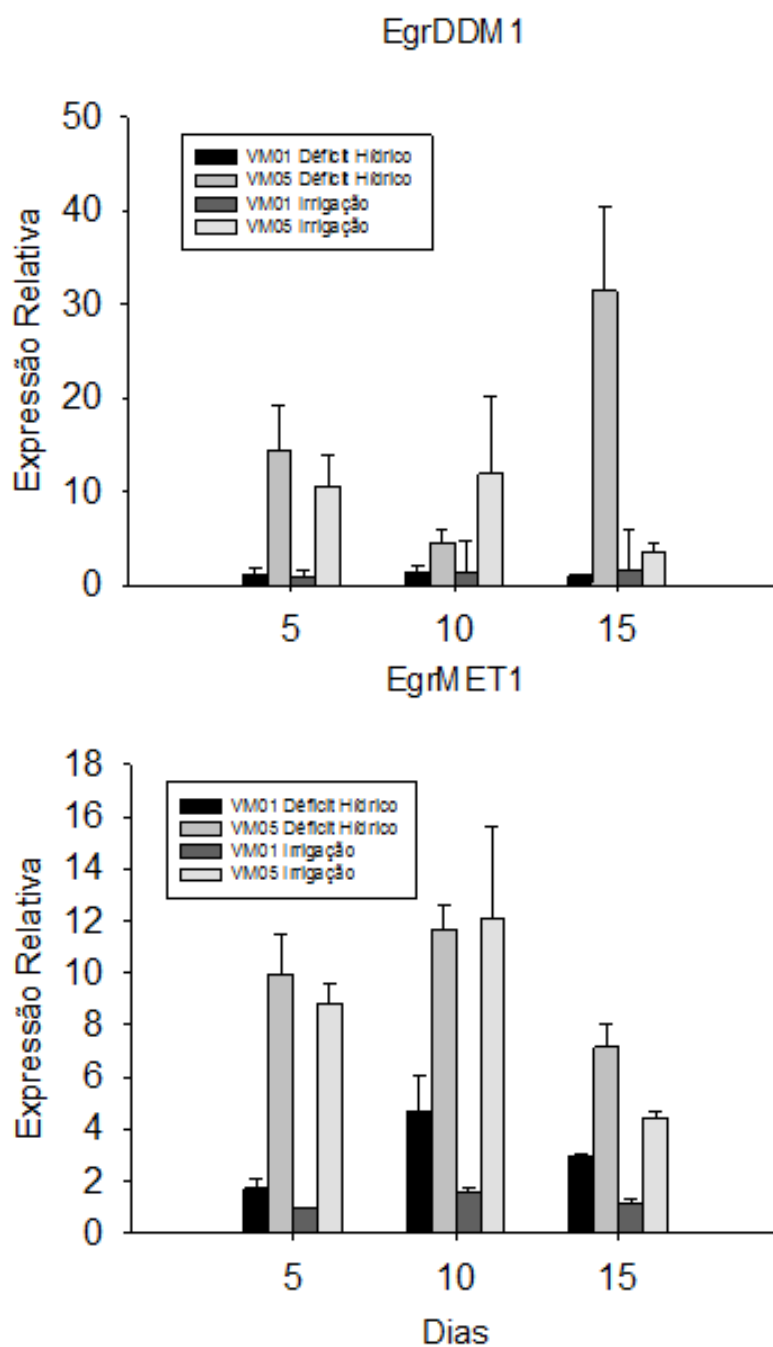


Figura 6. Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, dos genes *EgrDDM1* e *EgrMET1*, em razão dos dias de análise (5, 10 e 15 dias). As barras correspondem ao clone avaliado (VM1 ou VM5) e a condição (Déficit hídrico ou Irrigação). Controle endógeno: *SAND*, *PP2A-3* e *EF-1 $\alpha$* . Calibradores: *EgrDDM1* – amostra VM1 Seca 15 dias; *EgrMET1* – amostra VM01 Irrigado 5 dias.

**ARTIGO 3:** Efeito da expressão do gene *OsCPK5* na tolerância do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* ao déficit hídrico

## **EFEITO DA EXPRESSÃO DO GENE *OsCPK5* NA TOLERÂNCIA DO HÍBRIDO *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* AO DÉFICIT HÍDRICO**

### **RESUMO**

Devido ao grande impacto do déficit hídrico nas plantações de eucalipto, o desenvolvimento de genótipos mais adaptados torna-se cada vez mais necessário. Por mais que o melhoramento genético florestal tenha uma grande contribuição para a aquisição de plantas mais produtivas e adaptadas aos diferentes estresses ambientais, este procedimento está sujeito a certas limitações que podem ser minimizadas com abordagens biotecnológicas. A transformação genética possibilita a inserção de uma única sequência de interesse no genoma da planta, tornando possível desde a caracterização funcional do gene inserido até a aquisição de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes ao déficit hídrico. Este trabalho teve como objetivo a transformação genética do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* visando a obtenção de plantas transgênicas tolerantes ao déficit hídrico, mediante a inserção do gene *OsCPK5* em seu genoma. Este gene pertence a família de proteínas kinase CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinase*) e está relacionado com o reconhecimento do íon  $Ca^{2+}$ , um mensageiro secundário em plantas sob condições de seca, e o fechamento estomático. Além da transformação genética, este trabalho avaliou o impacto da inserção do gene *OsCPK5* na expressão de outros genes estresse responsivos (*EgrDREB2*, *EgrCPK26*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1*). Utilizando o sistema de *Agrobacterium tumefaciens* e o método de infecção de infiltração a vácuo, obteve-se uma eficiência de transformação de 3,75%. Posteriormente, dois eventos transformantes (Pt3 e Pt6) foram submetidos a estresse induzidos por PEG6000, demonstrando diferença na expressão dos genes estresse-responsivos analisados quando comparados com plantas não transformadas.

## INTRODUÇÃO

As espécies e híbridos comerciais de *Eucalyptus* apresentam uma importância econômica muito grande por ser matéria prima de diversos produtos. Dentre os híbridos comerciais, o *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* é um dos mais utilizados e conhecidos no setor florestal e industrial, no qual reúne as características do *E. grandis* (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação e resistência a doenças, particularmente ao fungo, *Cryphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto) (CIB, 2008; PINTO et al., 2014).

Em razão da alta demanda por produtos oriundos das espécies e híbridos comerciais de *Eucalyptus* e diante dos estresses ambientais impactantes, há a necessidade constante de obter genótipos ainda mais produtivos e adaptados aos diferentes estresses (TEULIERES e MARQUE, 2007). Porém, a aquisição de plantas superiores através do melhoramento genético convencional de *Eucalyptus* enfrenta algumas limitações, como ciclos de vida relativamente longos, altos níveis de heterozigose e a transferência de caracteres indesejados, fazendo com que o melhoramento genético necessite de abordagens adicionais para superar estas dificuldades (GIRIJASHANKAR, 2011; MACHADO et al., 1997).

