

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Jorge Lepikson Neto**

**“Análise da expressão gênica em diferentes espécies de Eucalipto  
utilizando a tecnologia de microarranjos de cDNA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Jorge Lepikson Neto  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do Título  
de Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L557a	<p>Lepikson Neto, Jorge</p> <p>Análise da expressão gênica em diferentes espécies de eucalipto utilizando a tecnologia de microarranjos de cDNA / Jorge Lepikson Neto. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Expressão gênica. 2. Eucalipto. 3. Microarranjos de DNA. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
-------	--

**Título em inglês:** Microarray cDNA gene expression analyses of different *Eucalyptus* species.

**Palavras-chave em inglês:** Gene expression; Eucalyptus; DNA microarrays.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Carlos Augusto Colombo, José Camillo Novello.


**Data da defesa:** 17/11/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

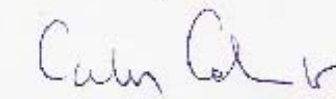
Campinas, 17 de Novembro de 2008

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Gonzalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

  
Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

  
Assinatura

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª. Dra. Johana Rincónes Pérez

\_\_\_\_\_  
Assinatura



Vista da fazenda Rio das Contas com o pé de Eucalipto ao fundo. Município de São Felipe, sul da Bahia, Brasil.

Porque não devemos esquecer de onde viemos.....

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a minha família. Meu pai Oscar, minha coragem, quem sempre me diz para ir em frente. Minha mãe, Lélia, quem sempre está ao meu lado para tudo, sempre. Meus irmãos Bia, Clara e Paulo, que tanto cresceram enquanto eu estou longe e que tanto fazem falta. Amo vocês.

Meu avô Jorge pelo exemplo que ficou, minha avó Solange por não ter palavras para descrevê-la, saudades.

Meus tios e tias, Heonir, Teca, Lauro, Fred, Tuca, Jorge, Fátima, Roberto, Tancinha, Eduardo, Goia, Manuelzinho e minha madrinha Sossó, tão presentes, tão importantes. Meus primos e primas, irmãos, irmãs! Seria injusto deixar qualquer um de fora, mas a família é enorme então agradeço a todos e coloco alguns adendos: Pati, que conviveu comigo aqui em Campinas; Ana, minha irmã mais velha; Verena sempre bem humorada, Priscila nem sempre rs, Juliana a quem eu dei uma flor; Veca, sempre sorrindo, Paula e Roberta minhas vizinhas; Letícia que tanto cresceu em mim, Solange que ficou de fora da primeira versão! Rs.

Joca, Laurinho, Norba e Tubias, irmãos para mim!

A todos os outros, Carlinhos, Bernardo, Marcelo, Caetano, etc.....

Eu não poderia pedir por uma família melhor que essa.

Aos meus amigos em Salvador: Bujão; Paulinho; João Paulo; Gós; Amoedo; Victor; Nariga; Ovídio, Carol Galvão, pelos momentos, pela diversão, pelas idas a praia, por tudo.

Aos meus amigos em Campinas: Zapa, Alessandro e Fipo, por me aturarem e dividirem um teto comigo; Ao Marcão por todos os *insights* e risadas; A Marcela e a Roberta,

moradoras extra-oficiais de casa; A Júlia e a Camila, por todas as conversas; A Flora e a Mari, por todas as saídas!

Ao Oso, Gardacho, Bereba, Sabia; Hérnia; Lulão; Miguelito; Evandro; Shin; Grace; Toty; Banana; Cabeça e tantos mais, pelo poker, pelo futebol, pelas festas, pelas conversas regadas a cerveja.

Ao Rock'n roll, pela minha sanidade.

A todos os amigos do laboratório (LGE) em especial à aqueles que estão comigo desde o início: Ao Marcelo pelo tratamento estatístico dos dados de array, a Ana Deckmann pela interpretação, organização e apresentação desses dados e a Johana pelas correções e sugestões, sem vocês essa tese não teria saído. A Carlinha por ter me aceitado como estagiário, Odalys, Joan, Dani, Bruno, Isa, Paulo, Sula, Michele, Jorge Mondego, Aline, Marcela, Eduardo e a todos os outros.

A Eliane, nossa mãe no laboratório, e ao Prof. Gonçalo pela oportunidade!

Valeu mesmo galera!

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. O Eucalipto**

## **1.2. A madeira**

1.2.1. A Parede celular

1.2.2. A Celulose

1.2.3. A Lignina

## **1.3.O Consórcio Genolyptus**

1.3.1. Descrição das espécies estudadas

1.3.2. Análise global da expressão gênica

# **2. OBJETIVOS**

# **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

# **4. RESULTADOS**

# **5. DISCUSSÃO**

# **6. CONCLUSÕES**

# **7. PERSPECTIVAS**

# **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**APÊNDICE I: Lista de primers utilizados para RT-PCR**

**APÊNDICE II: Lista dos 384 genes impressos nos microarranjos, de acordo com anotação do consórcio Genolyptus**

**APÊNDICE III: Identidade dos genes diferencialmente expressos nos microarranjos**

**APÊNDICE IV: Identidade dos genes diferencialmente expressos no Northern Eletrônico**

## RESUMO

Com o intuito de obter informações relevantes para o melhoramento genético do eucalipto para a produção de biomassa, o presente trabalho buscou comparar a expressão dos genes relacionados com a formação e desenvolvimento da madeira em quatro diferentes espécies de eucalipto, tendo como objetivo identificar os padrões que as tornam mais aptas, bem como quais genes relacionados com determinadas características. Essa análise abre a possibilidade da identificação de genes chave que possam ser manipulados, através do melhoramento clássico ou da transgênia, para aumentar o conteúdo relativo de celulose das plantas, incrementando a sua eficiência para processos econômicos. 384 ESTs do banco de dados do Consórcio Genolyptus foram selecionadas para serem analisadas através da tecnologia de microarranjos de cDNA. Foram selecionadas ESTs de genes com funções conhecidas relacionadas com a formação da madeira, bem como de genes relacionados com o desenvolvimento do vegetal e de genes com função ainda desconhecida. Os dados obtidos foram cruzados com a biblioteca de ESTs do Consorcio Genolyptus (Northern Eletrônico), e foram feitos PCR em tempo real para os principais genes diferenciais nos microarranjos e para os genes da via de lignina e flavonóides. Os resultados mostraram que diferentes genes estão expressos nas espécies estudadas sendo um grande número deles ainda com função desconhecida no metabolismo do eucalipto. A maioria dos genes relacionados com a formação da parede celular não apresentou perfil de expressão diferencial nos microarranjos, sugerindo que as diferenças fenotípicas entre as madeiras das espécies estudadas podem estar sustentadas em vias alternativas, com fatores de alongação, cliclínas e outros genes desempenhando papel importante, bem como genes ainda não relacionados com o desenvolvimento da parede celular e ou ao desenvolvimento do vegetal. Os experimentos com PCR em tempo real mostraram que genes da via de flavonóides relacionados com a via de lignina e formação da madeira podem estar desempenhando papeis importantes no controle da formação da madeira da espécie. Esses resultados representam avanços significativos no entedimento da formação da madeira em eucalipto e servem como base para orientar futuras investigações no intuito de melhorar geneticamente esta espécie.



## ABSTRACT

In this work we intended to assemble relevant information for the genetic engineering of *Eucalyptus* for biomass production by comparing gene expression of genes related with the xylem and wood development of four different *Eucalyptus* species with distinct characteristics, as a form to identify patterns and which genes are possibly related to their differences. This analysis opens the possibilities to manipulate the species and increase the overall cellulose content and its purpose for industrial production. 384 ESTs were selected from the *Genolyptus* database and analysed by microarray cDNA experiments. Among the ESTs selected some were related to wood formation, cell wall assembly and some still had no general function known on the species. The data from the microarray experiments were then crossed with the *Genolyptus* ESTs library (Electronic Northern) and Real-Time PCR were performed for the most relevant results as well as the genes from the lignin and flavonoid pathway. Results show that different genes are expressed among the xylem of the four species studied and most of them still have no related function to the metabolism of the plant. Most of the genes related to cell wall formation were not differentially expressed on the microarrays suggesting that the differences on the quality and structure of the wood among the four species might as well be resulted from the expression of alternative pathways and genes such as elongation factors, cyclins and others not yet related to the cell wall formation and wood development. Real-Time PCR experiments shown that genes from the flavonoid pathway related to lignin and wood formation might be playing a crucial role determining which pathway must be followed and therefore the type and quality of the wood on *Eucalyptus*. These results represent significant advances to our understanding on the formation of wood on *Eucalyptus* and will be valuable as a basis for future investigation aiming genetic engineering of the species.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O Eucalipto

O gênero *Eucalyptus* é composto por cerca de 500 espécies e 200 híbridos, sendo endêmico da Austrália e Tasmânia, com poucas espécies ocorrendo naturalmente fora destes locais (Blakely 1965). As diferentes espécies são adaptadas a uma ampla gama de condições ecológicas, podendo ocorrer tanto em climas tropicais como em regiões temperadas com invernos mais rigorosos (Hall, Johnston, and Chippendale 1970)

Os eucaliptos crescem rápido, suportam solos pobres em nutrientes e possuem madeira de boa qualidade, motivos pelos qual o *Eucalyptus* é o principal gênero cultivado nas plantações industriais existentes no mundo: cerca de 20 milhões de hectares plantados em 90 países.

A maioria das espécies de *Eucalyptus* se caracteriza por serem árvores típicas de floresta altas, atingindo alturas que variam entre 30 e 50 metros (Hall, Johnston, and Chippendale 1970). Algumas espécies podem atingir excepcionalmente 100 metros de altura, sendo consideradas as árvores florestais latifoliadas mais altas do mundo.

Outras espécies comuns de *Eucalyptus* são aquelas típicas de florestas abertas, com árvores menores que atingem de 10 a 25 metros (Hall, Johnston, and Chippendale 1970). Cerca de 30 a 40 espécies são arbustivas (conhecidas como “Malees”) e se caracterizam por possuírem diversos troncos oriundo de um único núcleo lenhoso subterrâneo. Apesar da grande variedade em relação ao habitat e aparência, todas as espécies de eucalipto devem possuir características comuns para serem classificadas dentro do gênero como, por exemplo, a presença de glândulas de óleo nas folhas, tipo de flores e frutos, entre outros descritores (Hall, Johnston, and Chippendale 1970). Entretanto, a característica morfológica mais importante do eucalipto seja possivelmente a sua casca, sendo que os diversos tipos distintos de casca são capazes de caracterizar grupos de espécies estreitamente relacionadas (Kelly, 1969).

Devido à grande quantidade de espécies, o gênero *Eucalyptus* possui uma alta gama de adaptações edafoclimáticas, podendo ser encontradas espécies que se adaptam bem tanto em temperaturas negativas (até -18 °C) quanto em climas quentes (+35°C), e em solos que apresentam uma variação desde arenosos a encharcados (Silva, 2001).

O eucalipto foi trazido ao Brasil na segunda metade do século XIX para a produção de dormentes para as linhas férreas que se instalavam no país, passando a ser

amplamente utilizado e distribuído geograficamente a partir do século XX, quando métodos para a extração da celulose utilizando madeira desta espécie foram otimizados.

A principal vantagem competitiva do Brasil para o aumento das exportações foi o desenvolvimento da celulose de fibra curta do eucalipto, introduzida pela primeira vez no mercado internacional de celulose no final da década de 1960. Essa vantagem competitiva do Brasil também diz respeito a diferenciação de custo e qualidade entre a celulose de fibra curta e fibra longa. A celulose de fibra longa custa mais caro por causa da sua principal matéria prima já que o ciclo de vida de pinus para atingir o ciclo de corte é de cerca de 25 anos, ao contrário da celulose de fibra curta que tem como matéria prima o eucalipto, o qual amadurece no máximo em 7 anos. (Andrade e Dias, 2003).

No Brasil, o eucalipto é responsável pelo abastecimento da maior parte do setor industrial de base florestal. O segmento de celulose e papel é composto por 220 empresas distribuídas em 450 municípios, de 17 estados, e utiliza madeira exclusivamente de florestas plantadas. Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura, em 2007 a produção de papel alcançou 8,9 milhões de toneladas e a de celulose 11,9 milhões de toneladas. Isso tornou o Brasil o maior produtor mundial de celulose de eucalipto (Bracelpa, 2006; Bracelpa, 2008). No setor de carvão vegetal, a produção atinge anualmente a marca de 18,8 milhões de metros cúbicos (70% da produção nacional). Outro setor importante é o de chapa de fibra que tem uma produção anual de 558 mil m<sup>3</sup>, dos quais a madeira de eucalipto é responsável por 100% da produção nacional (Bracelpa, 2008). No setor de chapas de fibra aglomerada, a produção perfaz 500 mil m<sup>3</sup>, representando quase 30% da produção nacional (Silva, 2005).

As receitas de exportação desses produtos florestais atingiram US\$ 7,4 bilhões em 2007. Estima-se que o setor de base florestal emprega direta e indiretamente 6,5 milhões de pessoas em todos os segmentos. (Bracelpa 2008).

Em vista de que o eucalipto possui alta capacidade de produção de biomassa (até 100 m<sup>3</sup>/ha/ano de madeira rica em fibra de celulose (Bracelpa, 2008) e uma considerável habilidade no seqüestro de carbono (10-14 ton/ha/ano), sendo que este saldo se mantém positivo mesmo quando considerada a emissão de CO<sub>2</sub> proveniente da produção de carvão e papel (Bracelpa, 2008), considera-se que esta espécie é um candidato primário à produção renovável de biomassa para a produção de etanol ([http://www.jgi.doe.gov/News/news\\_6\\_8\\_07.html](http://www.jgi.doe.gov/News/news_6_8_07.html)).

## 1.2. A Madeira

De acordo com a Organização Internacional da Madeira Tropical (ITTO), o Brasil é o maior consumidor de madeiras tropicais do mundo. Seu consumo anual é de 350 milhões de m<sup>3</sup> de madeira (Silva, 2001), sendo a demanda por biomassa lenhosa das indústrias de papel e celulose suprida de modo racional e eficiente pelas florestas de eucalipto, graças à sua adaptabilidade ao clima do país, aliada ao rápido crescimento e boa qualidade da madeira (Kirst, Myburg et al. 2004). Em 2007, a área destinada à plantação de árvores para as indústrias de papel e celulose atingia 1,7 milhões de hectares, sendo 75% ocupados por árvores de eucalipto, 24% por *Pinus sp.* e outras espécies ocupando apenas 1%. Estima-se que as florestas plantadas evitaram a destruição de cerca de 2,8 milhões de hectares de florestas nativas. O Estado de São Paulo é atualmente o principal produtor de madeira para papel e celulose, perfazendo um total de 383 mil hectares de floresta plantada (Bracelipa, 2008).

A madeira possui alta demanda em diversos setores, desde o aquecimento de interiores até a fabricação de papel e vem sendo cada vez mais explorada como fonte de energia renovável com um bom custo x benefício. Dessa forma há um interesse considerável em se aumentar a produtividade da madeira nas árvores em que ela hoje é explorada, assim como sua qualidade, tendo em vista o aumento relativo da quantidade de celulose (Kirst, 2004; Watai, 1990).

Um dos principais problemas da utilização dos eucaliptos como madeira sólida são as tensões do crescimento e de secagem, que causam perdas de até 50% em madeira serrada (Watai, 1990). A madeira possui propriedades físicas (densidade básica e retratibilidade) e mecânicas (resistência). A densidade básica, que se traduz pela massa de madeira seca em relação ao seu volume saturado, é uma das propriedades físicas mais importantes na caracterização tecnológica da madeira, visto que sua variação afeta sua resistência mecânica e sua estabilidade dimensional (Arganbright, 1971). Em termos químicos, a densidade básica é reflexo da porcentagem dos diferentes constituintes da madeira: celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Essa densidade é influenciada também pela dimensão dos elementos anatômicos, tais como comprimento, largura, e espessura da parede assim como diâmetro do lúmen das fibras e traqueídeos (Panshin e Zeeuw. 1970; Arganbright, 1971).

A aquisição do sistema vascular foi de suma importância para o sucesso evolutivo das plantas terrestres. O sistema vascular é o responsável pelo crescimento do diâmetro da planta e produz o floema e xilema secundário. O xilema secundário é um tecido altamente especializado, com função de transporte e sustentação, produzido pelo crescimento lateral e diferenciação do câmbio meristemático vascular (Fukuda 1996). O produto derivado da formação do xilema secundário representa um dos recursos naturais mais importantes do mundo, a madeira, e os genes expressos durante o processo de formação do xilema secundário determinam as suas propriedades físico-químicas (Kirst, Myburg et al. 2004).

O estudo da expressão gênica diferencial entre espécies de eucalipto com diferentes características físicas da madeira permitiria identificar e correlacionar quais genes estão envolvidos com as vias de biossíntese de celulose, lignina e compostos da parede celular. Estes conhecimentos abririam o caminho para o melhoramento genético da espécie através da transgenia, podendo assim melhorar sua produção de celulose por m<sup>3</sup> tanto quanto suas características estruturais para utilização da madeira na construção civil.

#### 1.2.1. A Parede celular

A parede celular do eucalipto é composta aproximadamente por 50% celulose, 25% hemicelulose e 25% lignina. Essa constituição química varia entre espécies do mesmo gênero e, em menor escala, entre os exemplares da mesma espécie (Vital, 1984). Esses compostos são formados a partir da combinação de alguns elementos químicos, considerada como obedecendo a seguinte proporção geral: 50% de carbono, 44% de oxigênio, 6% de hidrogênio, 0,1% de nitrogênio e 0,3% de cinzas (material inorgânico).

A parede celular tem várias funções: regula a expansão celular, contribui para a adesão entre as células, funciona como barreira para potenciais patógenos e determina as propriedades físicas da planta, bem como a resistência mecânica que permite que algumas plantas alcancem grandes alturas (Boudet, 2000). A parede celular também atua como exoesqueleto, controlando a forma da árvore, e é necessária para regular as relações hídricas das plantas, pois determina a relação entre turgor e volume celular, sendo o crescimento vegetal expansivo limitado principalmente pela capacidade de expansão da parede celular.

A parede celular é classificada em dois tipos principais: Primária e secundária. Ambas são compostas por microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos, principalmente hemicelulose e pectinas, mais uma pequena quantidade de proteína estrutural variando de acordo com a célula e com a espécie vegetal. A parede primária é formada durante a citocinese e depois modificada durante a expansão celular. A parede celular secundária forma-se após a formação da parede primária, cessando o crescimento da célula e é altamente especializada em estrutura e composição. As células do xilema, tais como as encontradas na madeira, são notáveis por possuir parede secundária altamente espessada e reforçada por lignina.

As microfibrilas de celulose são estruturas rígidas que contribuem para a resistência a disposição estrutural da parede celular. Os glucanos individuais que constituem as fibrilas estão firmemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada, que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado a celulose é muito forte, muito estável e resistente a degradação.

As diferentes funções da parede celular refletem sobre a grande variedade da sua composição entre diferentes tipos celulares e durante a diferenciação celular. Acredita-se que até 15% dos genes contidos no genoma possam estar envolvidos com síntese da parede celular e sua regulação (Darley et al 2001). Um grande número de genes também é necessário para a síntese de polímeros da parede celular, como lignina, celulose, xilano, xiloglucano, pectinas, proteínas estruturais e outros componentes, bem como o envolvimento de genes relacionados a hormônios, citoesqueleto e sua regulação (Lerouxel, 2006; Somerville, 2006; Joshi, 2007).

Para entender como as plantas constroem seus diferentes tipos de parede celular é necessário conhecer os genes que participam de sua via metabólica de síntese e aqueles que participam da sua regulação

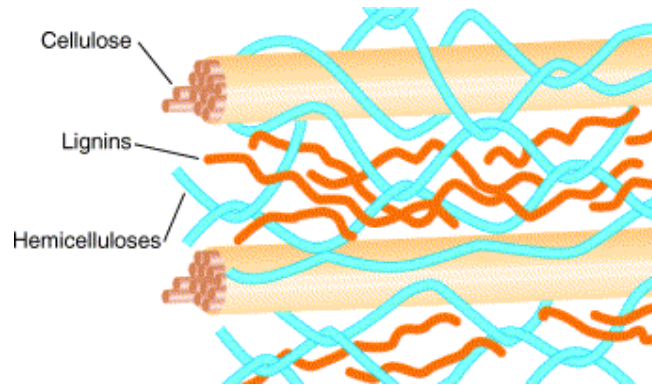
### 1.2.2. A Celulose

Provavelmente não há processo bioquímico em plantas que seja tão importante, e ao mesmo tempo tão mal compreendido ao nível molecular, do que a síntese de celulose. De certa forma isto é surpreendente, pois o mecanismo básico consiste de uma simples polimerização de resíduos de glucose, como a UDP-glucose, para formar um polímero  $\beta$ -1,4-d-glucano. Esta é uma representação simples de um processo claramente mais complexo que requer muitos níveis de organização.