A transformação genética possibilita a transferência de um único gene de interesse entre espécies e até reinos diferentes. Por meio desta técnica é possível realizar estudos de caracterização funcional de genes relacionados a produção de madeira, tolerância aos estresses ambientais e obter organismos transgênicos apresentando características de interesse agrônomo para fins de produtividade. Até o momento, o foco principal da transformação genética em *Eucalyptus spp.* é o aumento da biomassa e produção de madeira (SHINYA et al., 2014; SPOKEVICIUS; TIBBITS; BOSSINGER., 2007; TORRE et al., 2014). Poucos estudos, a respeito de genes relacionados à resposta ao déficit hídrico e obtenção de plantas transgênicas tolerantes ao déficit hídrico foram realizados (KONDO et al., 2003; ISHIGE et al., 2004).

O déficit hídrico é uma das condições ambientais que mais afetam a produtividade do eucalipto, podendo diminuir mais de 25% do incremento anual da madeira (STAPE et al., 2010). Esta queda é uma consequência dos danos fisiológicos e morfológicos sofridos pela planta em condições de estresse severo, como a diminuição da eficiência do aparato fotossintético, menor síntese de assimilados, menor metabolismo de carboidratos, entre outros (BARTELS e SUNKAR, 2005). Para adaptarem as condições de déficit hídrico, todas as plantas apresentam mecanismos de resposta mediados por sinalizações moleculares sistêmicas. Os principais mecanismos de sinalização identificados são os regulados por ABA (ABA-dependente), os independentes de ABA e os mensageiros secundários (SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013).

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  é conhecido por atuar como mensageiro secundário na sinalização da planta em estresse hídrico. Em condições de déficit hídrico, o nível de cálcio intracelular e dentro de algumas organelas, como o retículo endoplasmático e no núcleo, aumentam consideravelmente. Proteínas da família multigênica CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinase*), que reconhecem esse aumento de cálcio intracelular, apresentam em sua estrutura um domínio N-terminal variado, um domínio kinase e um domínio ativo de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAD) (LIESE e ROMEIS, 2013; SHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013). O cálcio se liga ao domínio CAD das proteínas CPK, mudando a conformação no sentido de expor o domínio kinase para a ativação de genes, fatores de transcrição, canais iônicos e proteínas estresse-responsivas (LAANEMETS et al., 2013).

Vários genes da família CDPK já foram identificados e descritos através da caracterização funcional em plantas de *Arabidopsis thaliana* (BOUDSOCQ et al., 2010; FRANZ et al., 2011) e *Oryza sativa* (YE et al., 2009; WAN; LIN; MOU, 2007), demonstrando uma diversidade de funções ligadas a sinalização e defesa destas plantas sob estresse hídrico. Dentre eles, o gene *AtCPK6*, ortólogo do gene *OsCPK5* em arroz, participa da ativação de canais iônicos de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , relacionados a fechamento estomático, participa também da produção de prolina e no controle da biossíntese de

Espécies reativas de oxigênio (BOUDSOCQ e SHEEN, 2013; XU et al., 2010).

A superexpressão do gene *AtCPK6* em mudas de *Arabidopsis* cisgênicas induziu uma maior tolerância ao déficit hídrico, ressaltando o impacto deste gene na cascata de resposta a seca. Neste trabalho objetivou-se verificar o efeito da expressão do gene *OsCPK5* na tolerância do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* ao déficit hídrico. Paralelamente, foi avaliado o impacto deste gene na expressão de outros genes (*EgrNCED3*, *EgrPYR1*, *EgrDREB2* e *EgrCPK26*) relacionados com resposta a déficit hídrico, em plantas sob condições de estresse induzido por PEG6000.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Para a obtenção do material vegetal, segmentos nodais e gemas apicais *in vivo* provenientes de mudas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* foram desinfestados utilizando pastilhas de paraformoladeído durante 45 minutos. Após esse intervalo, os explantes foram imersos em água destilada autoclavada contendo 5 ml de ácido cítrico para evitar a oxidação. Em seguida, meristemas foram excisados e inoculados em placas de petri contendo o meio MS basal. Os explantes permaneceram em contato com o meio durante 5 dias no escuro. Em seguida, foram transferidos para meios de multiplicação suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,7g L<sup>-1</sup> de phytigel como agente gelificante, para a micropropagação de plantas *in vitro*.

### **Vetor binário e cepa de *Agrobacterium tumefaciens***

O vetor binário utilizado para a transformação genética p7i2x (Figura 1A), disponibilizado pela Embrapa Arroz Feijão, contém um cassete gênico representado por um promotor da Ubiquitina, o gene *OsCPK5*, um



terminador NOS-T e o gene marcador de seleção de plantas *Bar*, o qual confere resistência ao herbicida Fosfinotricina (PPT), flanqueado pelo promotor constitutivo 35-S e o terminador E9 (Figura 1B). Este vetor binário também apresenta o gene de resistência aos antibióticos Espectinomicina e Estreptomicina utilizados para a seleção das bactérias transformadas. Através do método de eletroporação, o plasmídeo foi inserido na cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

### **Curva de Mortalidade do herbicida Fosfinotricina (PPT)**

Para a indução de calos organogênicos, 350 ápices caulinares foram excisados de plantas propagadas *in vitro* com 30 dias de idade. Esses ápices foram inoculados em meios de cultura suplementados com sais MS modificado contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar como agente gelificante. O sub-cultivo foi realizado em um intervalo de 15 dias em meio de indução totalizando 30 dias para a formação de calos organogênicos na ausência de luz. Após este período, os 350 calos foram transferidos para meios de regeneração suplementados com sais MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, auxina, citocinina e 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar como agente gelificante. Nesta etapa diferentes concentrações do herbicida fosfinotricina PPT (FINALE<sup>®</sup>) foram adicionadas ao meio de cultura de regeneração (0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 mg L<sup>-1</sup> e ausência de PPT), correspondendo a sete tratamentos com 5 repetições contendo 10 calos por pote. Os calos em toda a fase de regeneração sofreram sub cultivos de quinzenais em meios com a mesma composição. Os calos permaneceram em salas de cultivo com fotoperíodo de 16 - 8h à 27°C, durante todo o experimento.

Após 30 dias na fase de regeneração na presença do herbicida, todos os calos foram transferidos para um novo meio com a mesma composição, mas desta vez na ausência de herbicida para observar a ocorrência de efeito residual nos tecidos vegetais.

Para a avaliação do experimento, foram contabilizadas as plantas regeneradas e os calos sobreviventes. Uma segunda avaliação foi feita contabilizando as mesmas variáveis após o efeito residual. Através do

programa estatístico SISVAR versão 5.3 por meio de ANAVA, o experimento foi analisado por análise de regressão polinomial.

### **Preparo do explante e transformação genética via *A. tumefaciens***

Para a transformação genética do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium tumefaciens*, 550 ápices caulinares foram induzidos, em meio de cultura suplementados com sais MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, auxina, citocinina e 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar como agente gelificante, para a formação de calos organogênicos. Os explantes permaneceram 10 dias, no escuro, até o momento da infecção.

Bactérias (cepa LBA4404) cresceram, primeiramente, em meio LB líquido contendo os antibióticos específicos para a seleção das cepas transformadas (Espectinomicina 100µg/mL e Estreptomicina 300µg/mL – concentrações no meio de cultura). Momentos antes à infecção, as bactérias foram centrifugadas a 4500 g por 10 minutos. Em seguida, o pellet, contendo as bactérias, foi ressuspensionado com o meio de indução de organogênese líquido (sem agente gelificante) acrescidos de 100 µM de acetoseringona, atingindo uma Densidade Ótica de 0,45.

Após 10 dias em meio de indução, os calos foram transferidos para erlenmeyers contendo 10 mL da solução com as bactérias (OD = 0,45) realizando assim a infiltração através de uma câmara de vácuo (400 mmHg por 4 minutos). Ao todo, 500 calos passaram pelo processo de transformação, de modo que 100 não tiveram contato com a bactéria (Controle de Infiltração) e os outros 50 calos foram normalmente sub cultivados para meios de indução (Controle Total).

Após a secagem dos calos em papel filtro, estes foram inoculados em um novo meio de indução sólido, mas acrescido de 100 µM de Acetoseringona, para a fase de co-cultivo durante 5 dias no escuro. Para a eliminação das bactérias, um subcultivo foi realizado para outro meio de indução contendo 500 mg/L de Tioxin<sup>®</sup> permanecendo por 15 dias em salas de cultivo com temperatura de 26°C ± 2 na ausência de luz.

### **Regeneração de plantas e seleção através do herbicida PPT**

Os calos foram transferidos para um meio de cultura suplementado com sais MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, auxina, citocinina e 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar como agente gelificante para a regeneração das plantas via organogênese indireta. Para a seleção dos eventos transformantes, o meio de cultura apresentou, inicialmente, 0,8 mg.L<sup>-1</sup> do herbicida fosfinotricina (PPT FINALE<sup>®</sup>). Os calos sofreram sub cultivos a cada 15 dias para meios de regeneração com a mesma concentração de herbicida, mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26°C ± 2 e luminosidade de 35 µM fótons/m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Posteriormente, os calos contendo plantas regeneradas foram transferidos para meios de regeneração contendo doses crescentes do herbicida até a concentração de 1,6 mg.L<sup>-1</sup>.

As plantas que sobreviveram a fase de seleção foram isoladas e inoculadas em meios de multiplicação, suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, citocinina, auxina, 1,7g L<sup>-1</sup> de phytigel como agente gelificante e 0,6 mg.L<sup>-1</sup> herbicida fosfinotricina.

### **Confirmação por PCR convencional**

Após a extração do DNA das plantas sobreviventes, de acordo com o protocolo do tampão CTAB, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) contendo 1 U de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polimerase (Promega<sup>®</sup>), tampão 5 X, 0,6 mMol.L<sup>-1</sup> dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 1µM de *primer* do gene e 3,33 ng/µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf<sup>®</sup> Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 15 minutos, 40 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 94 °C, por 30 segundos; 64°C por 1:30 minutos; 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os primers específicos para o gene *OsCPK5* foram: F-GATGCTCACCTGTTGTTG / R-GCTGGCGAAGTACTTGGATCT.

O resultado da PCR foi visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (80 mL TAE, 0,8g agarose e 0,8 $\mu$ L de Brometo de Etídio) sob uma voltagem de 80V.

### **Experimento de estresse induzido (PEG6000)**

A partir do resultado da PCR, dois eventos transformantes (Pt3 e Pt6) foram selecionados para o experimento de estresse induzido por Polietilenoglicol 6000. Para tal, plantas que não passaram pelo processo de infecção (Controle) e os eventos Pt3 e Pt6 foram microporpagadas *in vitro* em meio de multiplicação, suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, citocinina, auxina, 1,7g L<sup>-1</sup> de phytigel como agente gelificante, até atingirem 45 plantas de cada evento. Em seguida, todas as plantas permaneceram em meios de enraizamento durante 40 dias.

Posteriormente, metade das amostras (Controle, Pt3 e Pt6) foram cultivadas em condições normais, somente com meio MS basal, e a outra parte sob condição de estresse induzido, com meio MS basal acrescido de 300 g.L<sup>-1</sup> de PEG600 à 27°C, mimetizando um potencial hídrico de -1MPa. Em ambas as condições as amostras continham duplicata biológica, coletadas em dois tempos diferentes (48 e 72 horas). O tempo 0 foi o mesmo para as amostras sob condições normais e estresse induzido. Cada duplicata biológica foi representada por três plantas. Todos os meios de cultura ficaram imersos em Vermiculita. Após a coleta as plantas foram armazenadas em ultra freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA.

### **Extração de RNA e síntese do cDNA**

O RNA das plantas foi extraído através do protocolo do fabricante *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)*. Todas as amostras foram tratadas com o *Kit Turbo DNA-free (Ambion)* para a remoção do DNA genômico presente na amostra. A quantidade e pureza do RNA foram mensuradas em *Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*. O *Kit High-*

*Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1000 ng de RNA.

### **Desenho e eficiência dos Primers**

Utilizando a plataforma Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>) os genes de interesse foram encontrados através do alinhamento de sequências ortólogas de *Arabidopsis thaliana* contra o genoma e proteoma do *Eucalyptus grandis*. Os genes avaliados neste trabalho foram o *EgrCPK26 (Calcium-Dependent Protein Kinase)*, *EgrDREB2 (DRE-Binding Protein 2)*, *EgrNCED3 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3)*, *EgrPYR1 (Pyrabactin Resistance1)* (Tabela 1). Os genes de referência utilizados para a normalização foram os *SAND* e *IDH*, selecionados a partir de estudos anteriores com o mesmo genótipo trabalhado (MOURA et al., 2012). Após a escolha dos genes, de acordo com os resultados do alinhamento, os primers foram desenhados através do programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen). Os parâmetros utilizados para o desenho dos primers foram: tamanho do primer (18 a 23), conteúdo GC (40 a 60%), Tm dos primers (58 a 64°C) e o tamanho do amplicon (80 a 130pb). A qualidade destas sequências foi verificada, primeiramente, *in silico* através do programa OligoAnalyser™ IDT.

Para a eficiência dos primers, foi feito um pool de cDNA contendo amostras controle e dos dois eventos transformantes, seguido de uma diluição seriada com um fator de diluição de cinco vezes. Após uma RT-qPCR, a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foram verificados (Tabela1).