A celulose é composta por polímeros de cadeias lineares, sua estrutura se forma pela união de moléculas de  $\beta$ -glucose através de ligações do tipo  $\beta$ 1-4-glucosídico, com fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$  com um valor mínimo de  $n=200$ .

A celulose tem estrutura linear ou fibrosa na qual se estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila das cadeias justapostas de glucose, fazendo-as impenetráveis a água, e originando fibras compactas que constituem a parede celular do vegetal. Dependendo da fonte de onde é obtida, suas propriedades físicas (estado cristalino, grau de cristalização e peso molecular) podem variar consideravelmente.

A microfibrila de celulose é firmemente empacotada de cadeias lineares de d-glucose com ligações  $\beta$ 1-4. Estas microfibrilas são de comprimento indeterminado e sua estrutura molecular exata é desconhecida. A celulose tem alta resistência elástica, equivalente a do aço, é insolúvel, quimicamente estável e relativamente imune ao ataque enzimático. Tais propriedades fazem da celulose um excelente material estrutural para formar uma parede celular forte. A formação de celulose envolve não apenas a síntese de glucano, mas também a cristalização de cadeias múltiplas de glucano dentro da microfibrila. Pouco é conhecido sobre o controle desse processo, exceto que a direção do depósito da microfibrila pode ser orientada por microtubulos adjacentes à membrana. Quando a microfibrila de celulose é sintetizada, ela fica depositada em um meio (a parede) que contém uma alta concentração de outros polissacarídeos, com capacidade de interação e, talvez, de modificá-la. Estudos têm mostrado que hemicelulose tais como xiloglucano e xilano, podem ligar-se à superfície da celulose. Algumas hemiceluloses também podem tornar-se fisicamente aprisionadas dentro da microfibrila durante sua formação; assim há uma redução da cristalinidade e da ordem da microfibrila. As hemiceluloses constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos que se liga com firmeza à parede. Diversos tipos de hemicelulose são encontrados em paredes celulares; as paredes de espécies e tecidos diferentes, por sua vez, variam quanto a sua composição em hemicelulose. Assim como as hemiceluloses, as pectinas também constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos caracterizados por conterem açúcares ácidos.



**Figura 1. Representação esquemática da parede celular secundária lignificada. Extraído de Boudet et al (2003).**

Células vivas utilizam um sofisticado complexo de membranas para a síntese de celulose, com um grau de complexidade semelhante ao da replicação de DNA. A síntese de celulose depende de um número de proteínas arranjadas de maneira específica e as cadeias de glucano são sintetizadas simultaneamente por grandes complexos enzimáticos transmembrana. Apenas um único componente deste complexo foi identificado, a celulose sintase (CesA). Estes complexos podem ser encontrados solitários ou em clusters enfileirados na membrana, e a organização destes complexos determina a dimensão da microfibrila de celulose.

Genes codificando celulose sintases em plantas foram identificados por seqüenciamento e comparados com celulose sintases de bactérias e outras  $\beta$ -glycosiltransferases. Um grande número de genes foi identificado com possível função não redundante em 170 tipos de plantas vasculares, sendo que em *Arabidopsis* foram encontrados pelo menos 10 genes CesA distintos. Segundo Doblin et al (2002), os produtos de pelo menos três genes diferentes de CesA são necessários para a formação de um complexo funcional, e mutações em qualquer um destes genes acarretaria na perda da microfibrila de celulose.

Em bactérias sintetizadoras de celulose, como as espécies do gênero *Acetobacter*, a polimerização dos resíduos de glucose em  $\beta$ -1,4-glucano é catalisado pela celulose sintase utilizando a UDP- $\alpha$ -glucose como substrato. Neste tipo de reação uma única CesA é capaz de iniciar, elongar e terminar a cadeia. Existem também hipóteses que a celulose seria sintetizada por etapas envolvendo intermediários lipídicos em conjunto com a celulose sintase e uma endoglucanase (Delmer, 1995). Genes codificadores para endoglucanases foram inclusive encontrados em operons de celulose sintase (Matthysse et al 95 a e b). Já em plantas, a regulação das CesA é incerto, mas



dado o grande número de genes o controle da polimerização das microfibrilas de celulose pode se dar pela interação de diferentes sub-variedades de Cesa em uma orientação específica. Semelhanças na síntese de celulose foram encontradas em diversos organismos (Nobles and Brown, 2004), e mesmo considerando particularidades nos diferentes organismos, acredita-se que a região do sítio catalítico é conservada em todas as celulosas sintases, sugerindo que os diferentes organismos catalisam a síntese de cadeia  $\beta$ -1,4-glucano de maneira similar.

### 1.2.3. A Lignina

A lignina é encontrada na parede celular de vários tipos de tecidos de sustentação e vascular, especialmente traqueides e elementos de vaso, correspondendo entre 15 a 35% do peso seco da madeira. Ela é depositada, sobretudo no espessamento da parede secundária, mas também pode ocorrer na parede primária e na lamela média em íntimo contato com a celulose e hemicelulose presentes.

A composição química elementar da lignina inclui carbono, hidrogênio e oxigênio, mas a contribuição relativa destes elementos pode variar principalmente se a lignina for obtida de coníferas ou de folhosas além de depender do método de isolamento da mesma. A rigidez mecânica da lignina fortalece os caules e o tecido vascular, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que a água e os sais minerais sejam conduzidos através do xilema sob pressão negativa, sem haver colapso do tecido.

Alem de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções protetoras importantes nos vegetais. Por sua capacidade de ligação à celulose e a proteínas, a lignina também reduz a digestibilidade dessas substâncias. A lignificação bloqueia o crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente a infecção ou lesão.

A lignina é um polímero de natureza aromática com alto peso molecular que tem como base estrutural unidades de fenil-propano e provavelmente esta ligada aos polissacarídeos da madeira, com um padrão de ligações complexo e irregular, unindo as subunidades aromáticas de álcool. Tais subunidades, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase. Como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica, que se liga firmemente à celulose e impede a expansão da parede (Boudet et al 2000 e 2003; Darley et al 2001).

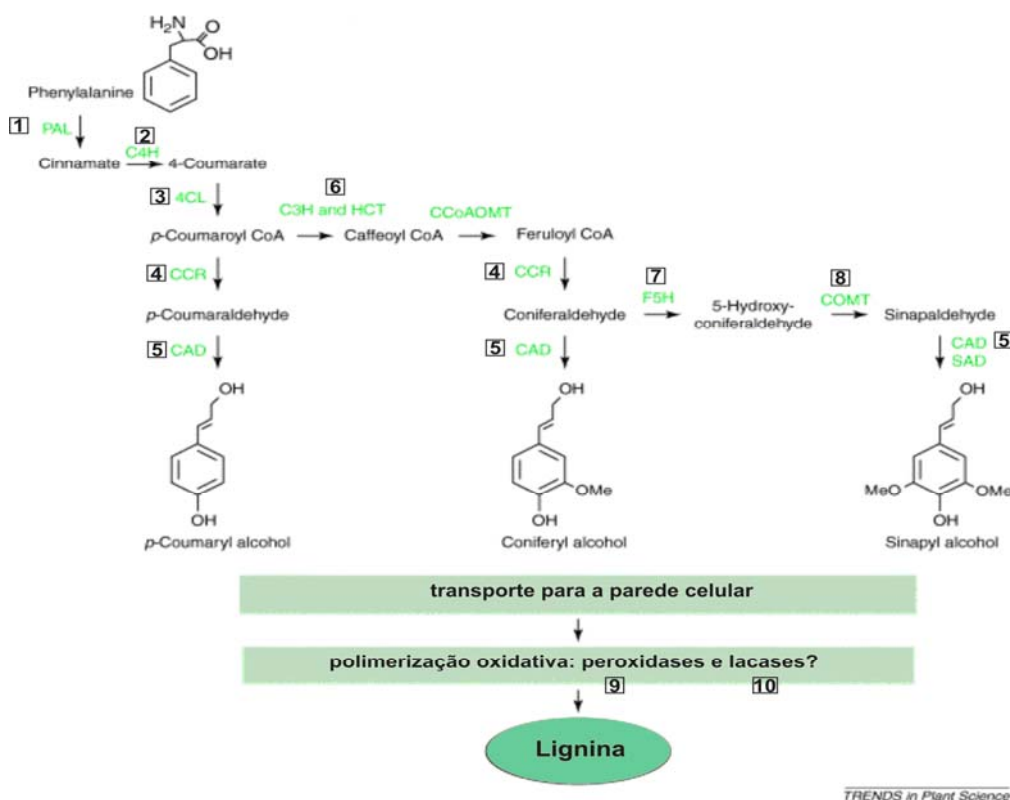
A estrutura química da lignina não é totalmente conhecida principalmente pelo fato das alterações que sofre durante as práticas de seu isolamento da madeira, sendo constituída de três monômeros que diferem entre si pelo grau de metilação, são eles: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool para-trans-cumárico e levam a formação dos diferentes tipos de lignina, Guaiacólica (G), Sinapólica (S) e Cumarólica (H), respectivamente, sendo a última uma lignina considerada aberrante e encontrada em quantidade muito inferior. (Besseau, 2007). A diferença na composição das ligninas e a quantidade de cada um dos tipos de lignina influem nas características da madeira. O valor da NTLI (Número teórico de ligações Intermonoméricas) que varia segundo a composição da lignina revela ser maior na lignina G do que na S.

Estes fatos levam a formação de ligninas mais ou menos resistentes o que caracteriza a sua estabilidade perante agentes bióticos e abióticos de degradação da madeira (Higushi, 1985). A lignina G que se mostra mais ramificada e rígida possui um menor Índice de Flexibilidade Molecular (IFM), sendo assim mais resistente e mais indicada para a indústria de construção, a madeira com maior quantidade deste tipo de lignina está menos susceptível a rachaduras, já a lignina S, que possui um IFM maior, é, portanto mais indicada para a indústria de celulose sendo sua deslignificação da celulose mais fácil, portanto mais barata, menos poluente e trabalhosa (Baucher et al, 2003).

Uma grande quantidade de genes é atribuída como participante da formação da lignina em algum nível de sua síntese, tais como os genes reguladores da atividade das enzimas *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL), *4-cumarate-CoA ligase* (4CL), *cinnamate 4-hydroxylase* (C4H), *ferulate 5-hydroxylase* (F5H), *cinnamoyl-Co-A NADP reductase* (CCR), *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD), que participam das reações da etapa que antecede à polimerização da lignina. (Boudet et al 2000 e 2003; Darley et al 2001).

Indícios de que outros genes podem contribuir de forma determinante para a síntese deste polímero foram encontrados quando plantas mutantes ou geneticamente modificadas apresentaram unidades inusuais de lignina, levando à hipótese que em condições específicas sua síntese pode ser alcançada por diferentes vias e precursores envolvendo assim uma grande variedade de genes. Mutantes de *Populus tremuloides* sem a expressão do gene Pt4CL1, cuja proteína codificada catalisa a ligação CoA do ácido hidroxicinâmico e está relacionado com a formação de precursores da síntese de lignina, foi encontrada uma redução de 45% na quantidade de lignina compensada por um aumento de 15% de celulose (Chiang et al 1999).

Devido a grande quantidade de genes envolvidos com a síntese do xilema secundário e da lignificação, o estudo da expressão destes genes em diferentes espécies pode levar ao melhor entendimento destas vias. A identificação da participação diferencial de grupos destes genes e a possibilidade de se aperfeiçoar este processo através de técnicas de transgenia, têm grande potencial de aumentar a qualidade e o rendimento da produção de celulose. Altos teores de lignina são indesejáveis por tornar os métodos de extração e purificação mais caros e poluentes, além de apresentar menor rendimento e qualidade na extração de celulose. No entanto, a lignina exerce importante função de sustentação e proteção a pragas na planta e uma concentração muito baixa ou alteração drástica na sua composição pode inviabilizar o vegetal.



**Figura 2. Vista simplificada da via de formação de ligninas, genes representados:**  
**1- PAL - phenylalanine ammonia-lyase; 2- C4H- cinnamate 4-hydroxylase; 3- 4CL - cinnamate 4-hydroxylase; 4- CCR- cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase; 5- CAD- cinnamyl alcohol dehydrogenase; 6- C3H - p-coumarate 3-hydroxylase; 7- F5H- ferulate 5-hydroxylase; 8- COMT- caffeate O-methyltransferase; 9- Peroxidase; 10- Lacase.** Modificado de Boudet et al, 2003.

### 1.3. O Consórcio *Genolyptus*

Com base em sua importância econômica e estratégica, entre 2000 e 2001 foi iniciado um esforço conjunto no sentido de utilizar ferramentas genômicas visando o melhoramento genético do eucalipto, o projeto denominado “GENOLYPTUS – Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*”, concretizado em 20 de fevereiro de 2002 com seu lançamento oficial pelo então presidente da república, Fernando H. Cardoso, com recursos financeiros do Fundo Setorial Verde-Amarelo e de empresas de celulose e papel. Foram reunidas 14 grandes empresas do setor de papel e celulose (Aracruz, Celmar, Cenibra, International Paper, Jarí Celulose, Klabin, Lwarcel, RAIZ, Rigesa, Suzano Bahia Sul, Veracel, Votorantin Celulose e Papel, V&M Florestal, Zanini Florestal) e dez instituições de pesquisa lideradas pela Embrapa/Cenargem sobre a coordenação geral do Dr. Dário Grattapaglia. Confirmado o apoio do governo federal, esse projeto pré-competitivo constituiu-se no exemplo pioneiro de parceria entre o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e as competências instaladas no setor produtivo e nas instituições de pesquisa em um empreendimento de desenvolvimento científico e tecnológico na interface entre ciências genômicas, melhoramento genético, tecnologia da madeira e produção florestal.

O objetivo central do Projeto GENOLYPTUS foi o descobrimento, sequenciamento, mapeamento e a determinação da função de genes de importância econômica de espécies de *Eucalyptus*, visando a incorporação de tecnologias de genômica nos programas de melhoramento e produção florestal. O projeto foi organizado em oito sub-projetos, coordenados por diferentes grupos de pesquisa. Estes sub-projetos intitulam-se (1) Instalação e avaliação continuada de uma rede experimental de campo (Empresas privadas); (2) Internalização de tecnologias de alto desempenho para avaliação da qualidade da madeira (UFV); (3) base genética e identificação de genes que conferem resistência a doenças em *Eucalyptus* (UFV); (4) Construção de mapas genéticos e mapeamento de locos controladores de características quantitativas (QTLs) (Embrapa-Cenargem); (5) Construção de mapas físicos localizados no genoma de *Eucalyptus* (UFV); (6) Sequenciamento do transcriptoma de *Eucalyptus* (UFRGS); (7) Análise da expressão gênica em microarranjos e Bioinformática para a análise integração e disponibilização de dados genômicos (Unicamp); (8) Genética estatística e métodos quantitativos (UFG) . O Laboratório de Genômica e Expressão

(LGE), ficou a cargo do sub-projeto 7, dentro do qual foi desenvolvida esta dissertação de mestrado.

### **1.3.1. Descrição das espécies estudadas no sub-projeto intitulado “Análise da expressão gênica em microarranjos e Bioinformática para a análise integração e disponibilização de dados genômicos”**

Quatro espécies de *Eucalyptus* foram estudadas neste projeto: *Eucalyptus grandis*; *E. urophylla*; *E. globulus* e *E. pellita*. Estas espécies foram escolhidas por suas características físicas e importância econômica. *E. grandis* e *E. urophylla* são semelhantes na qualidade e composição química de sua madeira e são as espécies mais plantadas hoje no Brasil. Já *E. globulus* é a espécie que possui maior qualidade da madeira e menor quantidade de lignina, e *E. pellita* possui madeira de baixa qualidade e alta concentração de lignina.

Devido a grande variabilidade fenotípica do eucalipto faz-se necessária uma descrição mais detalhada das espécies estudadas no trabalho, as descrições apresentadas foram baseadas em (Silva, 2001).

- *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden - A espécie ocorre naturalmente na Austrália, ao norte do estado de New South Wales, entre as latitudes 25 e 33°S, e nas regiões central (latitude de 21°S) e norte (latitude 16 a 19°S) de Queensland, em áreas com altitude variando desde o nível do mar até 600 metros, na área de maior ocorrência, e de 500 a 1.100 metros de altitude nas áreas mais ao norte (Atherton - QLD). Nestas latitudes, a precipitação pluviométrica varia de 1.000 a 3.500 mm anuais, predominantemente no verão, e a estação seca raramente ultrapassa três meses; a temperatura máxima média varia de 24 a 30° C e a mínima média varia entre 3 e 8° C., raramente ocorrem geadas nas regiões costeiras, embora elas possam ocorrer em locais de maior altitude. *E. grandis* é uma das espécies mais plantadas no mundo, considerada uma das espécies mais versáteis e indicadas para uso múltiplo. A madeira desta árvore é considerada medianamente leve e é fácil de ser trabalhada em operações de usinagem. É também considerada de baixa estabilidade, mas de elevada permeabilidade. Quando oriunda de plantações de ciclo longo, a madeira é utilizada intensivamente na Austrália, África do Sul, Brasil e Argentina como madeira de construção e matéria-prima na

fabricação de móveis. Quando oriunda de plantações em ciclos curtos é utilizada em caixotaria, paletes, carvão e mourões. A madeira oriunda de árvores com rápido crescimento apresenta problemas de empenamento, contrações e rachaduras, em operações de desdobro e secagem. As madeiras convenientemente manejadas podem produzir madeira excelente para serraria e laminação. É a principal matéria-prima para as indústrias de celulose, painéis aglomerados e chapas duras. Em vista de estas características, *E. grandis* é uma espécie presente em muitos países de clima ameno por ser considerada sensível a geadas severas, mas apresenta relativa resistência a deficiência hídrica; sua madeira é considerada moderadamente leve, com cerne diferenciado. Já sua regeneração, através da brotação de cepas, é considerada boa; o ritmo de crescimento e o rendimento volumétrico são geralmente superiores, quando comparados a outras espécies convencionais.

- *Eucalyptus pellita* F. Muel - Na Austrália, a espécie ocorre em duas regiões, nas latitudes de 12 a 18° S e 27 a 36°S, em altitudes que podem variar desde o nível do mar até 600m. A precipitação pluviométrica média anual varia de 900 a 2.400 mm, distribuídas uniformemente durante o ano, com maior concentração no verão. A temperatura máxima média varia de 24 a 33° C e a temperatura mínima média varia de 12 a 16°C, com geadas sendo quase inexistentes em ambas as regiões. A madeira é considerada levemente pesada, onde as propriedades de resistência mecânica são elevadas. *E. pellita* possui uma madeira de alta estabilidade, mas de baixa permeabilidade, sendo muito utilizada em componentes estruturais para construção, caixotaria, postes, mourões, dormentes, lenha e carvão. Esta espécie é considerada apta para regiões onde não ocorrem geadas. No Brasil, a espécie não tem sido plantada intensivamente e tem sido pouco estudada. Alguns trabalhos realizados em instituições de pesquisa não tem sido animadores sendo considerada a espécie que possui todas as características “ruins” do eucalipto, especialmente pelo alto teor de lignina que possui.

- *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake – Esta é uma das duas espécies de ocorrência natural fora do território australiano, ocorrendo naturalmente na ilha de Timor e outras ilhas a leste do arquipélago indonésio, entre as latitudes de 8 a 10°S, com altitudes variando de 400 a 3.000 metros. A precipitação pluviométrica média anual nestas regiões varia de 1.000 a 1.500 mm, com chuvas concentradas no verão. O período seco não ultrapassa quatro meses. A temperatura média máxima se situa em torno de 32° C e

a temperatura média mínima varia entre 8 a 12° C. Geadas podem ocorrer em alguns dias do ano, nas zonas de maior altitude. A madeira é considerada medianamente leve, onde as propriedades de resistência mecânica são moderadas, tendo relativa estabilidade e alta permeabilidade. No Brasil, é indicada para usos gerais e muito utilizada em laminação, componentes estruturais para construção, caixotaria, mourões, escoras, celulose e papel, chapas duras, painéis, lenha e carvão. Inúmeros esforços têm sido realizados para a introdução da espécie fora das condições de sua zona natural e os resultados são bastante satisfatórios, com a espécie apresentando alta plasticidade, adaptando-se a solos hidromórficos ou francamente arenosos, em diferentes altitudes. Esta espécie é considerada apta para regiões onde não ocorrem geadas e situações de déficits hídricos severos. No Brasil, a espécie tem sido plantada intensivamente em programas de melhoramento genético, principalmente de hibridação. É uma espécie que apresenta boa capacidade de regeneração por brotação e resistência ao fungo causador do cancro do eucalipto.