### **RT-qPCR e análise dos dados**

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *ABI Fast7500 System (Applied Biosystems)* em um volume total de 10  $\mu$ L contendo 1  $\mu$ L de cDNA diluição 1:5, 5  $\mu$ L de 1X *SYBR® Green (Applied Biosystems)* e 0,2  $\mu$ M de *primers*. As amplificações ocorreram durante 10

minutos a 95°C, 5 segundos de 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 60°C. Após os 40 ciclos, curvas de dissociação (*Melting curve*) foram verificadas para confirmar a especificidade dos *primers*, por aquecimento de 60°C para 95°C. Todas as reações foram realizadas contendo triplicata biológica e técnica, incluindo amostra interensaio.

Os níveis de expressão dos genes foram determinados a partir dos valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos automaticamente pelo valor limiar de fluorescência do programa 7500 versão 2.0.5 (*Applied Biosystems*). Os gráficos de expressão foram construídos através do programa *SigmaPlot* versão 11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Curva de Mortalidade do herbicida Fosfinotricina (PPT)

O herbicida fosfinotricina demonstrou afetar diretamente a regeneração de plantas em calos organogênicos (Figura 2). Foi observada uma quantidade de plantas inversamente proporcional ao aumento da concentração do herbicida no meio de cultura. Isso pode ser explicado devido à inibição da enzima glutamina sintetase, comprometendo a eficiência do sistema fotossintético, aumentando a concentração de  $\text{NH}_4^+$  e diminuindo o conteúdo de glutamina, glutamato, aspartato, asparagina, serina e glicina na planta, podendo leva-la à morte (WENDLER; BARNISKA; WILD, 1990; BARBERIS, 2012;).

Em ambas as avaliações o padrão da curva de regressão foi semelhante, demonstrando uma diminuição da regeneração de plantas inversamente proporcional com o aumento da concentração. Na primeira avaliação, foi observado plantas regeneradas em todos os tratamentos, exceto pela concentração de 6,4 mg.L<sup>-1</sup>(Figura 3). A obtenção de plantas através de calos organogênicos não foi tão afetada sob concentrações baixas de 0,2 e 0,4 mg L<sup>-1</sup> de herbicida em ambas as coletas. Entretanto, a partir de 0,8 mg.L<sup>-1</sup> a regeneração de plantas diminuiu com a ação do ppt. Na segunda

avaliação, os calos que estavam em contato com as três concentrações mais altas não regeneraram plantas, sugerindo um forte efeito residual.

Na primeira avaliação, nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 mg.L<sup>-1</sup> foi observado uma alta sobrevivência dos calos. Ao realizar a segunda avaliação, de acordo com a análise de regressão, a concentração estimada de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> demonstrou uma sobrevivência de 50% além da baixa taxa de regeneração, enquanto com a concentração de 1,6 mg.L<sup>-1</sup> houve uma alta mortalidade, provavelmente, devido ao forte efeito residual do herbicida (Figura 4). De acordo com a taxa de regeneração, taxa de sobrevivência e o efeito residual das diferentes quantidades de herbicida, decidiu-se utilizar um gradiente de concentração no decorrer do experimento, iniciando com 0,8 mg.L<sup>-1</sup>, seguido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e finalmente, uma maior concentração 1,6 mg.L<sup>-1</sup>.

### **Confirmação e eficiência de transformação**

O número de calos sobreviventes, tanto do controle infiltração quanto dos calos transformados, após a etapa de infecção apresentou um decréscimo em razão do estresse causado pelo processo e no caso dos calos transformados pela contaminação com a bactéria *A. tumefaciens* (Tabela 2). Em seguida, os calos do controle infiltração e os calos transformados passaram por um processo seletivo, na presença do herbicida. Este procedimento promoveu morte de todos os calos do controle infiltração e 30% dos calos transformados. Nos calos sobreviventes, somente 21 plantas regeneradas sobreviveram ao processo seletivo, sendo estas isoladas e micropropagadas até a confirmação por PCR.

De acordo com o resultado da PCR, somente 15 das plantas sobreviventes foram consideradas transformadas, devido a amplificação de um fragmento específico de 100 pb. A eficiência foi calculada a partir da quantidade de calos organogênicos iniciais. Neste caso observa-se uma eficiência no processo de transformação foi de 3,75%.

Em todos os trabalhos de transformação genética de *Eucalyptus spp.* é observado uma eficiência de transformação baixa quando comparado com

outras espécies. Dibax et al.(2010) verificaram uma baixa eficiência de transformação, por volta de 0,5%, na espécie *E. saligna*. Uma eficiência de 1,46% na transformação do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* através do método de infecção à vácuo foi constatada (BALIEIRO, 2013).

### **Estresse induzido por PEG 6000**

O PEG (polietilenoglicol) tem sido utilizado com sucesso em trabalhos de pesquisa para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas em razão da capacidade do PEG 6000 de diminuir o potencial do meio levando a menor absorção de água pela planta. Além disso, o PEG não penetra nas células, não é degradado e não causa toxidez nos tecidos vegetais (HASEGAWA et al., 1984). Na literatura é encontrado estudos de identificação de genes diferentemente expressos (LIU et al., 2014), estudos fisiológicos (TENG et al., 2014) e germinação de sementes (MARAGHNI; GORAI; NEFFATI, 2010.) os quais utilizam PEG6000 para inferir o impacto do déficit hídrico.

Todas as plantas submetidas ao estresse induzido por PEG6000 demonstraram sintomas de murcha no decorrer do tempo avaliado (Figura 6). Pouca diferença visual nos sintomas foi observada entre as plantas transformadas e as plantas controle, com uma ligeira condição melhor de turgor para o evento Pt3.

### **Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

#### **Eficiência dos primers**

A partir da inclinação da curva padrão para cada par de *primers*, foram obtidos valores do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e eficiência (E) (Tabela 1). A eficiência dos primers referentes aos genes de interesse variou entre 96,8 e 100%, enquanto que a eficiência dos dois pares de primers dos genes de referência foram 100% (*SAND*) e 92% (*IDH*). Curvas de



dissociação foram obtidas após cada reação demonstrando pico único para todos os genes avaliados.

### **Expressão do gene *OsCPK5***

A expressão de *OsCPK5* não foi detectada nas amostras via RT-qPCR, no entanto, os cDNAs das plantas Pt3 e Pt6 quando submetidas a PCR convencional apresentaram amplificação do tamanho esperado (100 pb) demonstrando que a expressão de *OsCPK5* nas plantas transformadas ocorre em nível basal, não sendo detectável até o 40 ciclos em PCR em tempo real (dados não apresentados). Uma possível explicação para a expressão muito baixa de *OsCPK5* é a inserção do gene em regiões de pouca expressão ou em razão do baixo reconhecimento do promotor Ubi-int pela maquinaria de transcrição da planta. Estudos demonstraram que, apesar da expressão de genes repórteres contendo o promotor da Ubiquitina em monocotiledóneas ser alta, a expressão do gene contendo o mesmo promotor não foi relativamente baixa em dicotiledóneas, com exceção da sequência truncada do promotor Ubi (PHILIP et al., 2013).

### **Expressão gênica das plantas sob estresse induzido**

O primeiro gene analisado (*EgrCPK26*) é o ortólogo do *OsCPK5* utilizado na transformação genética. Ambos pertencem à mesma família multigênica CDPK, os quais desempenham importantes papéis na resposta da planta ao déficit hídrico. As proteínas CPK reconhecem o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e em organelas ligando-se a este íon, em razão ao estresse hídrico. Como resultado, a proteína sofre uma modificação conformacional com objetivo de expor o domínio kinase, ativando proteínas, fatores de transcrição e canais iônicos estresse-responsivos (KUDLA et al., 2010; LIESE e ROMEIS, 2013).

O perfil de expressão do gene *EgrCPK26* em ambos os eventos transformantes foi semelhante em todas as condições analisadas (Figura 7). No tempo 0, 48 e 72 horas em meio MS basal sem o estresse induzido houve

uma crescente expressão em razão do tempo, enquanto que as plantas controle não apresentaram este padrão, embora tenham demonstrado uma expressão alta. Em meio MS + PEG, as plantas transformadas tiveram uma expressão mais alta no tempo de 48 horas decaindo no tempo 72 horas, enquanto que nas plantas controle foi verificada uma expressão menor em estresse induzido. Em estudos com o gene ortólogo *AtCPK6*, em plantas de *A. thaliana*, mostraram a atividade da proteína codificada em vários processos. Além de participar da ativação dos canais iônicos de  $K^+$  tipo *SLAC1* (*Slow-type Anionic Channels*), na produção de osmólitos e no controle de ERO, a proteína *AtCPK6* também participa da ativação de canais iônicos de  $Ca^{2+}$  (MORI et al., 2006; XU et al., 2010). A alta expressão do gene *EgrCPK26* nas plantas transformadas sobre estresse induzido pode ser explicada devido a presença da proteína *OsCPK5* nas plantas de eucalipto e a consequente maior ativação de canais iônicos de  $Ca^{2+}$ , aumentando o nível deste íon no citosol das células. Com este aumento, a expressão do gene endógeno *EgrCPK26* é induzida em plantas transformadas.

Nos tratamentos em que as plantas transformadas e controle permaneceram em meio MS basal, o padrão de expressão do gene *EgrDREB2* foi semelhante em todas as amostras, uma alta expressão no dia 0 e um decréscimo nos tempos posteriores, com exceção da amostra Pt6 MS em 48 horas (Figura 7). Já nos tratamentos na presença do PEG as plantas controle apresentaram uma alta expressão em 48 horas decaindo a 72 horas, enquanto que em ambas as plantas transformadas foi observado o oposto, uma menor expressão do gene em 48 horas aumentando posteriormente. Os fatores de transcrição *DREB*, pertencentes à família *ERF* (*Ethylene Responsive Element Binding Factors*), são conhecidos por reconhecer sequências *DRE* (*Dehydration responsive element*) nas regiões promotoras e induzir a expressão de genes estresse-responsivos, como os genes *LEA*, deidrinas, biossíntese de osmoprotetores e enzimas antioxidantes (KHAN, 2011; MATSUKURA et al., 2010). Alguns destes fatores de transcrição participam das rotas independentes da sinalização do ABA, como o *DREB2*. A expressão do *DREB2* é induzida principalmente devido a percepção do estresse osmótico, contudo, estudos recentes demonstraram que a

concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  interfere na atividade destas fatores de transcrição, inferindo a indução de modificações conformacionais nas proteínas (WHALLEY et al., 2011). Em razão ao aumento de expressão do gene *EgrDREB2* nas plantas transformadas e o decréscimo nas plantas controle, infere-se que com a atividade do gene inserido *OsCPK5* na ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , o aumento deste íon no citosol e no núcleo interferiu na expressão e na atividade do gene *EgrDREB2*.

O gene *NCED3* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3*) está diretamente relacionado com a quantidade de ABA sintetizado, por participar de uma das reações na biossíntese deste fitohormônio. Na literatura verificara-se que a maior expressão do gene *NCED3* induz a maior produção de ABA e maior tolerância das plantas ao déficit hídrico (ENDO et al., 2008; ZHANG et al., 2008). Neste estudo, foi observado uma maior expressão do gene *EgrNCED3* nas plantas transformadas somente em condições sem estresse, quando comparadas com as plantas controle. Nas amostras Pt3 e Pt6 não submetidas ao estresse, foi observado uma elevada atividade do gene *EgrNCED3* em 48 horas e, em seguida, um decréscimo da expressão (dados do Pt6 a 48 horas não disponível). Já na presença do PEG as plantas apresentaram níveis basais de expressão. Em razão do perfil de expressão diferente entre as plantas transformadas e as plantas controle, infere-se que a presença do gene *OsCPK5* modifica a atividade do gene *EgrNCED3* e a biossíntese de ABA, consequentemente.

O ABA, ao ser sintetizado pela planta, em condições de déficit hídrico, é reconhecido pelo complexo *PYR/PYL/RCAR* (*Pyrabactin Resistance / PYR1-like/ Regulatory Component of ABA Receptor*). Após se ligar ao ABA este complexo possibilita a ativação da cascata ABA-dependente e a ativação de genes estresse-responsivos. O gene *EgrPYR1* é ortólogo do *AtPYR1* em *A. thaliana*, o qual codifica uma proteína integrante do complexo receptor do ABA (MEHROTRA et al., 2014; YOSHIDA, 2015). A expressão do gene *EgrPYR1* acompanha o perfil do gene *EgrNCED3* em todos os tratamento e amostras. Em ambas as plantas transformadas a expressão apresentou um decréscimo acentuado de 48 a 72 horas em meio MS basal. Ao contrário das plantas controle que mantiveram

uma expressão elevada em ambos os tempos. Já nos tratamentos com PEG, todas as plantas apresentaram uma expressão basal quando comparadas com as plantas do tratamento com meio MS. Somente a planta controle no tempo de 48 horas em PEG demonstrou uma expressão mais alta do que as demais.

## CONCLUSÃO

Através da transformação genética, via *A. tumefaciens*, de calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* foi possível inserir com sucesso o gene *OsCPK5*, obtendo plantas transgênicas. A presença do gene exógeno demonstrou afetar a expressão dos genes analisados (*EgrCPK26*, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrPYR1*). Contudo, novos estudos são necessários para verificar a tolerância das plantas transformadas sob déficit hídrico.

## REFERÊNCIAS

- BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BARBERIS, L.R.M.; **Metodologia para determinação de efeitos fisiológicos e metabólicos do glufosinato em soja**. 2012, 75p. Tese (Doutorado em Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP, Botucatu, 2012.
- BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, Bonn, v.24, n.1, p.23-58. 2005.
- BOUDSOCQ, M., et al. Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. **Nature**, Massachusetts, v.464, n.7287, p.418-422. 2010.
- BOUDSOCQ, M., SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. **Trends in plant science**, Boston, v.18, n.1, p.30-40. 2013.