- *Eucalyptus globulus* - O *E. globulus* é originário da Tasmânia, onde é conhecido por "blue gum". A entrada dos eucaliptos na Europa começou com expedições científicas européias à Austrália, Tasmânia e Nova Zelândia. Os pesquisadores da época se encantaram com as folhas, as cascas e o odor dos eucaliptos e trouxeram sementes para plantios desse tipo de árvores em jardins botânicos na Europa e *E. globulus* foi sempre muito atrativo por razões estéticas. Sua casca possui coloração e desenhos atrativos, suas folhas jovens são prateadas e o odor de seus óleos essenciais é inclusive medicinal. O eucalipto difundiu-se pela zona litoral mediterrânea para diversos países europeus, entre os quais destaca o Portugal, aonde produtividade florestal do *E. globulus* varia de 15 a 25 m³/ha.ano, embora existam talhões florestais comerciais com valores até mesmo superiores. Apesar dessa produtividade moderada, *E. globulus* possui uma densidade básica mais alta e um menor teor de lignina em sua madeira. Além disso, a qualidade dessa lignina é de mais fácil dissolução pelos processos de cozimento e de branqueamento para fabricação de celulose. O resultado disso é que sua madeira seja talvez a mais admirada para a conversão a celulose, pela facilidade de processamento e pelos rendimentos alcançados.

### 1.3.2. Análise global da expressão gênica

O termo genômica foi primeiramente usado em 1986 para descrever a iniciativa de mapear e sequenciar o genoma humano e, em termos formais compreende o estudo do material genético dos indivíduos (Gupta & Lee, 2007).

O crescimento de arvores e a produção de celulose são resultados do metabolismo celular específico, definido pela programação genética de cada célula; i.e. quais genes expressos em um determinado momento e com uma determinada intensidade. Com a evolução da genômica, diversas metodologias foram desenvolvidas para a análise global da expressão gênica, tais como o differential display PCR (Mullis, 1986), serial analysis of gene expression (SAGE), (Le Dai 2004), as bibliotecas subtrativas (Blumberg and Belmonte 1999) e os microarranjos de DNA (Venkatasubbarao 2004) (Schena, Shalon et al. 1995). Nestes métodos, a expressão de muitos genes é avaliada ao mesmo tempo, permitindo correlacionar expressão gênica global e respostas a estímulos diversos.

Todas estas metodologias objetivam avaliar a transcrição gênica diferencial em tipos diferentes de células ou em células submetidas a diferentes condições, tentando assim correlacionar processos metabólicos com o funcionamento de genes específicos. Em particular, a técnica de microarranjos de DNA tem se mostrado muito poderosa e robusta, gerando um grande volume de dados, e tem sido utilizada com grande sucesso em diferentes espécies de microrganismos, animais ou plantas. (Karp, Grupe et al. 2000); (Eaves, Wicker et al. 2002); (Wayne and McIntyre 2002). Mesmo em eucalipto, estudos recentes baseados nos microarranjos de DNA foram realizados na tentativa de elucidar os mecanismos relacionados com a formação e desenvolvimento do xilema secundário, tendo sido identificado um conjunto de 125 genes preferencialmente expressos em xilema em relação às folhas, com o aumento de expressão desses variando de 1,2 a 43,7 vezes, (Paux, Tamasloukht et al. 2004). Outro estudo usando essa mesma metodologia buscou identificar genes relacionados com o crescimento secundário em híbridos de *E. grandis* x *E. globulus*, sendo que a primeira espécie é conhecida por crescimento rápido e a segunda por madeira de alta qualidade (Kirst, Myburg et al. 2004).

Conforme anteriormente citado, o gênero *Eucalyptus* é composto por mais de 500 espécies. Com toda essa variedade, observa-se uma ampla variabilidade fenotípica, que serve de base para cruzamentos visando o melhoramento genético. Outra vantagem



é o fato do gênero possuir um genoma pequeno, variando de 400 a 700 Mpb dependendo da espécie (Grattapaglia and Sederoff 1994), o que facilita as investigações genômicas. Todas essas características levaram ao sequenciamento do genoma do *E. grandis* pelo Joint Genome Institute, por ser aquela mais cultivada e com maior valor econômico.

Neste contexto se insere o presente estudo que buscará comparar a expressão dos genes relacionados com a formação e desenvolvimento do xilema nas diferentes espécies de eucalipto, tendo como objetivo identificar os padrões que as tornam mais aptas, bem como quais genes relacionados com determinadas características. Essa análise abre a possibilidade da identificação de genes chave que possam ser manipulados, através do melhoramento clássico ou da transgênia, para aumentar o conteúdo relativo de celulose das plantas, incrementando a sua eficiência para processos econômicos.

## **2. Objetivo**

O objetivo principal do presente trabalho é identificar quais os genes relacionados com características específicas de desenvolvimento do eucalipto e da formação de celulose através da comparação da expressão gênica diferencial do xilema de quatro espécies de eucalipto com diferentes capacidades de formação de celulose, com o intuito de obter conhecimentos que possam ser aplicados no melhoramento genético do eucalipto para a produção de biomassa.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Construir microarranjos de cDNA e réplicas para as quatro espécies de eucalipto a serem estudadas.
- Confirmar através de PCR em tempo real a expressão dos principais genes tidos como diferenciais nos microarranjos.
- Traçar um perfil de expressão para os genes da via de lignina nas quatro espécies de eucalipto a serem estudadas.
- Identificar genes chave que possam ser manipulados, através do melhoramento clássico ou da transgênia, para aumentar o conteúdo relativo de celulose das plantas, incrementando a sua eficiência para processos econômicos

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Delineamento experimental

A partir da biblioteca de ESTs do projeto GENOLYPTUS foram selecionadas 500 seqüências de genes candidatos. Foram selecionados genes com funções putativas conhecidas no metabolismo da espécie, e também genes cujas funções ainda não são definidas, com o intuito de associá-los a vias metabólicas determinadas por comparação com os padrões de expressão de genes conhecidos.

Após seleção de 500 genes presentes no banco Genolyptus para estudo da expressão gênica através dos microarranjos, os respectivos clones foram obtidos da biblioteca de ESTs, cedida pelo professor Giancarlo Pasquali. Destes clones foram utilizados 384 genes para a confecção das lâminas por limitação técnica do aparelho Flexys Robot (Perkin Elmer), uma vez que este equipamento utiliza como base para a impressão, o material organizado em placas de 384 poços. Os clones então foram amplificados por PCR, purificados e armazenados em uma placa de 384 poços para impressão das lâminas.

Foram produzidas um total de ~50 lâminas no trabalho, sendo aproveitadas 3 lâminas de marcação simples para cada condição: xilema de *E.grandis*; *E.urophylla*; *E.globulus*; *E.pellita*; folha de *E.grandis*, já que a marcação dupla apresentou problemas devido a diferença de incorporação dos fluóforos.

Para a análise dos resultados, todos os valores de fold-change foram normalizados em relação ao controle positivo ( $\beta$ -actina) e as marcações simples de xilemas das espécies sempre comparadas à marcação simples de folha, sendo possível assim triangular os resultados e verificar a expressão de um gene no mesmo tecido de diferentes espécies de eucalipto em relação a outro tecido (folha) de eucalipto.

#### 3.2. Coleta dos tecidos e extração de RNA

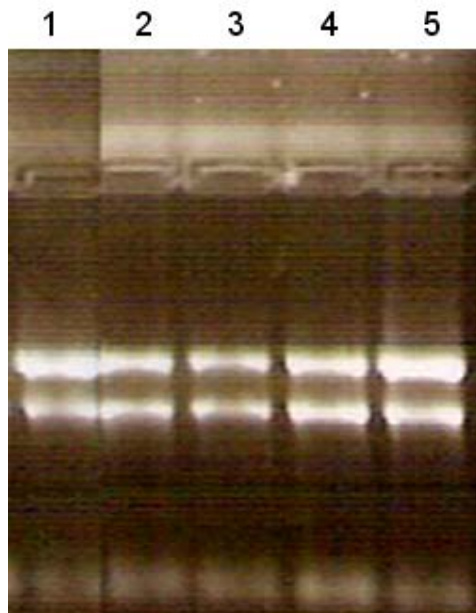
O RNA foi extraído do xilema secundário, região responsável pela formação da madeira, de árvores adultas com três anos de idade, a uma altura aproximada de 1 m do chão. Os tecidos foram coletados na reserva experimental da reserva horto florestal

Barba Negra da Aracruz, em Guaíba, Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Giancarlo Pasquali. Foram isolados os xilemas provenientes das espécies *E. pellita*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*. Como controle experimental, foram coletadas folhas de *E. grandis*. Este material foi processado para a extração de RNA conforme protocolo apresentado a seguir.

### 3.3. Extração do RNA total

O RNA foi extraído de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit “Concert Plant RNA Reagent” (Invitrogen). As amostras de RNA foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A qualidade e integridade dos RNAs foram verificadas em gel desnaturante de agarose-formaldeído e quantificadas por espectrofotometria. A razão A260/A280 foi verificada para garantir a pureza do material. (Sambrook e Russel, 2001). Figura 3



**Figura 3: RNAs totais de: 1. xilema de *E.grandis*; 2. xilema de *E.globulus*; 3. xilema de *E.urophylla*; 4. xilema de *E.pellita*; 5. folhas de *E.grandis***

### 3.4. Amplificação do RNA através de transcrição *in vitro*

Essa amplificação foi baseada no protocolo descrito por GOMES *et al.* (2003).

Para a síntese da primeira fita de cDNA, partiu-se de 2 µg de RNA total de cada tratamento, 0,5 µg de oligo-dT (24) T7 (5'GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG VTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T3') e água tratada com DEPC para volume final de 7 µL. A solução foi aquecida a 70° C por 5 minutos e resfriada em gelo por 1 minuto. Adicionou-se, então, tampão de primeira fita 1X e DTT 10 mM (Invitrogen, EUA), dNTPs 1mM (Amersham Biosciences, EUA), 1,5 µg de oligo TS (5' AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3'), 40 U RNaseOUT (Invitrogen, EUA) e 200 U de transcriptase reversa Superscript II RNase H (Invitrogen, EUA), e incubou-se por 1 hora a 42°C. Após esse período, adicionou-se mais 200 U de Superscript II e incubou-se a 42°C por mais 1 hora.

A segunda fita de cDNA foi sintetizada com o *Advantage Polymerase cDNA PCR kit* (Clontech, EUA). Adicionou-se ao volume total da reação anterior: tampão PCR 1X, dNTPs 0,2 mM (Amersham Biosciences, EUA), 1,4 U de RNaseH (Invitrogen, EUA), e 2,5 µL de Advantage polimerase. Incubou-se a 37° C por 10 minutos para a degradação das fitas de RNA dos híbridos cDNA:RNA, formados na síntese da primeira fita, a 94° C por 3 minutos para a desnaturação das fitas, a 65° C por 5 minutos para o pareamento dos oligos e a 75° C por 30 minutos para a extensão. A reação foi paralisada com a adição de 5 µL de uma solução NaOH 1 M contendo EDTA 2 mM, e incubação a 65° C por 10 minutos. A reação foi purificada com a adição de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e precipitada com 3 volumes de etanol absoluto gelado, na presença de 0,5 volume de acetato de sódio 3 M e 0,1 µg de acrilamida linear (Ambion), durante 1 hora a -80° C. O precipitado foi lavado por 5 vezes com 1 mL de etanol 70% gelado, seco a 42° C e ressuspensionado em 10 µL, volume usado para a reação de transcrição.

A transcrição foi feita com o *kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - T7* (Promega Corporation, USA), usando-se metade dos volumes dos reagentes recomendados pelo fabricante, sem prejudicar a quantidade e a qualidade do RNA amplificado obtido. Aos 10 µL de segunda fita purificada, adicionou-se tampão de reação 1X, rNTPs 7,5 mM, 2,5 µL do mix de enzimas, num volume final de 25 µL. A reação foi então incubada por 6 horas a 37° C. Esse material foi purificado com o reagente Trizol (Invitrogen, EUA) e precipitado com 1 volume de isopropanol e adição

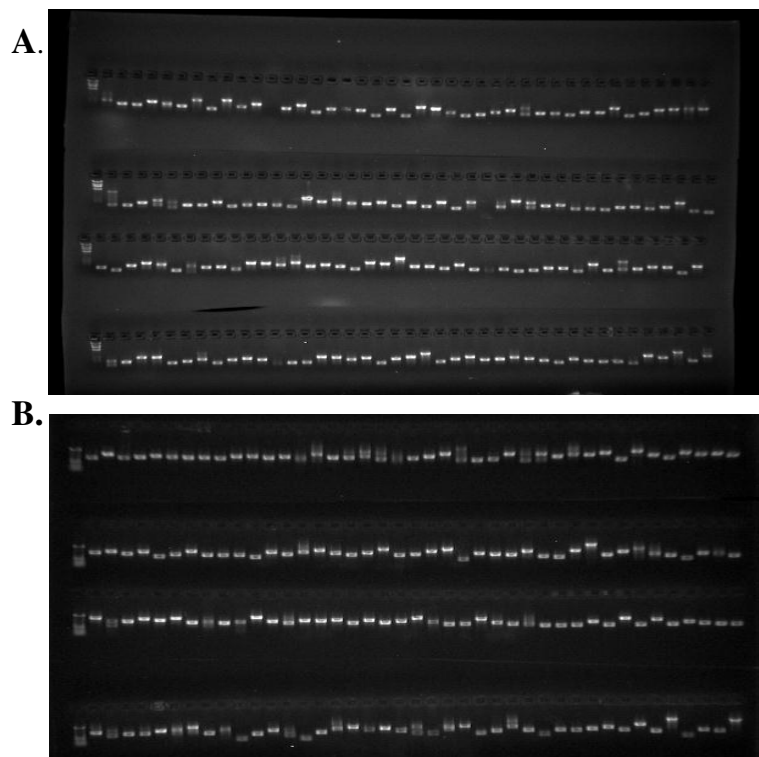
de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 5 mg de glicogênio. O precipitado foi lavado por 5 vezes com 1 mL de etanol 70% gelado, seco a 42° C e ressuspensionado em 6 µL, volume usado no segundo *round* de amplificação, o qual foi semelhante ao primeiro *round*, com algumas modificações. A solução contendo o volume total da reação de transcrição purificada do primeiro *round* (6 µL) e 9 µg de oligo hexâmero randômico (PdN6) foi aquecida a 70° C por 5 minutos e resfriada em temperatura ambiente durante 10 minutos. Adicionou-se então 0,5 µg de oligo-dT (24) T7, tampão da primeira fita 1X, dNTPs 1mM, DTT 10 mM, 40 U RNaseOUT (Invitrogen, EUA) e 200 U de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, EUA), e procedeu-se como no primeiro round. A concentração e qualidade do RNA amplificado (RNAa) foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% - TAE 0,5 X, utilizando-se tampão desnaturante da amostra contendo uréia 7 M, e brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para visualização. A aquisição da imagem foi feita conforme descrito acima.

### **3.5. Produção dos microarranjos de cDNA**

#### **3.5.1. Amplificação dos clones**

A amplificação dos clones da biblioteca de cDNA foi feita através de PCR em placas de 96 poços. Em cada reação foram utilizados 3ul de MgCl<sub>2</sub> 50nM, 10ul de tampão para TAQ polimerase 10X, 1 ul (10pmol) de cada primer M13F/ PUC23 (5'-cccagtcacgacgttgtaaaacg-3') e M13R/PUC23 (5'agcggataacaattcacacagg-3'), 1 ul de TAQ polimerase 5U, 2ul da solução contendo os plasmídeos puros em uma concentração de uso 1/50. Os volumes foram ajustados com H<sub>2</sub>O deionizada para completar um volume final de 100ul. O termociclador foi ajustado com o seguinte programa para amplificação: 94°C- 5min ; 94°C- 30sec; 58°C- 30sec; 72°C- 1min 30sec (30 ciclos); 72°C- 10min. Após o término das reações de PCR, os produtos de amplificação foram inspecionados em gel de agarose 1.5% corado por brometo de etídio.

Após amplificação por PCR, os produtos da amplificação foram avaliados quanto a qualidade e concentração através de eletroforese em gel de agarose, conforme apresentando pela Figura 4.

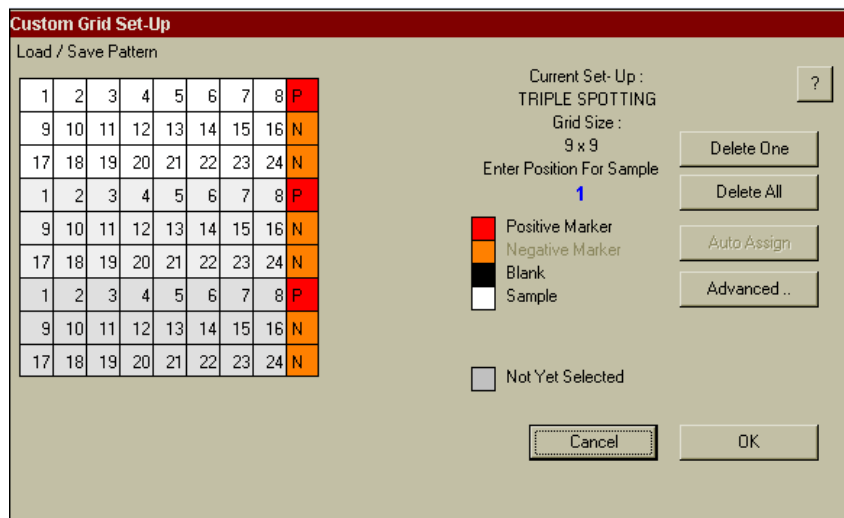


**Figura 4. Produtos da amplificação dos clones por PCR utilizando com os iniciadores universais M13pUC23 F e R. A. Amplificação dos clones 1 a 192. B. Amplificação dos clones 193 a 384.**

### **3.5.2. Impressão das lâminas**

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o sistema Millipore, e concentrados através de evaporação a 37°C por aproximadamente 12 horas. O material seco foi ressuscitado em 10 µl de DMSO a 50%. Previamente a impressão dos clones, as placas de 96 poços contendo os produtos de PCR foram rearranjadas em placas de 384 poços, disposição que atende aos requisitos do equipamento utilizado para a estampagem das lâminas. A transposição desse material atendeu a um mapa de consolidação que permite correlacionar as posições de cada clone em ambos os tipos de placa. A deposição dos clones nas lâminas seguiu um desenho composto por 32 grades 9 x 9, em que foram dispostos os 384 clones, e os controles positivos (beta-actina) e

negativos (DMSO) em triplicata A Figura 5 apresenta a impressão-base utilizada em cada grade.



**Figura 5. Desenho experimental dos sub-arrays (grade), composto de 9 linhas e 9 colunas com as amostras impressas em triplicata ( 1-24) e a disposição dos controles positivo (P) e negativo (N).**

O equipamento utilizado para a construção dos microarranjos foi o Flexys Robot (Perkin Elmer) e, para a digitalização, o scanner GeneTac Microarray Analyzer (Perkin Elmer). O equipamento realizou a estampagem em lâminas de vidro aminosilanzadas (Corning 40003). Após a impressão, as lâminas foram colocadas para secar em bloco invertido a 80°C por duas horas para a fixação definitiva do cDNA à superfície da lâmina..

### 3.5.3. Marcação do cRNA

A 1 µg de cRNA foram adicionados 4 µl oligo dT 100 mM (400 pmol) e aquecido a 70°C por 10 minutos. Depois foram adicionados 6ul de tampão 5X, 3ul de DTT 0,1M, 0,6ul de dNTPs 25mM, 1,5ul de RnaseOUT 40U/ul e 2ul de Superscript 200U/ul, totalizando um volume final de 20ul e aquecido a 42°C por 2 horas. Foram adicionados então 15 µl de NaOH 0,1N, aquecido a 70°C por 10 minutos e adicionados 15µl HCl 0,1N. O material é então passado 1X em coluna Microcon 30 (adicionando



400 µl de H<sub>2</sub>O) e concentrado em 22 µl. Em seguida, este material foi aquecido a 95°C por 5 minutos e adicionado de 20 µl de Random Primer Solution\* 2,5X, 5µl de dNTP Mix para Klenow 0,6mM dCTP, 1,2mM das demais bases, 1µl de Klenow\* 40U/µl e 2µl de Cy3 ou Cy5-dCTP 1nmol/µl, totalizando um volume final de 50µl (\*Kit BioPrime® DNA Labeling System - Invitrogen). A partir do momento da adição dos fluoróforos Cy3 ou Cy5 (Alexa Fluor 555), os tubos foram protegidos da luz, colocados a 37°C por 2 horas, e passados 4X em coluna Microcon 30 (adicionando 400 µl de H<sub>2</sub>O). Deixando o volume final em 10 µl. Após diferenças na incorporação dos fluoróforos, optou-se por fazer apenas lâminas com marcação simples com o fluoróforo Cy3 e comparar a expressão posteriormente por ferramentas computacionais.

#### **3.5.4. Hibridização das lâminas**

À amostra obtida foi adicionado 100µl da solução de hibridação composta de 5X SSC; Denhardt's 4,2X; ssDNA 0,21 mg/ml; SDS 0,42%; Formamida 42% , e colocada a 94°C por 5 minutos, finalmente o material foi colocado sobre as lâminas previamente tratadas e coberta por uma lamínula para garantir o contato completo entre as sondas e o material depositado. O forno de hibridação foi então colocado a 42°C e a hibridação prosseguiu durante 16 horas. Previamente ao processamento digital dos microarranjos, as lâminas foram lavadas em três soluções, respectivamente: 0,1%SDS + 1xSSC (solução 1), 0,2xSSC (solução 2), e 0,05xSSC (solução 3). Os banhos foram realizados imergindo-se a lâmina em cada uma das soluções a temperatura ambiente e agitando-se levemente por cerca de 3 minutos. Após os banhos, as lâminas foram centrifugadas a 1000 rpm por 1 minuto para garantir a secagem completa da sua superfície.

### 3.6. Geração de imagens

As lâminas foram digitalizadas pelo *scanner GeneTAC™* (Genomic Solutions) e analisadas pelo programa *GeneTAC™ Biochip Analyzer* (Genomic Solutions). O sistema de excitação por fonte de luz potente permite estimular separadamente cada sonda fluorescente (580nm para Cy3 e 675nm para Cy5), gerando um canal de imagem para cada uma delas. Assim, foi possível aplicar ferramentas computacionais para extrair informações sobre o padrão de expressão de cada gene sob as condições experimentais amostradas, a partir da razão entre a emissão de fluorescência verde (maior expressão na condição marcada por Cy3) ou vermelha (maior expressão na condição marcada por Cy5) observada em cada posição na lâmina. Os dados gerados foram disponibilizados no formato de tabelas de valores trabalháveis em qualquer editor de planilhas (p.ex., Excel).

### 3.7. Análise dos dados

Após excitação do fluoróforo em comprimento de onda específico (555nm) pelo equipamento GeneTAC Biochip Analyzer (Perkin Elmer), as imagens foram analisadas em função dos sinais fluorescentes emitidos por cada gene nas lâminas. Desta forma, foram coletados os valores de expressão de cada um dos 384 genes estudados nos xilemas das 4 espécies de *Eucalyptus*, bem como em folha de *E. grandis* (referência).

Todos os valores foram normalizados entre as lâminas a serem comparadas, de forma a minimizar variações expúreas (median-normalization). Em seguida, aplicou-se um teste estatístico (adjusted t-test for microarrays) para avaliar a significância estatística da variação de expressão de cada gene nos microarranjos. Estas análises foram realizadas pela bioinformática do LGE, no programa D-maps (D-MaPs – DNA-Microarray Projects; artigo não publicado).

Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram uma variabilidade menor que 5% entre as réplicas ( $p < 0,05$ ) e uma variação da expressão entre as amostras de, no mínimo, 2 vezes ( $fold\ change \geq 2.0$ ).

### 3.8. Northern eletrônico

Os genes identificados como mais expressos nos experimentos, foram selecionados para a análise por Northern eletrônico, que é uma análise computacional que permite inferir a expressão dos genes representados pelos contigs. Cada contig é composto por seqüências vindas exclusivamente de uma única ou varias bibliotecas. Supondo que o ContigX seja composto por 20 seqüências da biblioteca A e 10 da biblioteca B, poderia se dizer que o gene representado teria seu nível de expressão duplicado na biblioteca A em relação a B. Porém, o número total de seqüências que compõe cada biblioteca deve ser considerado, de forma que haja uma normalização do número de seqüências presentes em cada contig em relação ao número total de seqüências de sua biblioteca de origem. Voltando ao exemplo, considerando que, no total, a biblioteca A tem 1000 seqüências e a B apresenta 500, então, o ContigX seria composto por 50% ( $20/1000 = 0.02$ ) de seqüências vindas de A e 50% ( $10/500 = 0.02$ ) de B. portanto, o nível de expressão deste gene seria igual nas duas condições testadas (A e B). A normalização e comparação entre as condições são feitas pelo “Northern eletrônico”. (Audic e Claverie, 1997).

Dentro do projeto genolyptus foi submetido um total de 168105 reads e destes, 125034, apresentaram 250 pb phred > 20 (74.4% de reads válidos), sendo distribuídos nas bibliotecas de acordo com a tabela 1. De acordo com a figura 6; 58% do reads apresentaram hits no blastnr e 42% no hits (e-value de corte  $1e-5$ ). Foram descartados na clusterização 37819 reads (tabela 2), totalizando 40899 clusters sendo 17005 Contigs e 23894 Singlets. A figura 7 mostram as coberturas dos contigs e dos clusters no blastnr respectivamente.

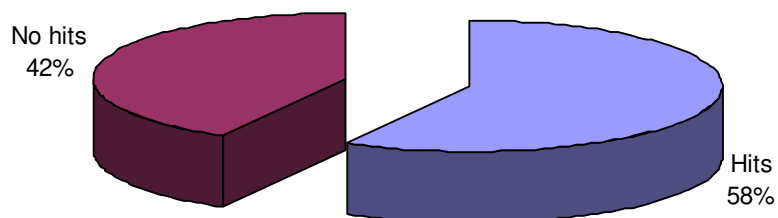
**Tabela 1: Distribuição dos reads gerados pelo projeto genolyptus nas diferentes bibliotecas.**

Código	Descrição	Total submetido	250 pb com phred > 20
BC	Bacterial Artificial Chromosome	24278	18064 (74.4%)
FL	Flower	782	660 (84.4%)
FX	Floema - mistura	15634	12883 (82.4%)
GE	Genômico	10289	6421 (62.4%)
ML	Folha totalmente expandida ( Mature Leaf )	8292	6221 (75%)
PU	Folha jovem naturalmente infectada por Puccinia psidii	9865	8207 (83.2%)
RX	Raiz – mistura	3264	1181 (36.2%)
SE	Plântula ( Seedling )	15814	11322 (71.6%)
TS	Plântula tratada (Treated Seedling)	18250	14016 (76.8%)
XX	Xilema – mistura	288	229 (79.5%)
XY	Xilema ( Xylem )	60364	45030 (74.6%)
YL	Folha jovem ( Young Leaf )	985	800 (81.2%)

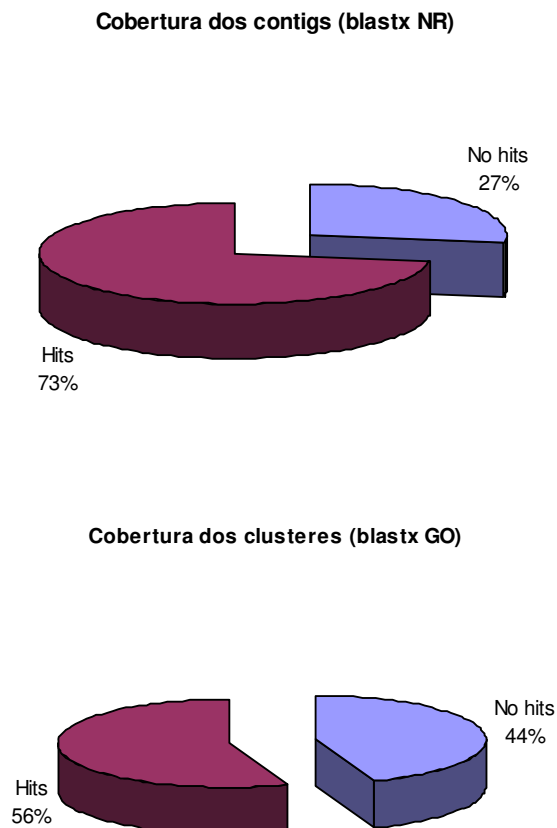
**Tabela 2: Reads descartados na clusterização**

Ribossomais	862
Too short	16265
Poly-A	15947
Quality	4745

**Cobertura dos reads (blastx NR)**



**Figura 6: Cobertura dos reads com NR(e-value de corte 1e-5)**



**Figura 7: Cobertura dos contigs com blastx NR e clusteres com blastx GO.**

### **3.9. Real Time-PCR**

Para validar os experimentos de microarranjo optou-se pelo PCR em tempo real, para isso foram desenhados primers para genes que se mostraram diferencialmente expressos no experimento. Como o PCR em tempo real é uma metodologia muito mais sensível que o microarranjo, sendo capaz de detectar alterações muito mais sutis na expressão de um gene, também foram desenhados primers para todos os genes da via de lignina presentes no microarranjo, mesmo aqueles que não apresentaram expressão gênica diferencial.

Desta forma, além de validar os microarranjos, espera-se apresentar um melhor quadro de expressão para a via de lignina, uma vez que poucas cópias a mais de um

determinado gene podem representar uma mudança considerável na formação da parede celular e xilema secundário dos eucaliptos.

Foram selecionados para o experimento de real-time os seguintes 23 genes: 4-coumarate:CoA ligase (4-coumaric acid:CoA ligase), caffeate *O*-methyltransferase, caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase, chalcone isomerase (chi), chalcone synthase (chs), cinnamate 4-hydroxylase, cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase (ccr), cinnamyl alcohol dehydrogenase (cad), ferulate 5-hydroxylase (ferulic acid 5-hydroxylase) (f5h), Laccase, *p*-coumarate 3-hydroxylase, Peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase (pal), phenylpyruvate aminotransferase, prephenate dehydratase, relacionados com a síntese de lignina, os genes; Heat\_Shock\_protein (hsp), Chaperonin, CyclinA, Elongation factor 3 (ELF3), QM-like protein (PL3d10), EUGR-ML-000-026-C11-BA.R (PL4F2), de acordo com os resultados dos microarranjos, e os genes Ribonucleoproteína L23A (contig 10114) e da Histona H2B (contig 7684) para serem utilizados como *housekeeping* do experimento. Os primers utilizados podem ser visualizados no apêndice 1.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo *User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*, com concentrações finais de 2,5ng/μl de cDNA; 0,2μM de cada primer F e R; 0,1mM dNTPs; 1x Tampão PCR 10x; 1,5mM MgCL2; 8x SYBR green; 0,25U platinum Taq DNA polimerase para um volume final de 15μl. As amostras foram colocadas sempre em duplicatas para cada condição (xilema de *E.grandis*; *E.urophylla*; *E.globulus*; *E.pellita* e folha de *E.grandis*) e feitas réplicas do experimento.

Os resultados foram analisados com o programa Applied Biosystems 7500 Sequence Detection Software Core Application. Sendo verificada a curva de melting

para cada reação no intuito de excluir amplificações inespecíficas e sendo normalizada utilizando o cálculo de delta C(T) como descrito no protocolo citado.

#### **4. RESULTADOS**

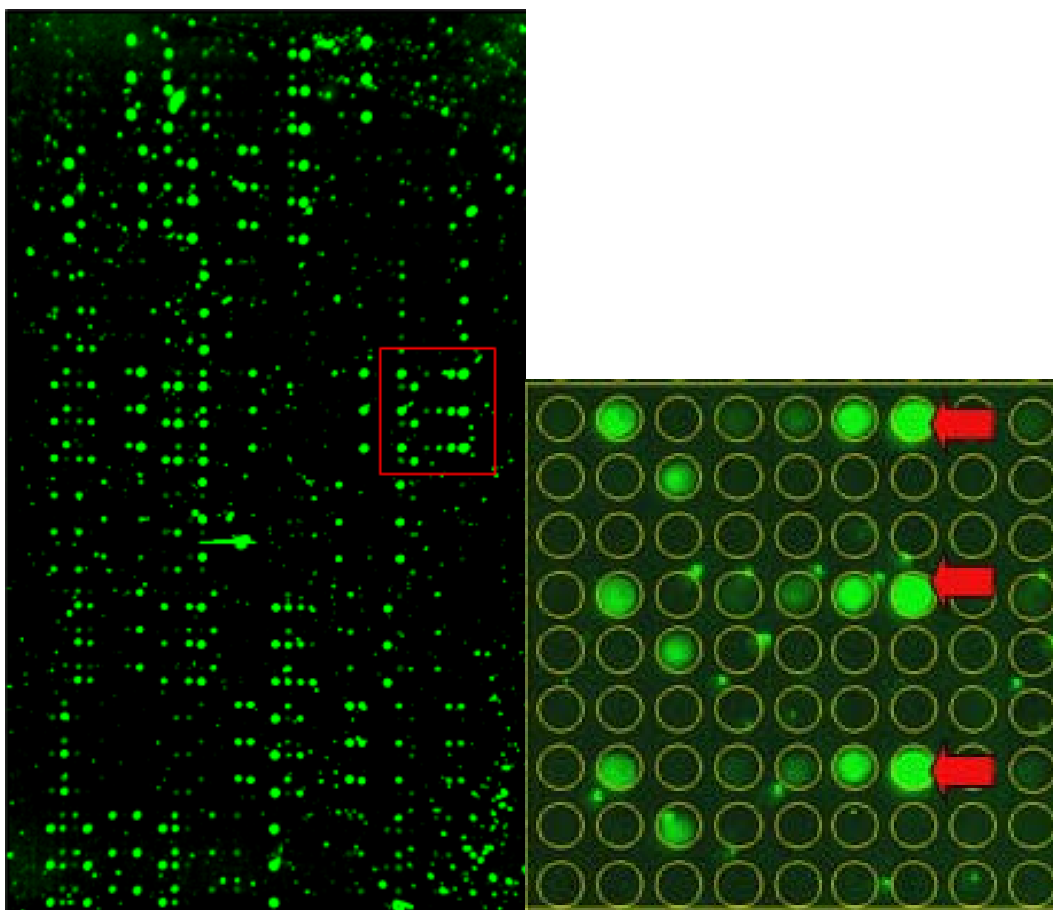
No presente trabalho, foram produzidas ~50 lâminas de microarranjos. Estas lâminas foram utilizadas para a hibridização com as sondas produzidas a partir do RNA proveniente das seguintes amostras: xilema de *E. grandis*, xilema de *E. globulus*, xilema de *E. urophylla*, xilema de *E. pelitta*. Como controle experimental, foi utilizada a sonda proveniente de folha de *E. grandis*.

Com esta estratégia, foi realizado o experimento xilema de *E. grandis* (Cy3) vs folha de *E. grandis* (Cy5) e sua inversão, i.e. folha de *E. grandis* (Cy3) vs xilema de *E. grandis* (Cy5). Cada lâmina foi replicada uma vez, totalizando 4 experimentos. Entretanto, a estratégia de marcação dupla foi posteriormente abandonada por apresentar problemas na execução e reprodutibilidade como, por exemplo, diferenças na incorporação e eficiência de excitação dos fluofóros Cy3 e Cy5.

Dessa forma estes resultados foram complementados com lâminas produzidas a partir da estratégia de marcação simples (sondas sintetizadas somente com Cy3)

Todos os experimentos baseados nos microarranjos foram realizados em triplicata, sendo utilizadas para análise, portanto 15 lâminas.

A Figura 8 apresenta a imagem de um dos microarranjos produzido e o detalhe do grid e das triplicatas.

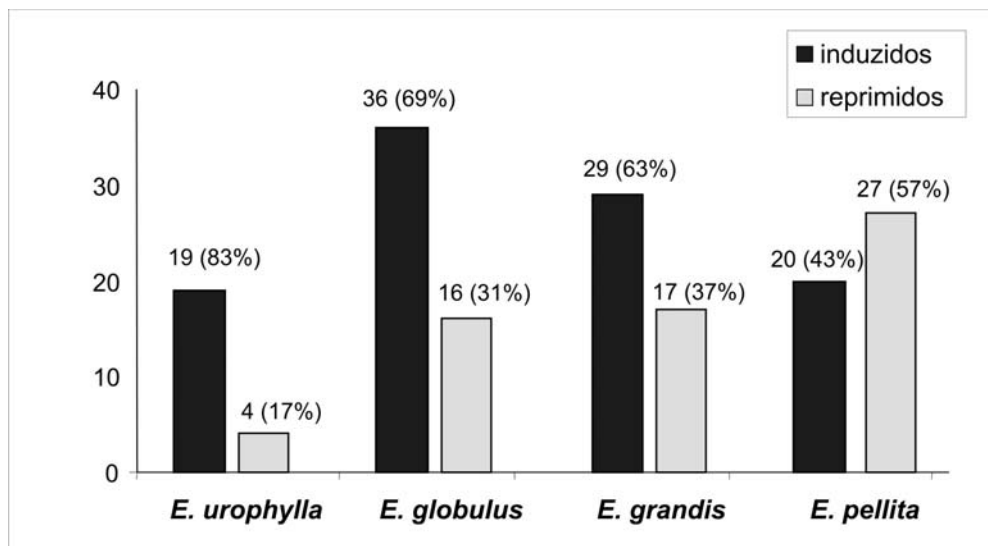


**Figura 8.** Imagem digitalizada de um dos microarranjos produzido, no detalhe o desenho de um grid 9x9 com as setas mostrando as triplicatas internas de cada gene.

#### **4.3. Análise dos dados dos microarranjos**

No total, 131 transcritos (34%) foram considerados diferencialmente expressos na avaliação dos microarranjos (23 em *E. urophylla*; 52 em *E. globulus*, 46 em *E. grandis* e 47 em *E. pellita*, respectivamente em relação à folha de *E. grandis*). Dentro de cada um destes 4 grupos, a proporção entre indução e repressão gênica está apresentada na Figura 9.



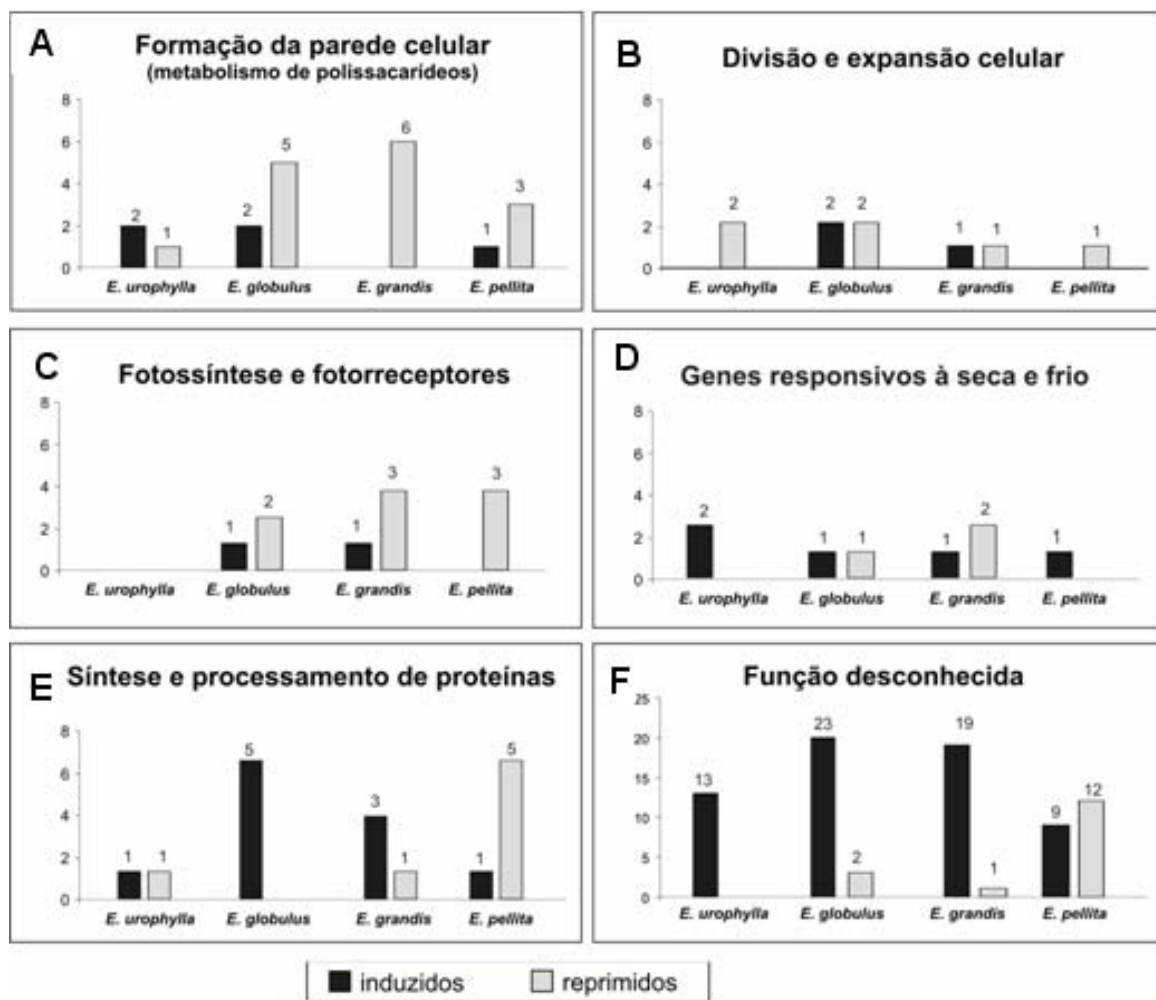


**Figura 9. Proporção entre indução e repressão gênica no xilema das 4 espécies de eucalipto estudadas. São considerados com expressão diferencial os genes que apresentaram fold change  $\geq 2$ ; p-value  $\leq 0,05$**

Conforme a figura 9, quando analisada a expressão gênica em xilema em relação à folha, observa-se que *E. urophylla* apresentou menor modificação da expressão gênica em relação às outras espécies (23 genes diferenciais, contra 52, 46 e 47 para *E. globulus*, *E. grandis* e *E. pellita*, respectivamente). Em relação ao tipo de regulação, enquanto em *E. urophylla*, *E. globulus* e *E. grandis* foram observados mais genes induzidos (83%, 69% e 63%, respectivamente) do que reprimidos, em *E. pellita* esta relação foi inversa, i.e., mais genes reprimidos (57%) que induzidos (43%).