**CIB. Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável.** Disponível em:

[http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf)> Acesso em: 10/07/2015.

DIBAX, R., et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Curitiba, v.54, n.1, p.6-12. 2010.

ENDO, A., et al. Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. **Plant Physiology**, Tokyo, v.147, n.4, p.1984-1993. 2008.

FRANZ, S., et al. Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, Berlin, v.4, n.1, p.83-96, 2011.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of *eucalyptus*. **Physiology Molecular Biology Plants**, Andhra Pradesh, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2011.

HASEGAWA, P.M., et al. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, Southampton, v.19, n.3, p.371-377, 1984.

ISHIGE, N. et al. Genetic improvement for environmental stress resistance in eucalyptus. In: **Proc Plant and Animal Genome 12th Conference**, San Diego, California, 2004

KHAN, M. S. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Tsukuba, v.25, n.3, p.2433-2442. 2011.

KONDO K, et al. Analysis of the stress response genes in eucalyptus and effect of introducing several stress tolerance-giving genes into eucalyptus; A development situation and a practical possibility of an environmental stress resistant tree. In: **Proc Plant and Animal Genome 11th conference**. San Diego California. 2003.

KUDLA, J., BATISTIČ, O., HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, Münster, v.22, n.3, p.541-563. 2010.

LAANEMETS, K., et al. Focus Issue on Calcium Signaling: Calcium-Dependent and-Independent Stomatal Signaling Network and Compensatory Feedback Control of Stomatal Opening via Ca<sup>2+</sup> Sensitivity Priming. **Plant Physiology**, Tartu, v.163, n.2, p.504-513. 2013.

LIESE, A., ROMEIS, T. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Berlin, v.1833, n.7, p.1582-1589. 2013.

LIU, C., et al. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. **Plant molecular biology**, Beijing, v.84, n.2, p.19-36. 2014.

MACHADO, R., et al. Agrobacterium strain specificity and shooty tumour formation in eucalyptus (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*). **Plant Cell Report**, Brasília, v.16, n.5, p.299–303. 1997.

MARAGHNI, M., GORAI, M., NEFFATI, M. Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus*. **South African Journal of Botany**, Médenine, v.76, n.3, p.453-459. 2010.

MATSUKURA, S., et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Tokyo, v.283, n.2, p.185-196. 2010.

MEHROTRA, R. et al. Abscisic acid and abiotic stress tolerance–Different tiers of regulation. **Journal of plant physiology**, Rajasthan v.171, n.7, p.486-496. 2014.

MORI, I. C., et al. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and stomatal closure. **PLoS Biology**, La Jolla, v.4, n.10, p.327-341. 2006.

MOURA, J. C. M. S., et al. Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. **BMC research notes**, Uberaba, v.5, n.1, p.634-644. 2012.

PHILIP, A., et al. 5' Regulatory region of ubiquitin 2 gene from *Porteresia coarctata* makes efficient promoters for transgene expression in monocots and dicots. **Plant Cell Reports**, Tamilnadu, v.32, n.8, p.1199–1210. 2013.

PINTO, D. S., et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Florestalis**, Paragominas, v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.

SHINYA, T.; et al., A. Transcript Level Analysis of Lignin and Flavonoid Biosynthesis Related Genes in *Eucalyptus globulus*. **American Journal of Plant Sciences**. Tokyo, v. 5, n.18, p. 2764-2772, 2014.

SCHULZ, P., HERDE, M., ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. **Plant physiology**, Berlin, v.163, n.2, p.523-530. 2013.

SPOKEVICIUS, A. V., TIBBITS, J. F., BOSSINGER, G. Whole plant and plant part transgenic approaches in the study of wood formation—benefits and limitations. **Global Science Books. Transgenic Plant Journal**, Victoria, v.1, n.1, p.49-59. 2007

STAPE, J. L., et al. The Brazil *Eucalyptus* Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. **Forest Ecology and Management**, Raleigh, v. 259, n.9, p.1684-1694, 2010.

TENG, K. et al. Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Zhengzhou v.36, n.8, p.2219–2227. 2014.

TEULIERES, C., MARQUE, C. *Eucalyptus*. In: PUA, E. C., DAVEY, M. R. **Transgenic Crops**, Berlin Heidelberg. Springer v.60, p.387. 2007.

TORRE, F., et al.; Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular-specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, Vigo, v. 84, v.117, p.77–84, 2014.

WAN, B., LIN, Y., MOU, T. Expression of rice Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. **FEBS letters**, Beijing, v.581, n.6, p.1179-1189. 2007.

WHALLEY, H. J., et al. Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Oxford , v.23, n.11, p.4079-4095. 2011.

WENDLER, C., BARNSIKE, M., WILD, A.; Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. **Photosynthesis Research**, Mainz, v. 24, n.1, p.55-61, 1990.

YE, S., et al. Expression profile of calcium-dependent protein kinase (CDPKs) genes during the whole lifespan and under phytohormone treatment conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Plant molecular biology**, Wuhan, v.70, n.3, p.311-325. 2009.

YOSHIDA, T., et al. Omics Approaches Toward Defining the Comprehensive Abscisic Acid Signaling Network in Plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.56, n.6, p.1043–1052. 2015.

XU, J., et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. **Planta**, Shanghai, v.231, n.6, p.1251-1260. 2010.

ZHANG, Y., et al. Overexpressing SgNCED1 in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities, and stress tolerance. **Journal of Plant Growth Regulation**, Guangzhou, v.27, n.2, p.151-158. 2008.



## TABELAS

Tabela 1: Informações gerais sobre os 6 genes analisados e os genes de referências (*SAND* e *IDH*) utilizados para a normalização

Gene	Definição	Acesso	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon (pb)	E (%)	R <sup>2</sup>
<i>EgrCPK26</i>	<i>Calcium-Dependent Protein Kinase 26</i>	Eucgr.101536.1	F: CAAGATTCATCCAACCCCTTCA	59,92	123	100	0,995
			R: ATGTGTTGCCATAAAAGACG	59,88			
<i>EgrDREB2</i>	<i>DRE-Binding Protein 2</i>	Eucgr.G03094.2	F: AGTGACTATGCCGTGGATGAC	60,01	94	100	0,990
			R: GCTCCATCTTGACATCTGAGG	59,82			
<i>EgrNCED3</i>	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>	Eucgr.F01409	F: GAGCGAGAGATTTTGAGGAACC	61,57	102	100	0,998
			R: CAGAGCAGCGAGAGAATAAGCA	62,18			
<i>EgrPYRI</i>	<i>Pyrabactin Resistance 1</i>	Eucgr.E00279.1	F: TCGCTTTTCCGCTTTTGAT	59,82	100	96,8	0,985
			R: CTCCAAGAACGAACTGCAT	60,26			
<i>SAND</i>	<i>SAND protein</i>	Eucgr.B03031.1	F: CGTGTATGTCAATGGGTGAAAG	60,28	86	100	0,999
			R: TAGCAGGCAATACATCACCAAG	60,15			
<i>IDH</i>	<i>NADP Isocitrate Deshydrogenase</i>	Eucgr.F02901.1	F: TCCGTCTCGTCTCTCTCTC	59,97	95	92	0,994
			R: CTCTCGAAACCCATTGCTC	59,81			

Tabela 2: Quantidade de calos e plantas durante as etapas de transformação genética e a eficiência de transformação genética de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*.

Amostra	Calos iniciais	Nº de calos após o co-cultivo	Nº de calos após a seleção	Nº de plantas sobreviventes	Nº de plantas confirmadas	Eficiência (%)
Controle Total	50	50	48	-	-	-
Controle infiltração	100	85	0	-	-	-
<i>OsCPK5</i>	400	275	75	21	15	3,75

## FIGURAS

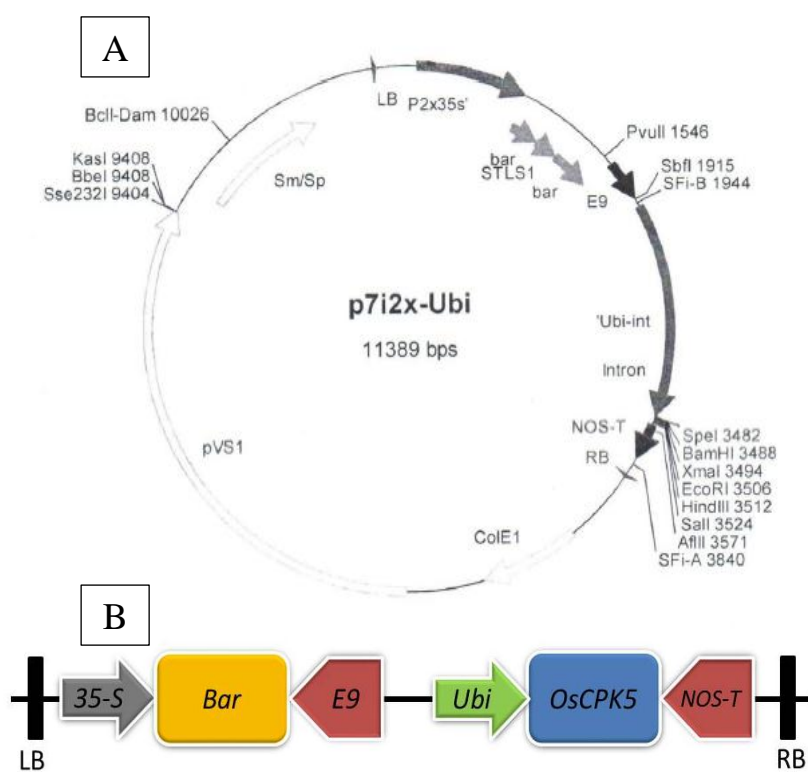


Figura 1: (A) Esquema do vetor binário p7i2x utilizado para a transformação. (B) Cassete gênico inserido no vetor binário, contendo o gene marcador de seleção e o gene *OsCPK5*.



Figure 2: Padrão dos calos após 2 meses de cultivo em meio de regeneração, sendo o primeiro mês na presença de ppt e o segundo na ausência.

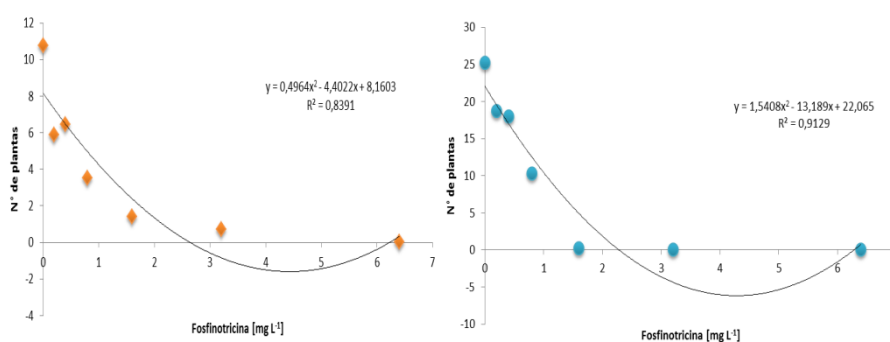


Figura 3: Análise estatística de regressão da taxa de regeneração de plantas vindas de calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. O gráfico da esquerda representa a avaliação da regeneração de plantas após 30 dias nas diferentes concentrações de ppt (Losangos laranja) e o gráfico da direita contém os números de plantas regeneradas após 30 dias em meio de regeneração com ausência do herbicida, sob efeito residual das concentrações anteriores (Bolas azuis).

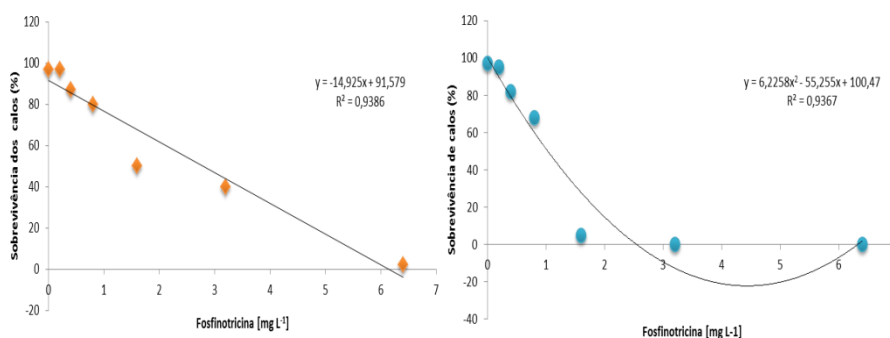


Figura 4: Análise estatística de regressão demonstrando a porcentagem de sobrevivência dos explantes de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. O gráfico da esquerda representa a taxa de sobrevivência dos calos após 30 dias em meios de regeneração na presença das diferentes concentrações de ppt (Losangos laranja) e o gráfico da direita representa a segunda avaliação depois de 30 dias em meios sem ppt, sob efeito residual das concentrações anteriores (Bolas azuis).