#### **4.4. Análise funcional dos genes diferencialmente expressos em xilema**

Em seguida, foi realizada a anotação funcional dos genes diferencialmente expressos feita manualmente através do Gene Ontology (G.O) nas 4 espécies. A Figura 10 apresenta estes resultados.



**Figura 10: Agrupamento dos genes diferencialmente expressos em grupos de funções através de anotação manual no Gene Ontology.**

De acordo com a Figura 10, observa-se que, agrupando-se os genes diferencialmente expressos por suas funções putativas no metabolismo, verifica-se uma maior representação de genes diferencialmente expressos cuja função é desconhecida, (10F). Neste grupo, *E. pellita* é a única espécie que possui um número maior de genes reprimidos em relação a induzidos.

No grupo de genes relacionados com Síntese e processamento de proteínas (10E), *E. globulus* e *E. pellita* apresentam um quadro de expressão inverso: enquanto em *E. globulus* todos os 5 genes estão induzidos, em *E. pellita* 5 de 6 genes estão reprimidos. Este resultado pode constituir alvo importante para estudos posteriores buscando compreender as diferenças fenotípicas destas duas espécies.

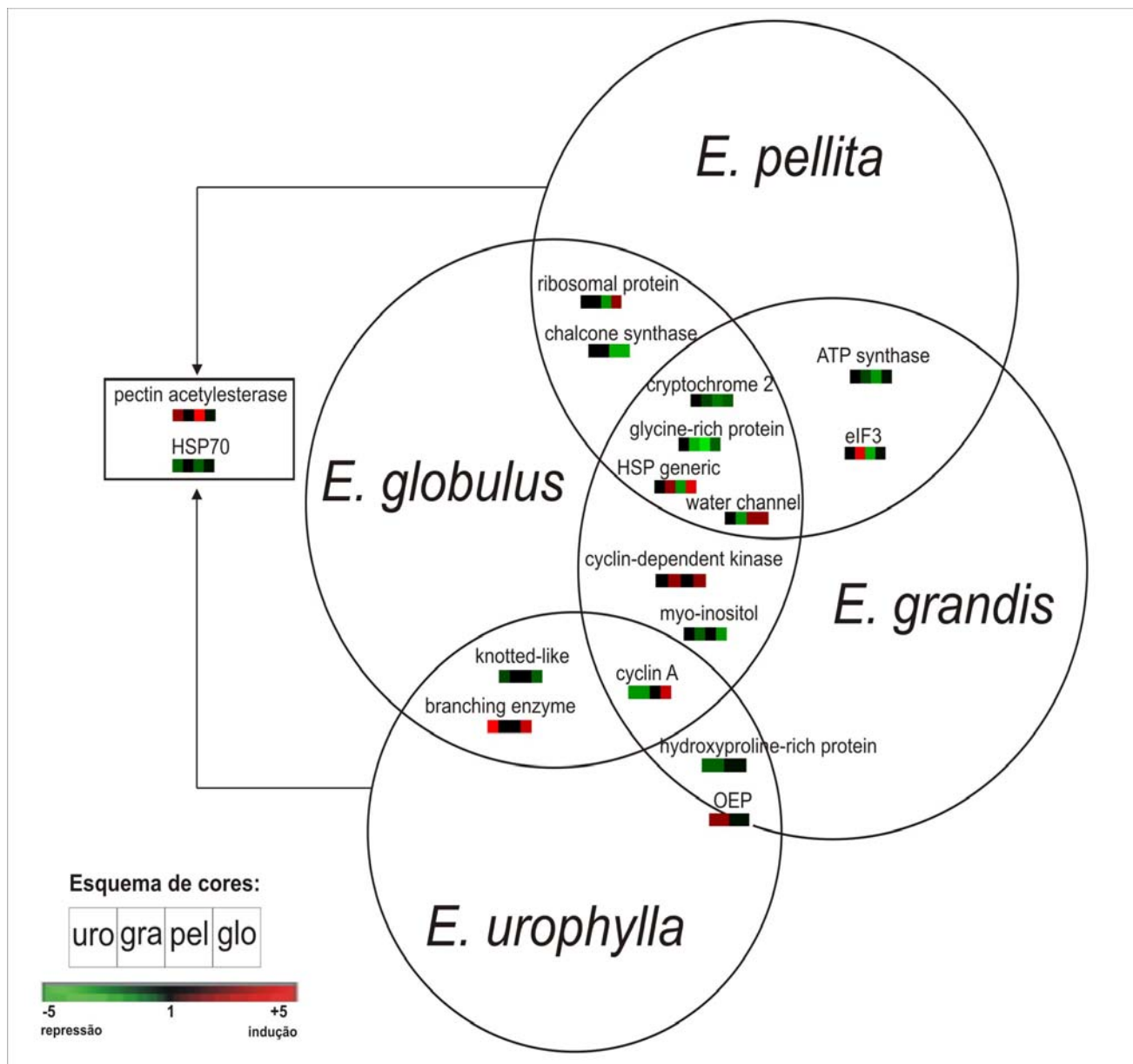
Os genes associados à Fotossíntese e fotorreceptores (10C) aparecem prioritariamente reprimidos no xilema de *E. globulus*, *E. grandis* e *E. pellita*. Nenhum

gene diferencial foi observado em *E. urophylla*. Isto é um resultado esperado uma vez que este metabolismo é prevalente em folhas, portanto serve para fortalecer os resultados dos microarranjos.

Já o grupo de genes envolvidos com a Formação da parede celular (10A) apresentou resultados divergentes quanto ao esperado, já que se imaginava que estes genes estariam mais expressos em xilema em relação à folha. Entretanto, a maior parte destes genes está reprimida em *E. globulus*, *E. grandis* e *E. pellita*. Apenas em *E. urophylla* essa situação se inverte: 2 de 3 genes estão induzidos.

Além disso, obtivemos relativamente poucos genes diferencialmente expressos pertencendo a esta categoria funcional (10A) (3, 7, 6 e 4 genes em *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. pellita*, respectivamente). Uma vez que esta classe de genes possuía grande representatividade nos microarranjos (48 genes ou 12,5% da lâmina), então a expressão constitutiva da maioria deles foi de certa forma inesperada.

Entre os genes diferenciais com identidade conhecida, poucos foram comuns às quatro espécies. A figura 11 apresenta o diagrama da sobreposição de genes em *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla* e *E. pellita*.



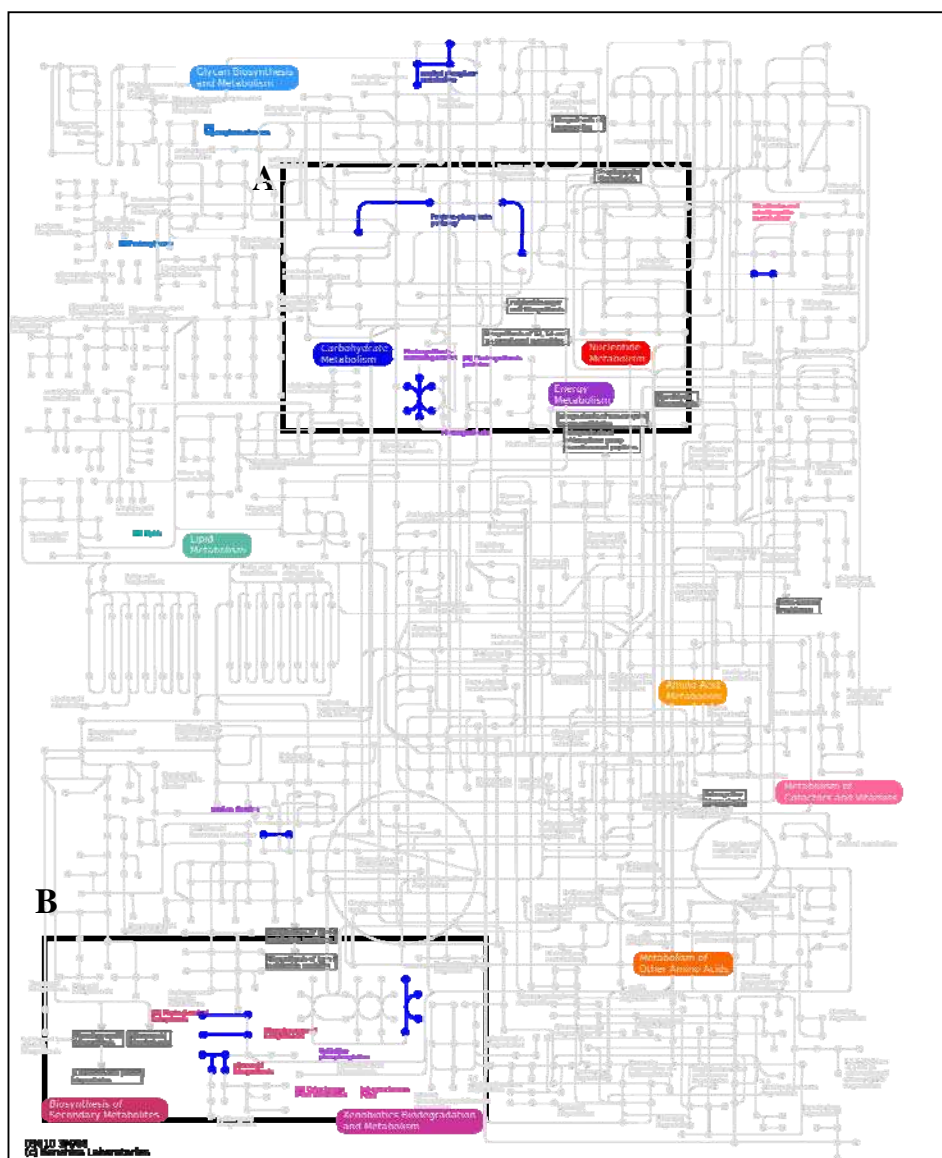
**Figura 11. Diagrama Venn dos genes com identidade conhecida que apresentaram expressão diferencial em mais de umas das 4 espécies estudadas. Genes representados: ATP synthase (d subunit); branching enzyme (N-acetylglucosaminyltransferase family); chalcone synthase; cryptochrome 2 ; cyclin A; cyclin-dependend kinase; eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) ; glycine rich protein; hsp (heat shock protein, generic term); hsp70 (heat shock protein 70) ; hydroxyproline rich protein; knotted-like; myo-inositol-1-monophosphatase; OEP (outer envelope protein, generic term); pectin acetylesterase; ribosomal protein (generic term); water channel protein (putative).**

Conforme representado pela figura 11, existem mais genes comuns entre o xilema das espécies *E. grandis*, *E. globulus* e *E. pellita*, do que entre elas e *E. urophylla*. Em relação às tendências de expressão (indução ou repressão), dos 17 genes

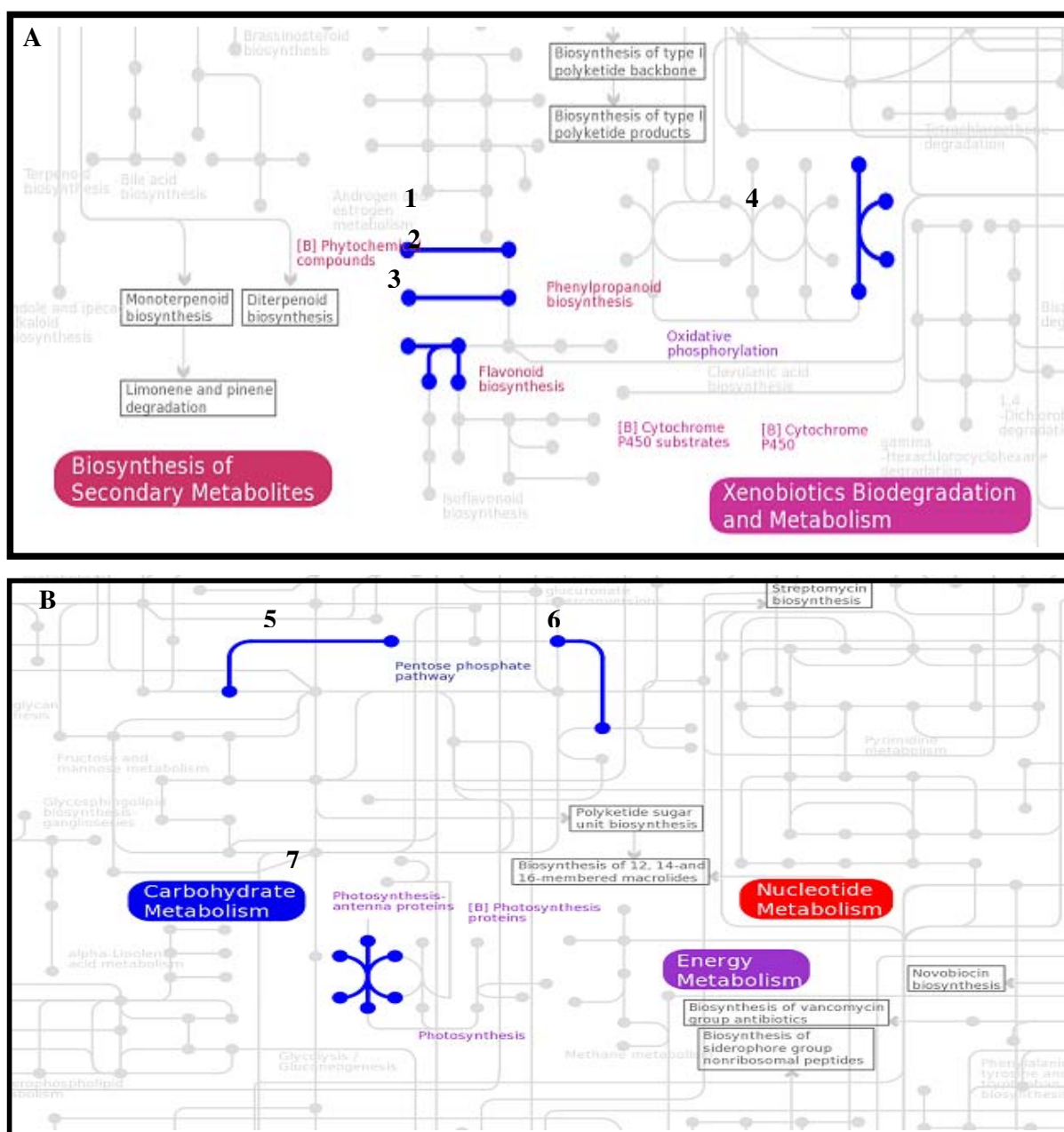
representados, apenas 5 apresentam regulação invertida entre as espécies: o gene *cyclinA* relacionado com divisão e expansão celular (reprimido em *E. urophylla*, *E. grandis* e em *E. pellita* e induzido em *E. globulus*), o gene que codifica uma proteína de transporte de água relacionado com a resposta ao frio e à seca (reprimido em *E. grandis* e induzido em *E. globulus* e *E. pellita*), e três genes relacionados com síntese e processamento de proteínas: o gene *elf3*, que codifica um fator de elongação (induzido em *E. grandis* e reprimido em *E. pellita*), o gene que codifica uma proteína ribossomal (induzido em *E. globulus* e reprimido em *E. pellita*), e o gene que codifica uma proteína de choque térmico (HSP) (induzido em *E. grandis* e em *E. globulus* e reprimido em *E. pellita*).

#### 4.5. Análise das vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos em xilema

Os genes que se apresentaram como diferencialmente expressos foram submetidos ao banco de dados de vias metabólicas e de sinalização do *KEGG*, no intuito de verificar quais estariam sendo reguladas nos xilemas das espécies. As principais vias estão apresentadas na Figura 12 e destacadas nas figuras 12A e 12B



**Figura 12. Esquema geral das vias metabólicas de acordo com o *Kegg Pathways database*. Em destaque os principais agrupamentos de vias com genes diferencialmente expressos.**



**Figura 12A e 12B.** Nos quadros, 12A e 12B, em destaque de azul, estão as vias com os genes diferencialmente expressos nas espécies de eucalipto estudadas.

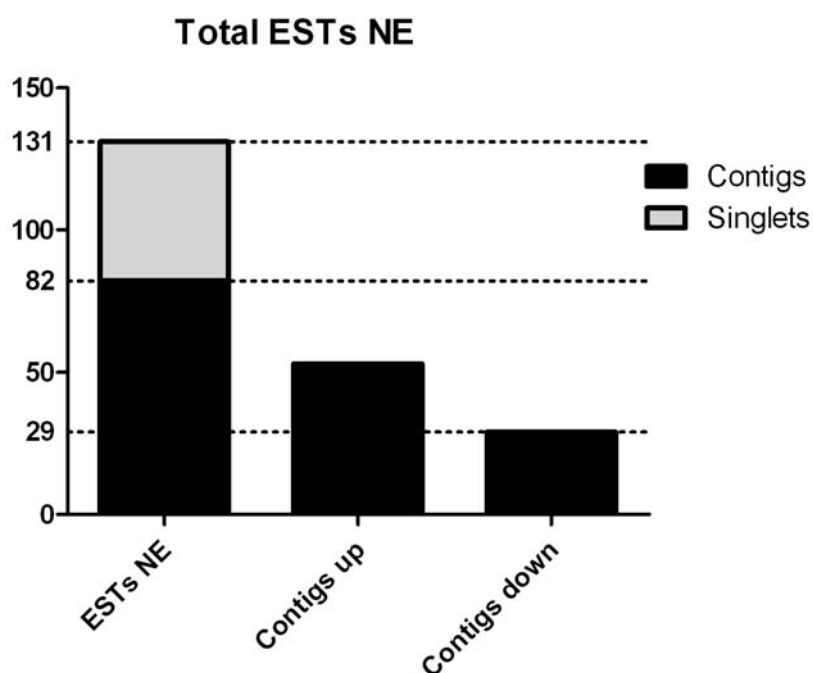
Dentre as vias que apresentaram genes diferencialmente expressos estão a via de xenobiose, e a via de biossíntese de metabólitos secundários - que envolvem a via de formação dos fenilpropanóides e flavonóides (Fig 12.A). Estas duas vias estão intrinsecamente ligadas e possuem diversas enzimas em comum, e sua regulação pode desviar o metabolismo em direção a uma ou outra via. Além destas vias, as via de

metabolismo de carboidratos, de metabolismo de nucleotídeos e metabolismo de energia também apresentou genes diferencialmente expressos (Fig 12.B).

## 4.6. Confirmação da expressão gênica

### 4.6.1. Northern eletrônico

De acordo com a Figura 13, os 131 ESTs que apresentaram expressão diferencial se agruparam em 82 contigs. Ainda houve 49 ESTs que não se agruparam (singlets) e que por consequência não puderam ser analisados por Northern Eletrônico.



**Figura 13: Representação esquemática da expressão dos ESTs diferenciais dos experimentos de microarranjo no Northern eletrônico. Contigs-up, induzidos em xilema; Contigs down, repimidos em xilema.**

Houve uma grande correlação entre os resultados dos microarranjos à expressão por NE, principalmente entre aqueles genes cujos contigs são formados por um número maior de hits,  $N > 10$  e dentre aqueles que estão *up-regulated*, ou induzidos em xilema.

Dentre os contigs com maior expressão por NE estão alguns de interesse para as vias de celulose e lignina e formação da parede celular. O contig11442, com o maior número de hits (766) no NE representa o gene que codifica a enzima cinnamoyl CoA reductase, que é um dos precursores da via de lignina. Nos microarranjos, este gene foi diferencialmente expresso no xilema de *E.globulus* (fold change + 2,6), e no NE



apresentou uma expressão pequena nas bibliotecas de xilema e folha, estando seus hits concentrados na biblioteca de raiz. Apesar disto, este é um gene candidato a estudos posteriores, principalmente devido a sua relação também com a via de flavonoides, que será descrita depois.

O Contig10319 representa o gene que codifica a endo-1,4-beta-glucanase uma enzima essencial à síntese de celulose conforme mostrado em mutantes deste gene, (Molhøj et al., 2002) embora ainda não se saiba exatamente sua função na síntese de celulose.

Quatro reads diferentes dos microarranjos apontaram para o Contig3117 que representa o gene que codifica o fator de transcrição LIM1. Todos esses reads se mostraram diferencialmente expressos no xilema das espécies estudadas, com exceção de *E. pellita*. No NE este contig apresenta uma expressão quase 7 vezes maior em xilema em relação a folha. Este gene está diretamente relacionado com a síntese de lignina, tendo sido descrito como responsável pela regulação transcricional de genes que codificam enzimas pertencentes a esta via (Kawaoka and Ebinuma 2001).