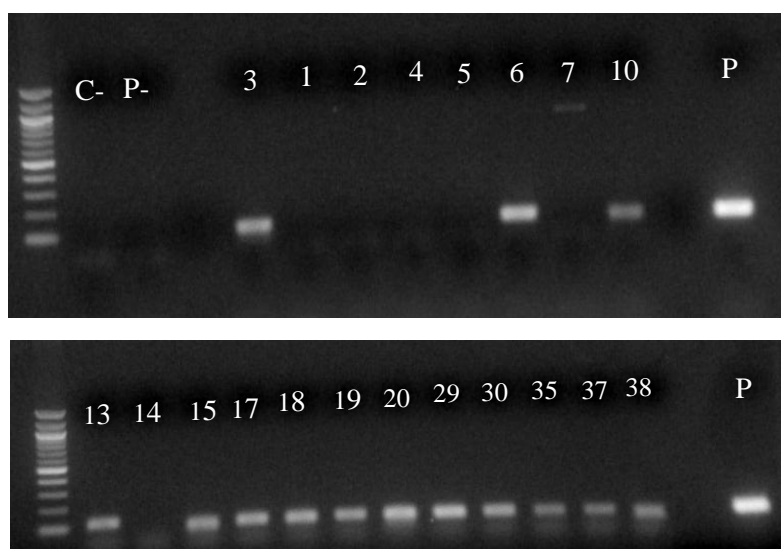


Figura 5: Resultado da PCR das plantas transformadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O amplicon de 100pb corresponde ao fragmento relacionado ao gene *OsCPK5* amplificado. (C-)Controle negativo da reação / (P-)Planta não transformada / (P) – Plasmídeo

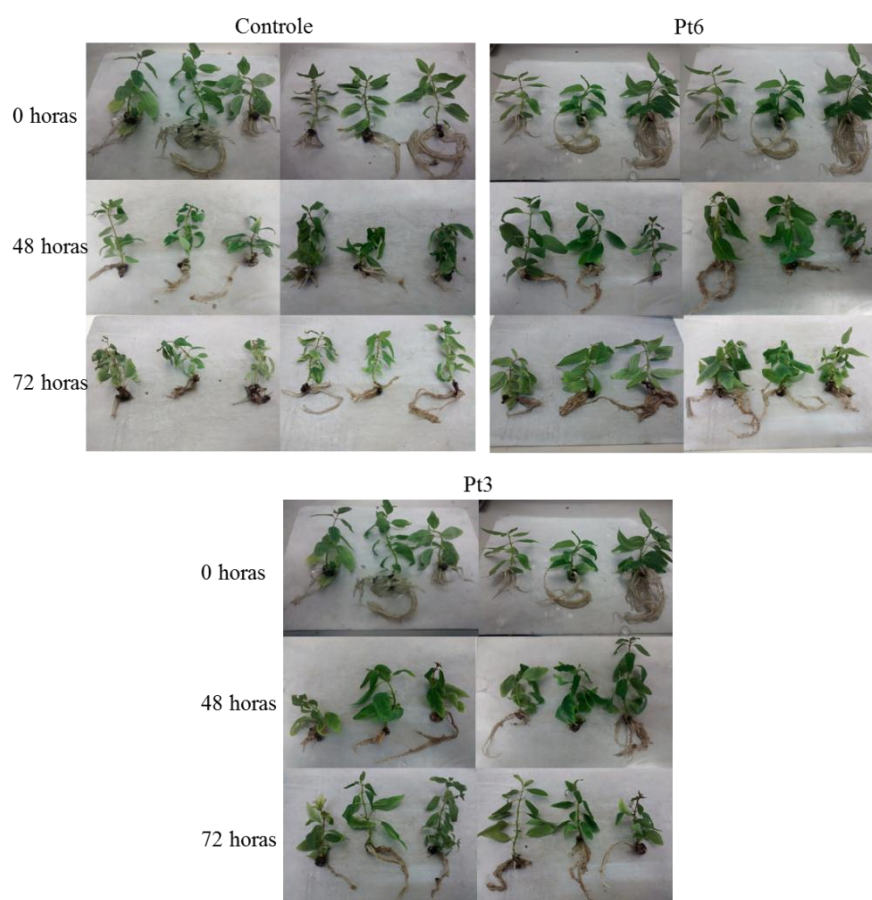


Figura 7: Análise visual das plantas controle e transformadas (Pt3 e Pt6) em condições de estresse induzido por PEG6000, nos três tempos analisados (0, 48 e 72horas)

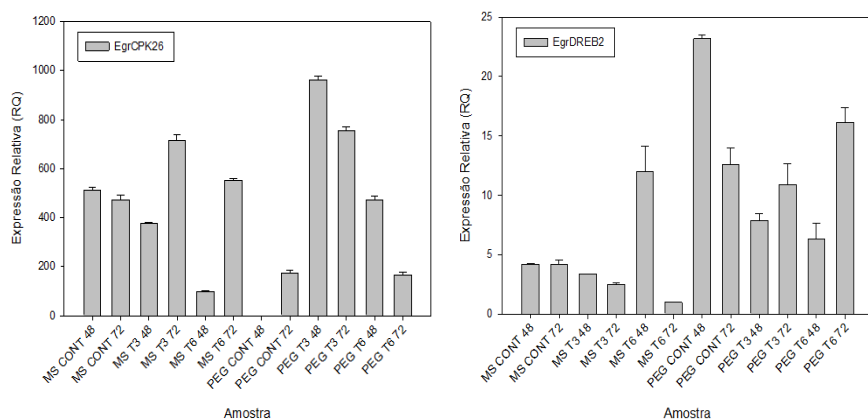


Figura 8: Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, dos genes *EgrCPK26* (Esquerda) e *EgrDREB2* (Direita). As barras correspondem as amostras avaliadas (Plantas Controle, Pt3 e Pt6), a condição (MS ou PEG) e o período da coleta (48 e 72 horas). Controle endógeno: *SAND* e *IDH*. Calibradores: *EgrCPK26* - amostra Controle PEG 48 horas; *EgrDREB2* - amostra Pt6 MS Tempo 72 horas.

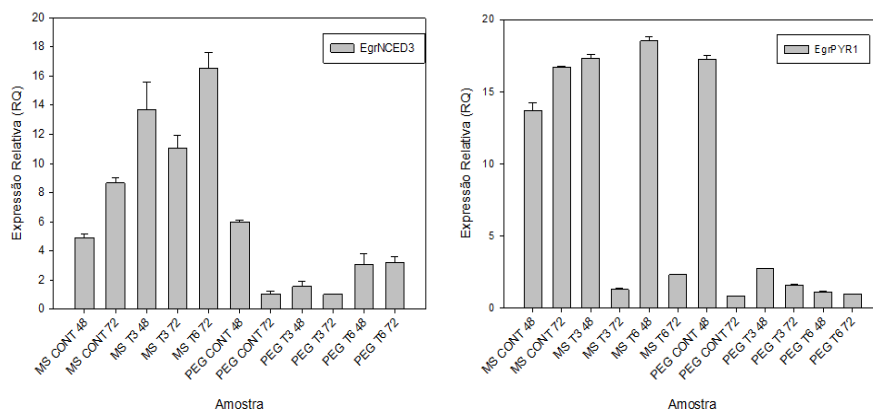


Figura 9: Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, dos genes *EgrNCED3* (Esquerda) e *EgrPYR1* (Direita). As barras correspondem as amostras avaliadas (Plantas Controle, Pt3 e Pt6), a condição (MS ou PEG) e o período da coleta (48 e 72 horas). Controle endógeno: *SAND* e *IDH*. Calibradores: *EgrNCED3* - amostra Pt6 PEG Tempo 72 horas; *EgrPYR1* - amostra Controle PEG Tempo 72 horas.