Outro contig importante para a via de lignina é o Contig224, que representa o gene que codifica o fator de transcrição MYB, caracterizado como regulador de genes que codificam enzimas da via de lignina em diferentes espécies vegetais. (Guillaumie S et al 2007; Bedon F et al 2007).

Dentre os genes que se mostraram diferencialmente expressos, mas que não formaram um contig esta o gene da ciclinaA (EUUR-XY-000-014-E02-BA.R) que codifica uma proteína envolvida com divisão e expansão celular. Este gene apresentou-se induzido especificamente no xilema de *E. globulus* (fold change + 5,1) e, curiosamente ao mesmo tempo estava reprimido nos xilemas das outras 3 espécies, sendo assim um potencial alvo para mais estudos sobre sua função e qual o seu papel no metabolismo de *E. globulus* e se está relacionado com características comerciais para a espécie.

Interessante que junto com a expressão diferencial da ciclinaA nos microarranjos, também observamos o gene que codifica uma cinase dependente de ciclina (CDK) (EUUR-XY-001-093-F02-BA.R) diferencialmente expresso em xilema de *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, (fold change +2,5, +2,2, e +2,3, respectivamente) e em *E. pellita* não foi dada como diferencial, mas com um fold change +1,9. Estes resultados podem indicar a importância da expressão dessa CDK no xilema de eucalipto e que poderia estar atuando junto com a ciclinaA no xilema de *E. globulus*.

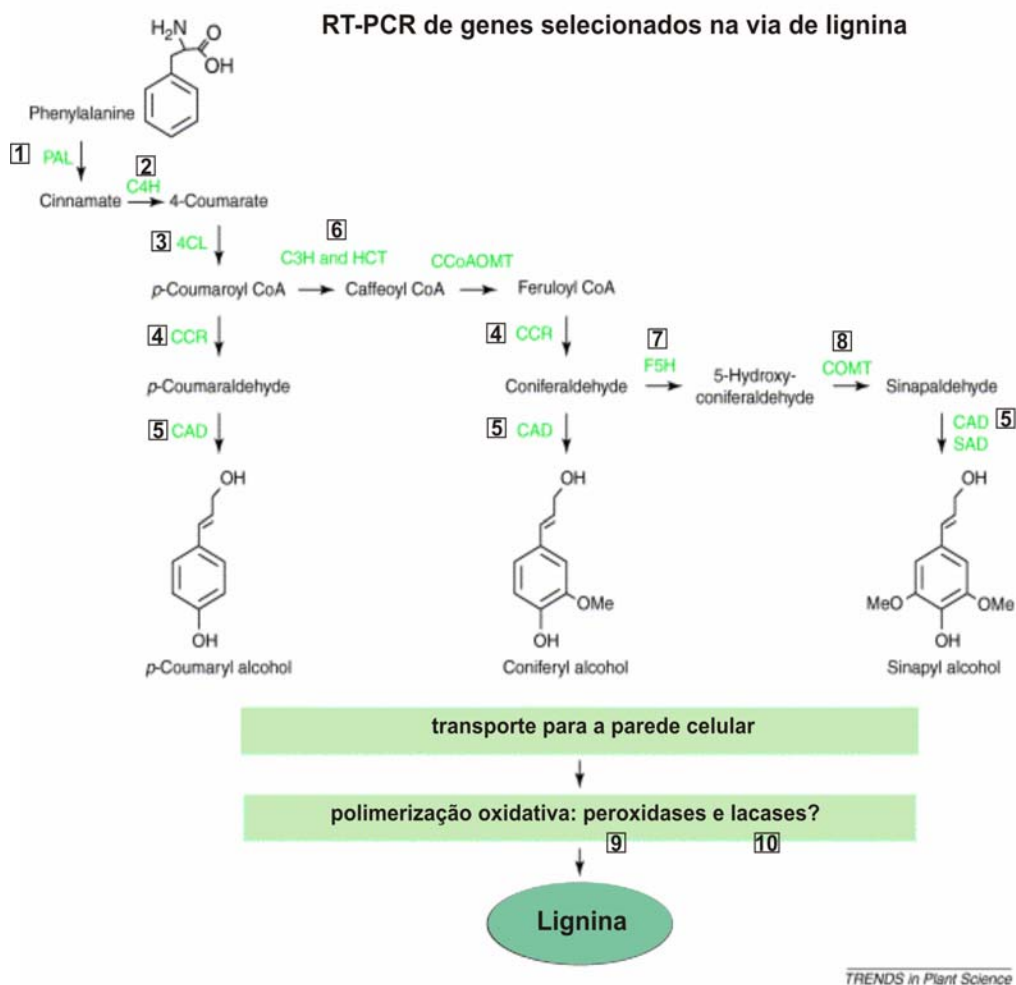
Dessa forma, a análise dos microarranjos junto com a Northern Eletrônico, permitiu identificar possíveis genes candidatos para clonagem e expressão em organismos modelo no intuito de verificar seus efeitos principalmente na biossíntese de celulose e lignina. Entretanto, como o NE apenas indica uma tendência de expressão, e muitas vezes o número de hits de um determinado contig nas bibliotecas é insuficiente para determinar com clareza se a expressão que está sendo apresentada é correlata, foram desenhados primers para a confirmação da expressão por Real Time PCR dos genes que apresentaram os resultados mais interessantes, bem como dos genes presentes na via de formação de lignina. A sequência dos primers pode ser conferida no Apêndice I.

#### **4.6.2. Real Time PCR**

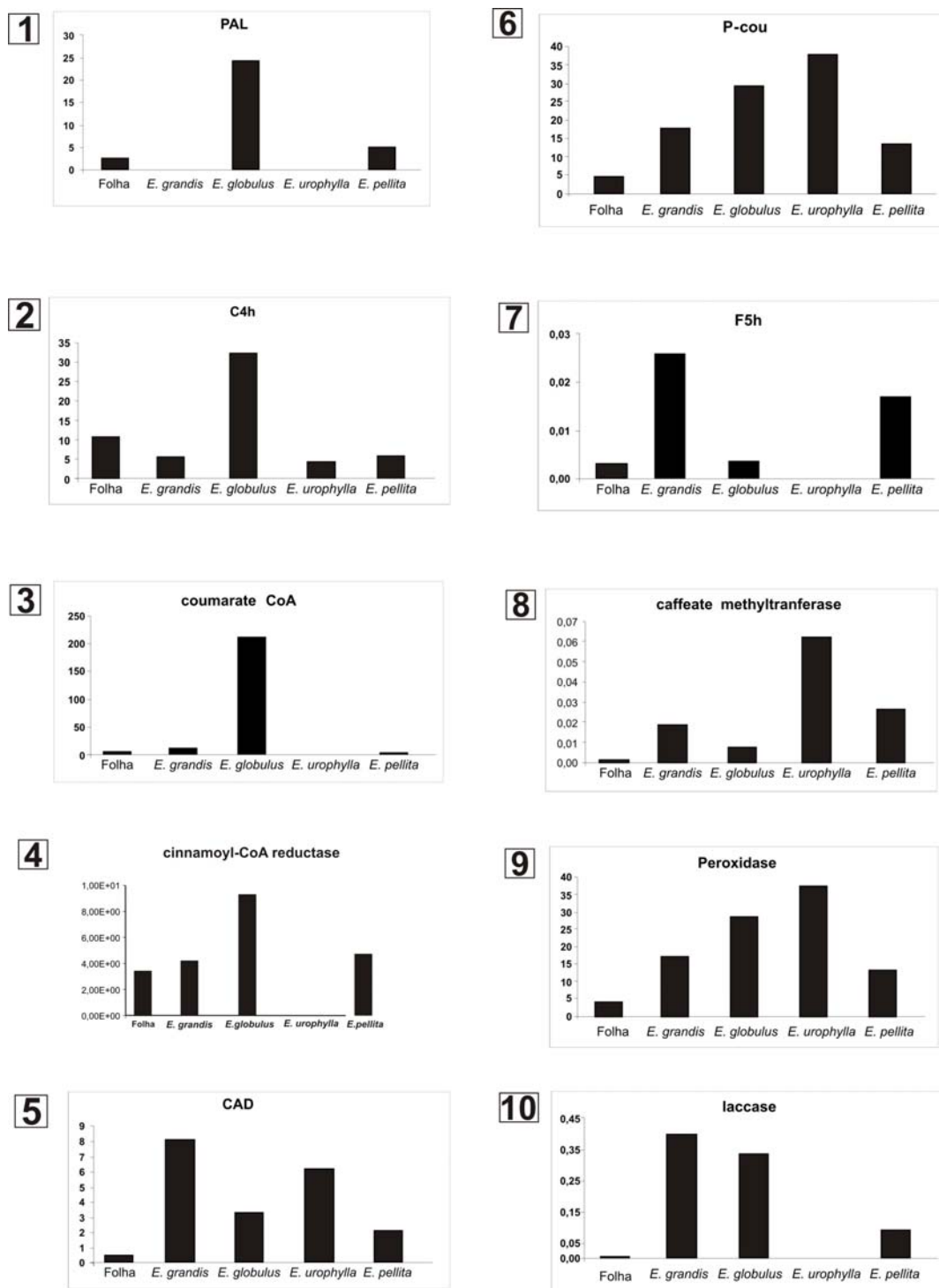
Para validar os experimentos de microarranjo optou-se pelo PCR em tempo real, para isso foram desenhados primers para genes que se mostraram diferencialmente expressos no experimento. Como o PCR em tempo real é uma metodologia muito mais sensível que o microarranjo, sendo capaz de detectar alterações muito mais sutis na expressão de um gene, também foram desenhados primers para todos os genes da via de lignina presentes no microarranjo, mesmo aqueles que não apresentaram expressão gênica diferencial.

Desta forma, além de validar os microarranjos, espera-se apresentar um melhor quadro de expressão para a via de lignina, uma vez que poucas cópias a mais de um determinado gene podem representar uma mudança considerável na formação da parede celular e xilema secundário dos eucaliptos.

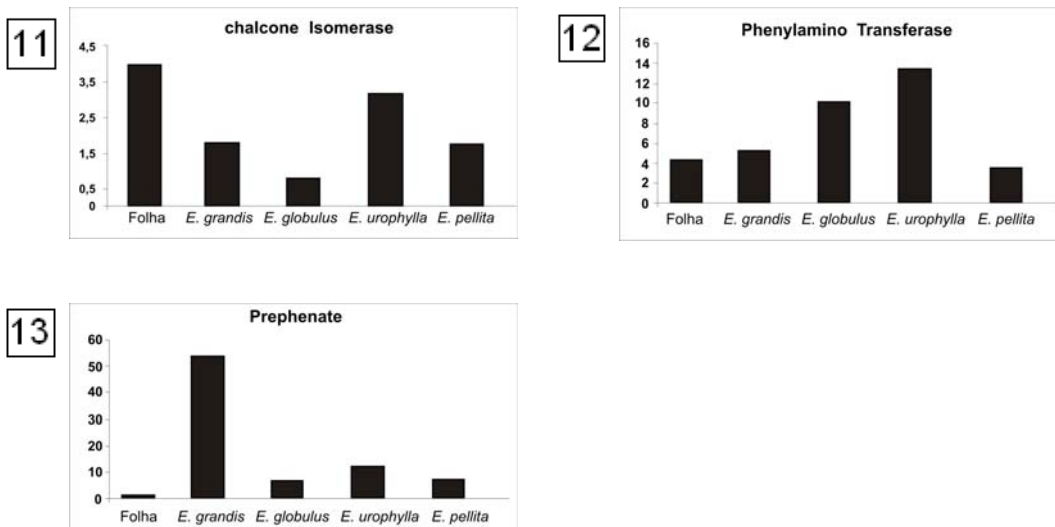
A via de lignina simplificada e os gráficos com os resultados dos experimentos com PCR em tempo real podem ser vistos nas figuras 14, 15, 16 e 17.



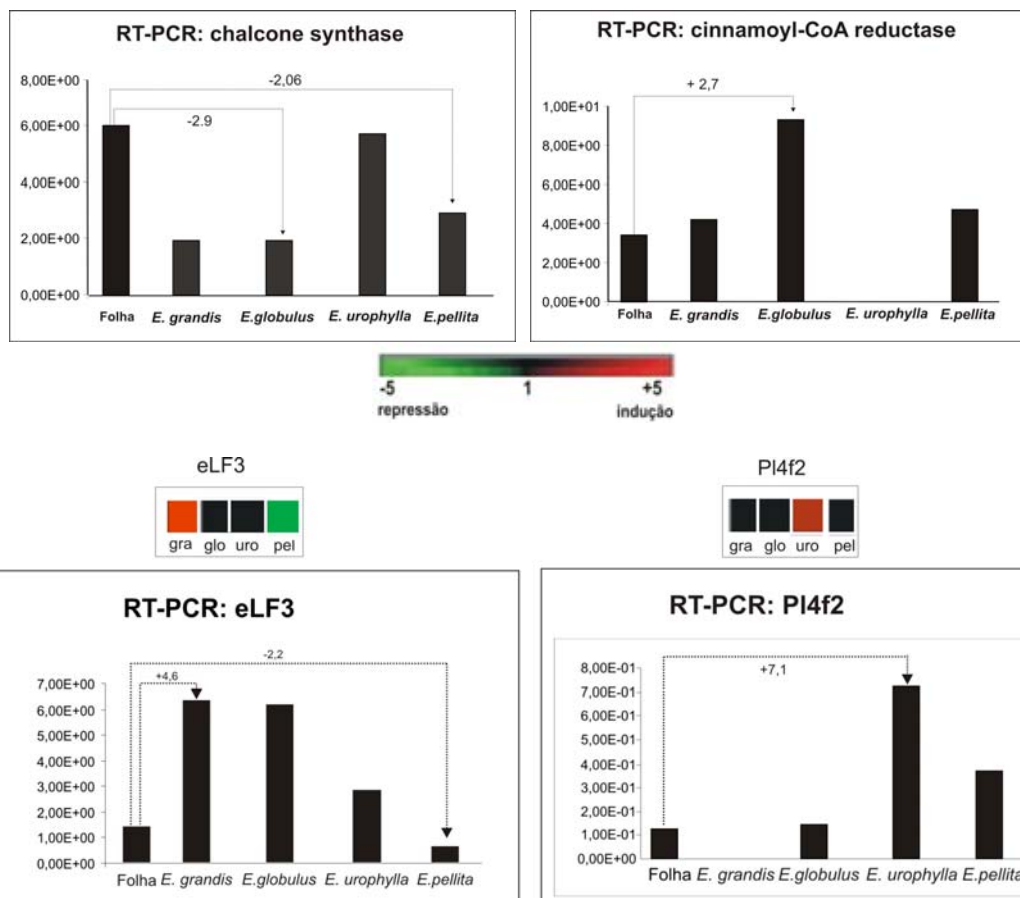
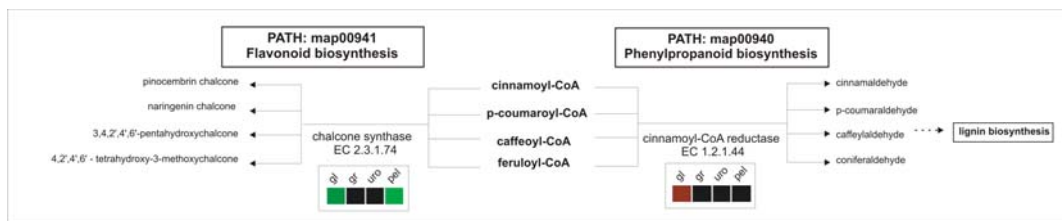
**Figura 14.** Vista simplificada da via de formação de ligninas, genes representados: 1- PAL - *phenylalanine ammonia-lyase*; 2- C4H- *cinnamate 4-hydroxylase*; 3- 4CL - *cinnamate 4-hydroxylase*; 4- CCR- *cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase*; 5- CAD- *cinnamyl alcohol dehydrogenase*; 6- C3H - *p-coumarate 3-hydroxylase*; 7- F5H- *ferulate 5-hydroxylase*; 8- COMT- *caffeate O-methyltransferase*; 9- *Peroxidase*; 10- *Lacase*. Modificado de Boudet et al, 2003.



**Figura 15: Resultados de RT-PCR para genes da via de lignina representados na figura 14.**



**Figura 16: Resultados de RT-PCR para genes da via de lignina não retratados na figura 14. Genes: 11-Chalcone isomerase(CHI); 12-Phenylpyruvate aminotransferase; 13-Prephenate dehydratase**



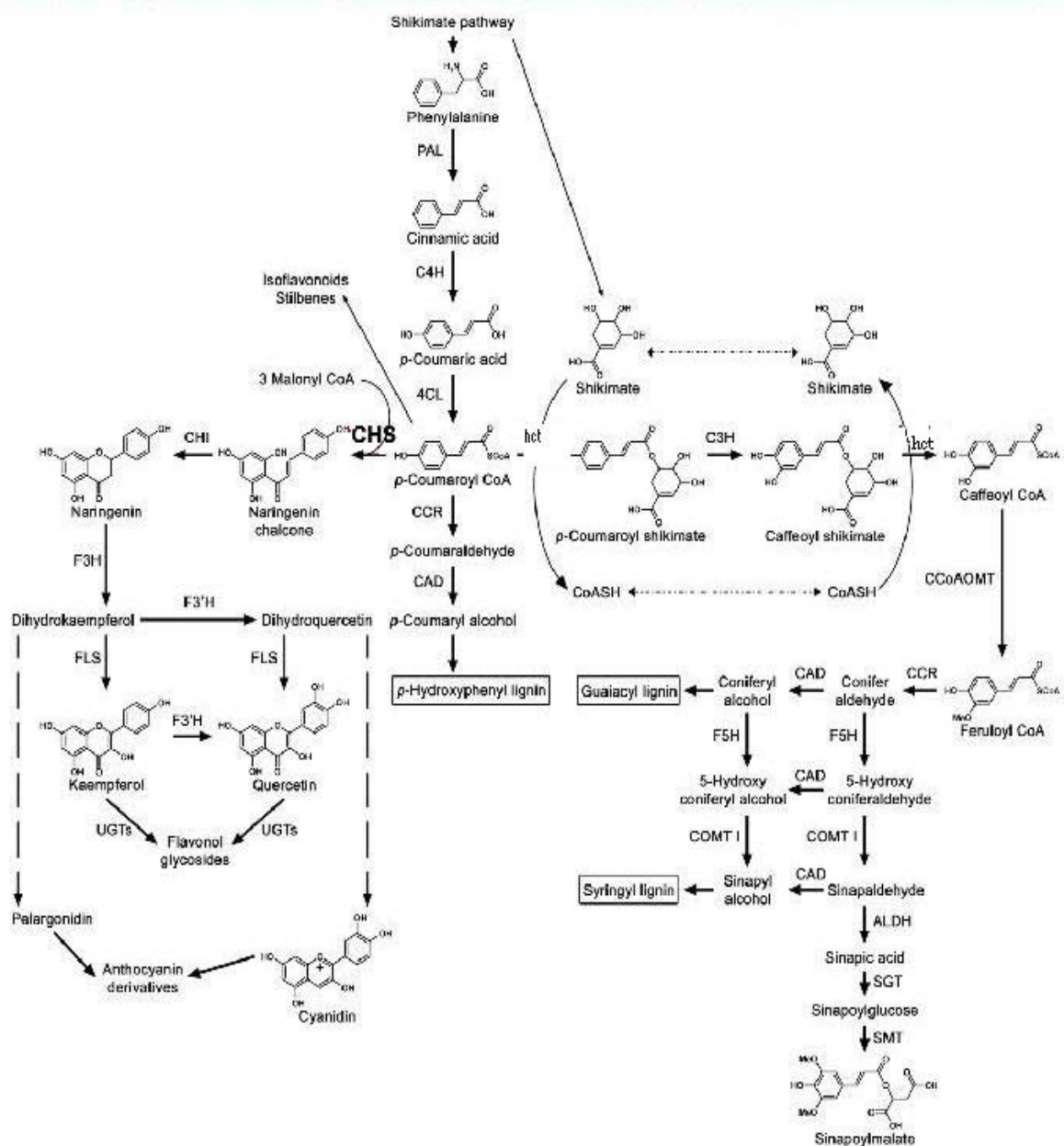
**Figura 17. Genes utilizados para a validação dos experimentos de microarranjo: chalcone synthase; cinnamoyl-CoA reductase; EUGR-ML-000-026-C11-BA.R (no hit PL4F2); elongation factor 3 (elf3). O gráfico de barras mostra a expressão dos genes no RT-PCR e o gráfico de cores a expressão dos mesmos nos experimentos de microarranjo.**

Os resultados dos experimentos com PCR em tempo real para os genes que participam da via de síntese de lignina mostraram grande correlação quanto ao resultado esperado em relação a sua expressão em tecido de xilema com folha, segundo sugerido pelo NE e microarranjos. Os genes phenylalanine ammonia-lyase (pal); phenylpyruvate aminotransferase; cinnamyl alcohol dehydrogenase (cad); prephenate dehydratase; ferulate 5-hydroxylase (F5H); caffeate *O*-methyltransferase; *p*-coumarate 3-hydroxylase (p-cou); Laccase; 4-coumarate:CoA ligase; peroxidase e cinnamoyl-CoA reductase, todos apresentaram expressão maior em xilema em relação a folha, enquanto o gene C4H se apresentou mais expresso em xilema de *E. globulus*, mas apresentou um ligeiro aumento na expressão de folha em relação ao xilema das outras espécies. Da mesma forma, os genes chalcone sintase e chalcone isomerase que regulam a síntese de chalcone e naringenin, flavonoides intermediários da síntese de lignina, se apresentaram mais expressos em folha e reprimidos em xilema.

Da mesma forma, a expressão foi correlata quando comparados com os resultados dos genes que se mostraram diferencialmente expressos nos experimentos de microarranjos, no gene PL4F2 – induzido em *E. Urophylla* (fold-change 3,4 nos microarranjos e 7,1 no RT-PCR) - no gene ELF3 - induzido em *E. grandis* (fold-change 4,9 nos microarranjos e 4,6 no RT-PCR) e reprimido em *E.pellita* (fold-change -2,6 nos microarranjos e -2,2 no RT-PCR) – e nos genes da via de lignina chalcone synthase reprimido em *E.globulus* ( fold-change -2,61 nos microarranjos e -2,9 no RT-PCR) e *E.pellita* ( fold-change -3,01 nos microarranjos e -2,06 no RT-PCR) e cinnamoyl-CoA reductase induzido em *E.globulus* ( fold-change 2,63 nos microarranjos e 2,7 no RT-PCR).

As vias de flavonoides e fenilpropanoides estão intimamente relacionadas tendo enzimas e intermediários em comum. (Figura 15) Assim, os resultados dos experimentos de PCR em tempo real permitiram traçar um perfil de expressão dos principais genes relacionados com a síntese de phenylpropanoides e ao mesmo tempo aumentar a robustez dos dados de microarranjos.

Estes resultados mostram indícios de que a via de flavonóides pode atuar de forma decisiva na regulação da via de lignina. Tendo estes resultados sido observado em *E. globulus*, que possui características favoráveis da madeira, como menor quantidade de lignina e maior relação entre lignina S/G, além de uma maior concentração de celulose, pode estar aí a chave para o entendimento da diferença entre as madeiras dos diferentes tipos de eucalipto estudados.



**Figura 18: Vista conjunta das vias de flavonoides e lignina.** ALDH, *aldehyde dehydrogenase*; C3H, *p-coumarate 3-hydroxylase*; C4H, *C4-hydroxylase*; F5H, *ferulate 5-hydroxylase*; CAD, *cinnamyl alcohol dehydrogenase*; CCoAOMT, *caffeoyl-CoA O-methyltransferase*; CCR, *cinnamoyl-CoA reductase*; CHI, *chalcone isomerase*; 4CL, *4-coumaroyl-CoA ligase*; COMT I, *caffeic acid O-methyltransferase*; F3H, *flavanone 3-hydroxylase*; F3'H, *flavonoid 3-hydroxylase*; FLS, *flavonol synthase*; HCT, *hydroxycinnamoyl-CoA shikimate*; PAL, *phenylalanine ammonia lyase*; SGT, *sinapate UDPglucose sinapoyltransferase*; SMT, *sinapoylglucose malate sinapoyltransferase*; UGTs, *UDP sugar glycosyltransferases*. (Retirado de Besseau, 2007)



## 5. DISCUSSÃO

### Diferença de expressão entre as espécies e o fenótipo:

A diferença de proporção entre os genes induzidos e reprimidos observadas entre as diferentes espécies pode ser explicada pelas diferenças fenotípicas. Muitos dos genes selecionados para os microarranjos estão envolvidos com características de interesse comercial do eucalipto e, dentre as espécies estudadas, *E. pellita* é aquela que possui menor valor comercial, já que possui alta quantidade de lignina, funcionando dentro do experimento como uma amostragem do que não se deseja para a espécie. *E. grandis* e *E. urophylla* são espécies mais parecidas fenotipicamente e também as mais plantadas no Brasil devido a sua adaptabilidade, e *E. globulus* é aquela que possui as melhores características para a indústria de celulose, como menor quantidade de lignina e relação S/G maior, o que permite uma deslignificação mais fácil da celulose e por consequência mais barata. No entanto, *E. pellita* possui um índice volumétrico muito inferior a *E. grandis* e *E. urophylla* e consequentemente uma menor produção de celulose por hectare plantado. Assim, analisando o total dos genes induzidos e reprimidos percebe-se uma semelhança entre o perfil de indução e repressão das espécies economicamente interessantes, *E. urophylla*, *E. globulus* e *E. grandis*, onde mais genes estão induzidos do que reprimidos, enquanto que em *E. pellita* prevalece um maior número de genes reprimidos. Todas as espécies estudadas apresentaram ao menos 20 genes induzidos enquanto que a variação dos genes reprimidos foi muito maior, com *E. urophylla* apresentando apenas 4 genes reprimidos. Porém, *E. urophylla* também apresentou a menor quantidade de genes diferenciais (n=23). No geral, a expressão das espécies *E. globulus* e *E. grandis* se mostrou muito semelhante, apresentando sempre uma quantidade parecida de genes induzidos e reprimidos em cada grupo das funções estudadas, esses dados sugeremmostram que a diferença entre o índice volumétrico da madeira, superior em *E. grandis*, pode estar relacionada com os diferentes genes regulados em cada grupo estudado.

Dentro dos experimentos de microarranjos poucos genes relacionados diretamente com a formação da parede celular se mostraram diferencialmente expressos (figura 9), sendo este um dos grupos funcionais para qual foi selecionado um maior número de genes dentro do experimento (n=48) esperava-se uma maior quantidade de genes diferencialmente expressos em xilema. Já entre os genes de função desconhecida observa-se um grande número de genes diferencialmente expressos em todas as

espécies, sendo um resultado esperado já que estes genes não devem pertencer a uma única categoria. O perfil de expressão em que estes genes se apresentaram mostra uma diferença notável entre *E. urophylla*, *E. globulus* e *E. grandis* em relação a *E. pellita*. Enquanto as três primeiras apresentam mais genes induzidos do que reprimidos, *E. pellita* possui mais genes reprimidos que induzidos. Percebe-se em *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla* um grande número de genes induzidos cuja função ainda não é conhecida, sugerindo que no xilema destas espécies existe a ativação de mecanismos ainda desconhecidos. Teoricamente, estes mecanismos podem estar relacionados com o desenvolvimento do xilema, seja a processos diretamente envolvidos com a qualidade da madeira, como o depósito de polissacarídeos e a formação da rede intrínseca de celulose, hemicelulose e lignina, ou ainda a processos indiretos ainda desconhecidos.

Esse dado junto com a pouca quantidade de genes diferencialmente expressos no grupo de genes relacionados com a formação da parede celular corroboram com a idéia de que é possível que as diferenças fenotípicas na madeira das quatro espécies analisadas se sustente em vias alternativas do desenvolvimento celular, e não tanto na via do desenvolvimento da parede celular em si, já que *E. pellita* é a espécie que possui maior quantidade de lignina em relação a celulose e a única em que o perfil de expressão de genes com função desconhecida apresentou mais genes reprimidos do que induzidos.

É importante ressaltar também que os resultados dos microarranjos precisam sempre ser comprovados por outra técnica independente como Northern blot, ou PCR em tempo real, como foi feito para alguns genes neste trabalho, já que como toda técnica experimental os microarranjos de cDNA possuem limitações que afetam a sua confiabilidade como a geração de artefatos e detecção de falso positivos.

#### **As vias de metabolismo de flavonoides e a lignina.**

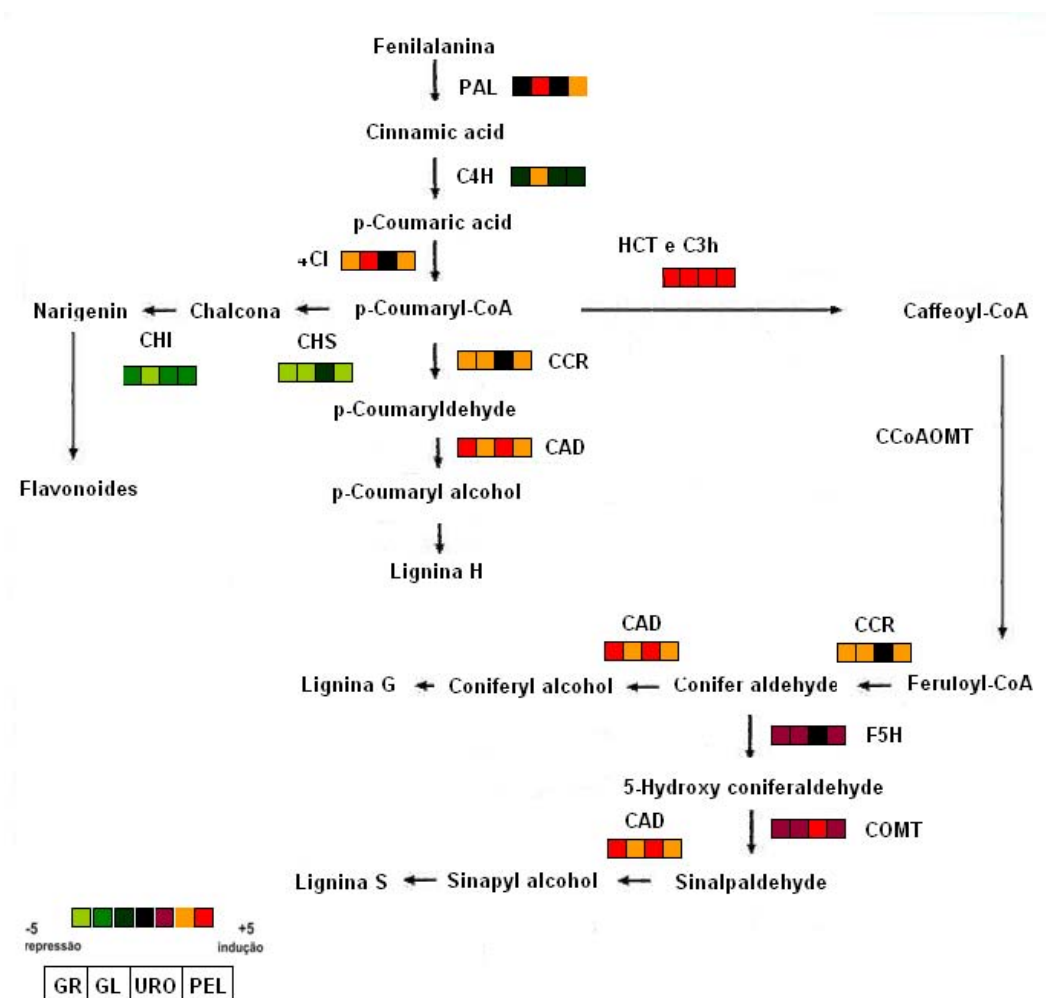
As vias de flavonoides e fenilpropanoides estão intimamente relacionadas tendo enzimas e intermediários em comum. Os flavonóides chalcone e naringenin são intermediários do metabolismo de fenilpropanoides em plantas sendo estes sintetizados pelas enzimas chalcone sintase (CHS) e chalcone isomerase (CHI) respectivamente e existem estudos mostrando que estes flavonoides impedem o crescimento de diferentes plantas inibindo a síntese de *monolignols*, (Chen. W, 2005), estes flavonóides atuam inibindo enzimas da via de ligninas como a 4Cl e a PAL que junto com a C4H,

participam do início da via, antes de ser determinado qual sentido da via será expresso, se flavonóides ou fenilpropanóides, como dentro da via de lignina qual tipo desta será formado. A repressão do gene 4Cl em aspen, promoveu além da repressão da síntese de lignina, acúmulo de celulose e crescimento, sem alterar a relação S:G da lignina mas levando ao aumento da presença de esters de ácido hidróxicinâmico. Isto acontece pelo posicionamento do gene 4Cl na via, controlando o influxo de compostos fenólicos para a formação de lignina S ou G. (Hu W. J, 1999).

Todas as enzimas citadas foram estudadas nos experimentos de microarranjo e de PCR em tempo real, estando nos microarranjos os genes codificadores para chalcone sintase (CHS) reprimida em *E. globulus* e em *E. pellita* e o gene codificante da enzima cinamoyl-coA-reductase (CCR) diferencialmente expressa e induzida em *E. globulus*. Na análise do northern eletrônico, o gene codificador da CCR apresentou o contig com maior número de hits (766), enquanto que os outros três genes codificadores para enzimas que participam do início da via, 4CL, PAL e C4H, não se mostraram diferencialmente expressas nos microarranjos. Porém, no PCR em tempo real todos se mostraram induzidos principalmente em *E. globulus*, (fold-change 54!, 9,71 e 3,01 respectivamente; Figura 15) bem como os genes para chalcone isomerase e a chalcone sintase se mostraram reprimidos. Nas outras espécies de eucalipto estudadas houve uma indução mais moderada dos genes do início da via de lignina junto com uma também repressão mais moderada dos genes da via de flavonóides em relação a *E. globulus*. A maior expressão dos genes do início da via em *E. globulus* pode significar que para haver uma maior taxa de lignina S em relação a G, seja necessária a formação de um maior número de substrato mais rapidamente, favorecendo assim um desvio da via para a formação de lignina S já que os genes codificantes das enzimas no fim da via apresentaram expressão parecida dentro das espécies. Figura 19.

Dessa forma, os resultados mostram indício de que a indução dos genes do início da via de ligninas juntamente com a repressão dos genes que atuam na síntese de flavonóides possa ser a chave para a constituição da lignina em *E. globulus* não tanto pela sua menor quantidade total relativa, mas por sua constituição aonde existe uma quantidade maior de lignina S em relação à lignina G, o que permite uma deslignificação mais eficiente da celulose e conseqüentemente menor custo de produção. Assim sendo, uma maior expressão dos genes que codificam para estas enzimas pode estar de alguma forma desviando a via de lignina para a formação de lignina S em detrimento da lignina G e constituem um excelente alvo para experimentos

futuros de clonagem e expressão, sendo também possível o estudo da expressão destes genes e de possíveis alterações morfológicas na planta, através da aplicação de chalcona e narigenim como estratégia de manejo para verificar seu efeito sobre a espécie.



**Figura 19: Vista conjunta das vias de flavonóides e lignina, com a representação da expressão dos principais genes da via através de RT-PCR. Genes representados: PAL - *phenylalanine ammonia-lyase*; C4H- *cinnamate 4-hydroxylase*; 4Cl - *cinnamate 4-hydroxylase*; CCR- *cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase*; CAD- *cinnamyl alcohol dehydrogenase*; C3H - *p-coumarate 3-hydroxylase*; F5H- *ferulate 5-hydroxylase*; COMT- *caffeate O-methyltransferase*; CHS- *chalcone sintase*; CHI- *chalcone isomerase*. GR – *E.grandis*; GL – *E.globulus*; URO – *E.urophylla*; PEL - *E.pellita***

### Genes com expressão invertida nas espécies de eucalipto:

Dentro dos micorranjos alguns genes exibiram perfis de expressão que mereceram uma maior atenção, principalmente aqueles genes já com uma função determinada no metabolismo da planta e que mostraram expressão diferencial não apenas em relação ao tecido folha, mas entre uma espécie e outra. Cinco genes com esse perfil de expressão foram identificados sendo eles o gene da ciclinaA relacionado com divisão e expansão celular que está reprimido em *E. urophylla* em *E. grandis* e em *E. pellita* e está induzido em *E. globulus*; o gene codificador para uma proteína de transporte de água relacionado com a resposta ao frio e a seca que está reprimido em *E. grandis* e induzido em *E. globulus* e *E. pellita*; e três genes relacionados com síntese e processamento de proteínas: o gene *elf3*, um fator de elongação que está induzido em *E. grandis* e reprimido em *E. pellita*; o gene de uma proteína ribossomal que está induzido em *E. globulus* e reprimido em *E. pellita*; e o gene de uma proteína de choque térmico (HSP) que está induzido em *E. grandis* e em *E. globulus* e reprimido em *E. pellita*.

Ciclina são proteínas altamente conservadas que ativam kinases-dependentes (CDKs) para regular o ciclo celular, transcrição e outros processos celulares, mas é sabido que os complexos ciclina- CDK controlam processos fora do ciclo celular como o metabolismo de fosfatos e de açúcares, estando assim envolvidos com a progressão celular sem ser essenciais para o ciclo celular (Andrews and Measday, 1998). Também não se sabe ao certo qual ciclina ativa determinada CDK, sendo cada ciclina responsável por ativar diferentes CDKs.

**Tabela 2: Fold-Change dos genes codificantes para a ciclina A e kinase dependente de ciclina (CDK) nos microarranjos de eucalipto.**

	Fold change no Microarranjo						Função		
	Grandis	Globulus	Urophylla	Pellita	Read ID				
ciclinaA	5,1	-4,2	-3,9	-2,1	EUUR-XY-000-014-E02-BA.R		Divisão e expansão celular		
CDK	2,5	2,2	2,3	1,9	EUUR-XY-001-093-F02-BA.R		Sinalização celular		

Ao fato da ciclinaA estar induzida no xilema de *E. globulus* e reprimida nos outros xilemas e em folha, associa-se o gene de uma CDK que assim pode estar agindo em conjunto com esta ciclinaA no xilema de *E. globulus*. As proteínas codificadas por estes genes podem desempenhar funções que devem ser específicas para essa espécie que é a que possui maior quantidade de celulose no xilema dentre as espécies estudadas, sendo assim um alvo primário do estudo de clonagem e expressão. Infelizmente, os primers desenhados para este gene para o experimento de Real-time não foram capazes

de amplificar um fragmento específico, além de ser um *singlet* nas análises de northern eletrônico, impossibilitando assim a obtenção de mais informações sobre sua expressão.

O read correspondente ao gene codificador da proteína de transporte de água (EUUR-XY-000-010-G05-BA.R) na análise do northern eletrônico se agrupou ao contig 221, um dos mais expressos dentre os diferenciais na biblioteca de ESTs com 91 hits e expressão condizente com o resultado do microarranjo, já que quase 47% dos hits foram encontrados na biblioteca de xilema e nenhum foi encontrado em folha. Apesar deste transcrito estar relacionado com a resistência ao frio e a seca, como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica que se liga firmemente a celulose e impede a expansão da parede. Dessa forma, proteínas de transporte de água podem estar envolvidas no processo de lignificação e também constituem um alvo para futuros estudos de expressão.

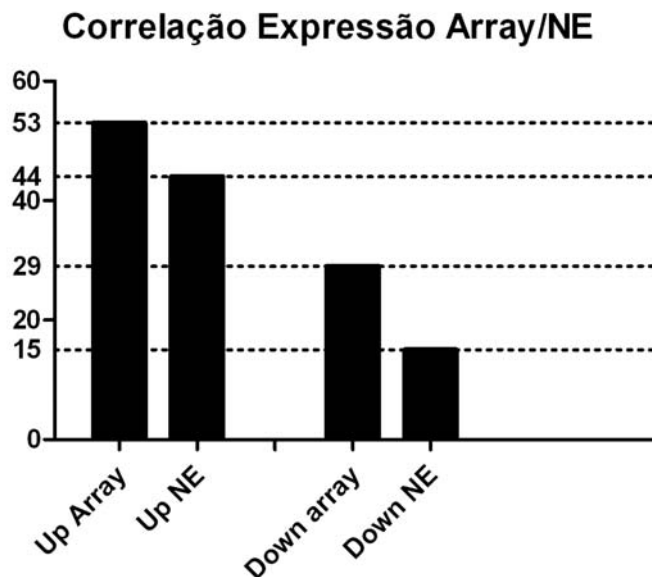
O grupo que apresentou mais genes com expressão diferencial invertida entre as espécies estudadas foi o de síntese e processamento de proteínas com três genes. Mais interessante, nas análises dos microarranjos, este grupo também apresentou expressão diferencial em boa parte dos seus genes, mais notadamente cinco genes induzidos em *E. globulus*, três induzidos e um reprimido em *E. grandis* e cinco genes reprimidos em *E. pellita*, de um total de apenas 17 genes estudados. O gene codificador para o *eucaryotic elongation factor 3* (Elf3e), ainda tem sua função individual exata incerta, embora se saiba que esta envolvido com a regulação da tradução, sendo essencial em *arabidopsis*. (Yahalon.A, 2008). Nos experimentos realizados, observamos que está induzido em *E. grandis* e reprimido em *E. pellita*, e no northern eletrônico o contig 3112 associado se apresentou mais expresso em folha com 32% dos hits contra 14% em xilema, embora a baixa quantidade de hits (total n=7) não seja representativo o suficiente para uma análise mais exata de sua expressão, já o experimento de real-time confirmou a expressão dos microarranjos, com uma maior expressão em *E. grandis* e estando reprimido em *E. pellita* além de se mostrar também induzido nos xilemas de *E. globulus* e *E. urophylla*. Genes com esse perfil de expressão em particular, induzido em *E. globulus*; *E. grandis*; e *E. urophylla*, e reprimidos em *E. pellita*, são particularmente interessantes por *E. pellita* ser a única das espécies estudadas que não tem interesse para a produção de celulose. O gene HSP (heat shock protein) também apresentou esse perfil de expressão, estando seu contig 14832 com 43% em folha e 32% em xilema, mas também com um número pequeno de hits total (n=7) para ser representativo. Infelizmente o par de primers desenhados para esse gene não funcionou no experimento

de real-time e novas tentativas devem ser feitas. Já o gene de uma proteína estrutural do ribossomo apresentou expressão diferencial induzida em *E. globulus* e reprimida em *E. pellita* e seu contig correspondente apresentou expressão constitutiva para os dois tecidos com 13% dos 17 hits em cada.

Estes resultados indicam este grupo de genes como fortes candidatos a terem participação na diferença fenotípica das espécies estudadas.

### **Outros Genes northern eletrônico:**

Houve uma maior correlação entre a expressão dos microarranjos e do Northern Eletrônico, principalmente com aqueles reads que possuem uma maior quantidade de hits nos contigs,  $N \geq 10$ , já que reads com poucos hits dentro das bibliotecas podem não significar uma expressão precisa daquele gene, e estes reads com menos hits devem ser analisados com mais cuidado. Houve também uma maior correlação entre os reads que estavam up-regulated, ou induzidos nos xilema nos microarranjos. Isto provavelmente por que existe uma maior quantidade de ESTs na biblioteca de xilema (60364), do que na de folhas (8292); (tabela 1), o que pode estar gerando análises menos precisas pelo NE para os genes induzidos em folha. Figura 20.



**Figura 20: Correlação entre a expressão dos reads nos microarranjos e no Northern Eletrônico.**

Quatro reads diferentes dos microarranjos apontaram para o Contig3117 que codifica o fator de transcrição LIM1, todos esses reads se mostraram diferencialmente

expressos no xilema das espécies estudadas com exceção de *E. pellita*. No NE este contig apresentou uma expressão quase 7 vezes maior em xilema em relação a folha, e esta diretamente relacionado com a síntese de lignina, tendo sido descrito como responsável pelo controle de diferentes genes da via estando plantas transgênicas de tabaco contendo o antissense Nt lim1 apresentaram expressões reduzidas das enzimas PAL; 4Cl e CAD com redução de 27% da lignina total, (Kawaoka and Ebinuma 2001). Estes dados condizem com os resultados dos microarranjos aonde dos quatro reads que se agruparam no contig LIM1 diferencialmente expresso em xilema, três se apresentaram em *E. globulus*: EUSP-FX-001-011-G09-BA.R; EUUR-XY-000-029-G05-BA.R; EUUR-XY-000-091-D09-BA.R, com fold change 2, 2 e 2,9 respectivamente, e as enzimas PAL; 4Cl e CAD também apresentaram expressão diferencial no xilema desta espécie de acordo com o RT-PCR. (Figuras 15).

Outros contigs importantes para a via de lignina são aqueles codificadores, para fatores de transcrição da família MYB, amplamente identificado e caracterizado como regulador da via de lignina em diferentes espécies vegetais. (Guillaumie S et al 2007; Bedon F et al 2007), atuando como regulador positivo de praticamente todos os genes específico da via de *monolignols* em eucalipto, (Goicoechea, M. et al 2005). Os contigs 224(13 hits), 761(7 hits), 2929(4 hits), 13228(3 hits) e 15473(2 hits) todos foram identificados como dessa família e com exceção do primeiro se apresentaram mais expressos em xilema pela análise do northern eletrônico, embora todos eles tenham uma quantidade de hits pequena. Diferentemente do fator de transcrição lim1, estes fatores de transcrição se apresentaram diferencialmente expressos nos microarranjos de todos os xilemas com exceção de *E. globulus*, demonstrando assim uma tendência de que o fator de transcrição lim1 esteja atuando primariamente nessa espécie enquanto o MYB seja comum a mais espécies.

O Contig10319 expressa a endo-1,4-beta-glucanase que é uma enzima essencial na síntese de celulose, como mostrado em mutantes com ausência de função deste gene (Molhøj et al., 2002), embora ainda não se conheça exatamente sua função na síntese de celulose. No northern eletrônico esse contig obteve 30 hits sendo 41% deles na biblioteca de xilema contra nenhuma na biblioteca de folha, já nos microarranjos apresentou-se diferencialmente expresso em xilema de *E. globulus*.

As enzimas da família GH1 (glycosyl hydrolase family 1; uma delas representada pelo contig 1391) já foram identificadas como precursora de diferentes processos biológicos em plantas acreditando-se inclusive que possa participar na



lignificação e remodelação da parede celular ajudando no transporte dos precursores dos *monolignols* (Dharmawardhana, 1995). Dos 28 hits do contig no northern eletrônico 31% estão representados em xilema contra nenhum em folha, e nos arrays este gene está diferencialmente expresso no xilema de *E. globulus*, corroborando para uma possível atuação da enzima codificada com processos moleculares específicos do xilema.

O fator de transcrição bZIP representado pelo contig 16317 apresentou 20 hits na biblioteca de ESTs, estando 29% destes em xilema contra nenhum em folha, além de estar diferencialmente expresso em xilema de *E. globulus* nos microarranjos. Sabe-se que este fator de transcrição tem sua expressão também induzida por luz, especialmente um elemento *cis* chamado de Box II que atua no promotor da enzima chalcone sintase, envolvida na via de ligninas e flavonoides já descrita e que também se mostrou induzida no xilema de *E. globulus*, vindo este a ser mais um possível fator de transcrição envolvido com funções específicas no xilema de *E. globulus*. (Rook, 1997).

#### **Genes com função não determinada:**

Além dos genes relacionados com as vias de formação de celulose, lignina, flavonóides e aqueles que apresentaram expressão diferencial invertida entre as espécies de eucalipto estudadas, uma grande quantidade de genes ainda sem função determinada com exatidão no metabolismo da espécie, apresentou expressão diferencial em um dos tecidos estudados. Todas essas vias, especialmente a síntese de celulose, são processos metabólicos ainda não totalmente elucidados e a participação de novos genes em sua composição não seria uma surpresa. Além disso, o melhoramento genético do eucalipto não se restringe apenas a uma maior quantidade de celulose ou menor de lignina, mas há também outras características importantes que devem ser levadas em consideração, tais como rápido crescimento, resistência a pragas e a condições desfavoráveis. Desta maneira, a expressão de genes ainda sem função determinada pode levar ao elucidamento de varias características da planta que podem ser aprimoradas por transgenia.

Genes como o contig 11754, que codifica para uma proteína ribossomal QM-like, foi um dos que se apresentou com maior número de hits na biblioteca de ESTs (68 hits), e ambos os reads designados a ele se mostraram diferencialmente expresso em xilema de *E. grandis*. Homólogos desse gene foram encontrados em diversas espécies de eucariotos, mas a sua importância funcional implicada por esta alta conservação

ainda não foi elucidada em plantas. (Loftus, 1997). Primers para este gene também foram desenhados para experimento de PCR em tempo real, mas a amplificação não foi obtida e o resultado do experimento foi inconclusivo.

O contig 7356 relacionado com o gene de uma proteína de sinalização de etileno (EIN3-like protein) apresentou 22 hits na biblioteca de ESTs com maior expressão em xilema (20%) contra folha (12%), e nos microarranjos esteve diferencialmente expresso nos xilemas de *E. globulus* e *E. urophylla*. Este gene codifica para um regulador positivo de etileno, hormônio com papel importante em diversos processos de crescimento e desenvolvimento da planta e deve ser estudado com maior profundidade (Iordachescu e Verlinden, 2005).

Muitos destas seqüências com função inderteminada quando do início do trabalho não tinham sequer identidade conhecida sendo apenas inseridas no banco de dados manualmente após a conclusão deste. Estas foram então identificadas através do Blastnr, e podem ser conferidas ao fim do apêndice 2.

## CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que diferentes genes estão diferencialmente expressos nas espécies estudadas, sendo uma grande proporção deles com função ainda desconhecida no metabolismo. Dentre as espécies estudadas *E. grandis* e *E. globulus* foram as que mais se assemelharam quanto ao perfil dos seus genes expressos; *E. urophylla* foi a que apresentou a menor quantidade de genes diferenciais e *E. pellita* foi a espécie que apresentou o perfil de expressão mais distinto, especialmente quanto aos genes com função desconhecida aonde apresentou muitos mais genes reprimidos do que induzidos, ao contrário do que aconteceu com as outras espécies.

Muitos dos genes investigados neste trabalho foram selecionados por suas funções relacionadas com características importantes do ponto de vista comercial para a planta; assim, a semelhança entre o perfil de indução e repressão dos genes dentro das espécies consideradas comerciais (*E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla*) e a diferença destas em relação a *E. pellita*, podia ser esperada, corroborando assim que a análise global da expressão gênica diferencial é uma técnica robusta que permite identificar genes e vias metabólicas envolvidas com as características da parede secundária do eucalipto.

Poucos genes relacionados diretamente com a formação da parede celular e muitos genes de função desconhecida se mostraram diferencialmente expressos. Assim a diferença fenotípica das espécies e, principalmente a qualidade e composição da sua madeira, pode estar sustentada não necessariamente nos genes de desenvolvimento da parede celular em si, que apresentam expressão constitutiva dentre os tecidos estudados, e sim naqueles genes pertencentes possivelmente a outras vias como a de síntese e processamento de proteínas, bem como genes ainda não relacionados ao desenvolvimento da parede celular e ou ao crescimento da planta.

A análise da via de metabolismo de ligninas através do PCR em tempo real, realizados após os experimentos de microarranjos, mostrou que em *E. globulus* existe uma forte indução dos genes do início da via, juntamente com a repressão de genes da via de flavonoides, sendo que estas vias compartilham enzimas e intermediários. Estes resultados podem ser a chave para entender os motivos que levam à formação de um determinado tipo de lignina, aonde a quantidade de substratos, de enzimas e afinidades destas levaria a formação da lignina S ou G de acordo com sua disponibilidade. Assim sendo, este metabolismo seria chave para sua exploração por técnicas de transgenia com o intuito de melhoramento genético do eucalipto.

Dentre os genes com função já conhecida, aquele que apresentou o perfil de expressão mais interessante foi o gene da ciclinaA (EUUR-XY-000-014-E02-BA.R) (divisão e expansão celular), que esta fortemente induzido em *E. globulus* e reprimido nas outras espécies, sendo esta a espécie responsável pela madeira de melhor qualidade dentre as estudadas neste trabalho juntamente com o baixo número de genes identificados com este perfil de expressão, é alta a possibilidade deste gene contribuir para características exclusivas desta espécie. Este resultado faz deste gene o principal alvo para estudos de clonagem e expressão no intuito de se entender como este pode estar sendo responsável por diferenças fenotípicas de possível interesse econômico na espécie *E. globulus*.

## PERSPECTIVAS

Visando a continuação do trabalho, os genes considerados candidatos serão estudados através de técnicas de clonagem e expressão em organismos modelos, como *Arabidopsis thaliana*, para avaliar assim sua influência sobre a geração de características de interesse econômico para o melhoramento do eucalipto e possivelmente caracterizar a genes com função desconhecida com expressão diferencial comprovada neste trabalho. Aqueles que apresentarem resultados considerados positivos terão seu estudo levado adiante e seu impacto será avaliado então diretamente em eucalipto.

O efeito dos flavonoides chalcona e narigenin será avaliado através de experimentos realizados diretamente com mudas de eucalipto aonde o desenvolvimento da planta será observado e este material posteriormente coletado para análise de sua influência no metabolismo da espécie através da construção de novos chips e de observações histológicas.

Dessa forma, espera-se conseguir através da modificação genética e de técnicas de manejo, plantas de eucalipto que possuam maior crescimento, resistência e produção de celulose.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andrade, J. C. S. e Dias, C. C. “Conflito e Cooperação: análise das estratégias sócio-ambientais da Aracruz Celulose S/A”. Editus: Editora da UESC, 2003
2. Andrews B and Measday V. “The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea.” *Trends in Genetics*. 1998;14(2):66-72.
3. Arganbrigh, D.G. “Influence of extractives on bending strength of redwood (*Sequoia sempervirens*)”. *Wood and Fiber*, v.2, n.4, 367-372, 1971.
4. Audic S, Claverie JM. “The significance of digital gene expression profiles.” *Genome Res*. 1997 Oct;7(10):986-95.
5. Baucher. M, Halpin.C, Petit-Conil.M, Boerjan. W. “Lignin: Genetic Engineering and Impact on Pulping” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38:305–350, 2003
6. Bedon F, Grima-Pettenati J, Mackay J. “Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*).” *BMC Plant Biol*. 2007 Mar 30;7:17.
7. Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B and Legrand M. “Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth” *The Plant Cell* 19:148-162 (2007)
8. Blakely WF, “A key to the eucalyptus” Australia: Forestry and Timber Bureau 1965
9. Blumberg, B. and J. C. Belmonte (1999). "Subtractive hybridization and construction of cDNA libraries." *Methods Mol Biol* **97**: 555-74.
10. Boudet A.M et al (2003). “Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses” *Trends in Plant science* 12(8): 576-81.

11. Boudet A.M (2000). "Lignins and lignification: Selected issues" Plant physiol. Biochem 38(1/2): 81-96
12. Bracelpa 2006 & 2008 – Desempenho do setor em 2007 e projeções.  
www.bracelpa.org.br
13. CHEN, W. et al; "The rates of maize growth and lignin biosynthesis change after root-applied chalcone" *Weed Biology and Management*, Volume 5, Number 3, September 2005 , pp. 118-122(5)
14. Darley C.P et al (2001). "The molecular basis of plant cell wall extension" Plant molecular Biology 47: 179-95
15. Delmer D.P and Amor Y. "Cellulose Biosynthesis" The Plant Cell 1995: 987-1000
16. Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE: "A  $\beta$ -glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin". *Plant Physiol* 1995, 107:331-339.
17. Eaves, I. A., L. S. Wicker, et al. (2002). "Combining mouse congenic strains and microarray gene expression analyses to study a complex trait: the NOD model of type 1 diabetes." Genome Res 12(2): 232-43.
18. Fukuda, H. (1996). "Xylogenesis: Initiation, Progression, and Cell Death." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 299-325.
19. Goicoechea. M et al, "EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis" *The Plant Journal* (2005) 43, 553–567
20. Gomes, L. I., Silva, R. L., Stolf, B. S., Cristo, E. B., Hirata, R., Soares, F. A., Reis, L. F., Neves, E. J., Carvalho, A. F. Comparative analysis of amplified

and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Anal Biochem*, v. 321, n.2, p. 244-251, 2003.

21. Grattapaglia, D. and R. Sederoff (1994). "Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers." Genetics **137**(4): 1121-37.
22. Guillaumie S, Pichon M, Martinant JP, Bosio M, Goffner D, Barrière Y. "Differential expression of phenylpropanoid and related genes in brown-midrib bm1, bm2, bm3, and bm4 young near-isogenic maize plants."
23. Guillaumie S, Pichon M, Martinant JP, Bosio M, Goffner D, Barrière Y. "Differential expression of phenylpropanoid and related genes in brown-midrib bm1, bm2, bm3, and bm4 young near-isogenic maize plants." *Planta*. 2007 Jun;226(1):235-50. Epub 2007 Jan 17.
24. Hall, Johnston, and Chippendale, "Forest trees of Australia" Australian Government Publishing Service, Canberra 1970
25. Higuchi, T. "Biosynthesis and biodegradation of wood components". Academic Press, New York, 667 pp. 1985.
26. HU WJ, SA HARDING, J LUNG, JL POPLO, J RALPH, DD "Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees" - *Nat Biotech*, 1999
27. Iordachescu M. and Verlinden S. "Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure" *JXB Advance Access* originally published online on June 27, 2005 *Journal of Experimental Botany* 2005 56(418):2011-2018

28. Karp, C. L., A. Grupe, et al. (2000). "Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma." Nat Immunol **1**(3): 221-6.
29. Kawaoka, A., Ebinuma, H., 2001. "Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein". *Phytochemistry* 57, in press
30. Kelly, Stan (1969). *Eucalypts*. Melbourne : Thomas Nelson Ltd.
31. Kirst, M., A. A. Myburg, et al. (2004). "Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of eucalyptus." Plant Physiol **135**(4): 2368-78.
32. Joshi. C.P and S.D. Mansfield, The cellulose paradox—simple molecule, complex biosynthesis, *Curr Opin Plant Biol* **10** (2007)
33. Le Dai, J. (2004). "Serial Analyses of Gene Expression (SAGE)." Methods Mol Med **103**: 161-74.
34. Loftus T.M.,. Nguyen Y.H., Stanbridge E.J. "The QM Protein Associates with Ribosomes in the Rough Endoplasmic Reticulum" *Biochemistry*, **36** (27), 8224-8230, 1997.
35. Matthysse et al (1995a) "Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*" Jornal of Bacteriol. 177, 1076-81.
36. Mathysse et al (1995b) "Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*" Jornal of Bacteriol. 177, 1069-75
37. Molhøj et al., 2002 "Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis."



38. Møhlhøj M, Pagant S, Höfte H. "Møhlhøj M, Pagant S, Höfte H. "Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis" *Plant Cell Physiol*. 2002 Dec;43(12):1399-406. Review
  
39. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
  
40. Nobles Jr DR, Brown Jr RM. (2004). "The pivotal role of cyanobacteria in the evolution of cellulose synthases and cellulose synthases-like proteins." *Cellulose* 11, 437-448.
  
41. O. Lerouxel, D.M. Cavalier, A.H. Liepman and K. Keegstra, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process, *Curr Opin Plant Biol* **9** (2006), pp. 621–630.
  
42. Panshin, A.J; Zeeuw, C. "Textbook of wood technology". 3.ed. New York: McGraw- Hill, 1970. v01, p705
  
43. Paux, E., M. Tamasloukht, et al. (2004). "Identification of genes preferentially expressed during wood formation in Eucalyptus." *Plant Mol Biol* **55**(2): 263-80.
  
44. Rook F., Weisbeek P. and Smeeckens S., "The lightregulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene *ATB2* encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain" *Plant Molecular Biology* **37**: 171–178, 1998. 171, 1998 *Kluwer Academic Publishers*.
  
45. Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

46. Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-70.
47. Silva, J.C. Eucalipto - A Madeira do futuro. Revista da Madeira 114p.il, Curitiba, set, 2001.
48. Silva, J.C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. Revista da Madeira, nº 92 - ano 15 - outubro de 2005.
49. Somerville, C, Cellulose synthesis in higher plants, *Annu Rev Cell Dev Biol* **22** (2006), pp. 53–78
50. Venkatasubbarao, S. (2004). "Microarrays--status and prospects." Trends Biotechnol **22**(12): 630-7.
51. Vital, B. R. "Método de determinação da densidade da madeira." Viçosa, SIF, 1984,21p.
52. Yahalom A, Kim TH, Roy B, Singer R, von Arnim AG, Chamovitz DA. "Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation". *Plant J*. 2008 Jan;53(2):300-11. Epub 2007 Dec 4
53. Watai, LT. "Substituição de espécies de madeira nativas por madeiras de reflorestamento" In: Congresso Florestal Brasileiro,6, Campos de Jordão, 1990. v.1, p 131-133
54. Wayne, M. L. and L. M. McIntyre (2002). "Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14903-6.

## APENDICE 1

Nome da sequência	Sequência Foward	Sequência Reverse	
caffeate O-methyltransferase	TCAAGAACTGCTACGATGCG	GGATCACATTCTTGGTCGCT	
caffeoyl-CoA O-methyltransferase	CTGAGCTCTGGATACCCACAT	CCATCTATATTGGCCAACGC	
chalcone isomerase	AGGCGATATTCGAGTCGATG	CCTTCTTCTCGCAGTCCTTC	
chalcone synthase	GAGAAGCTGAAGCTCAAGGC	CATCTCGTCCAGGATGAACA	
cinnamate 4-hydroxylase	GAGCCCCGAGCTCTACAAGC	GTCGTGGAGGTTTCATGTGG	
cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase	ATCCTTGCCAAGTTCTTCCC	TTTCAGCTTCTGGTTGGAGAA	
cinnamyl alcohol dehydrogenase	TCTGACCGGAAGAGAGAGGA	GTCGAGTGAATCAGCAGCCT	
coumarate CoA ligase	AACACGACCTGCTTCGAGAT	TGAGGTTCCAGTGAGGTTTC	
ferulate 5-hydroxylase	CTCGTGGACCGAACCTGA	ACCCGAAAGGGATGAACCT	
Laccase	AACAACGTGTCCTTCGTGCT	GCAAGGGAAATCAGGTGGT	
p-coumarate 3-hydroxylase	CACCCTCAAGGACAAATACGA	GCCCACTCCACTGAAATAGC	
Peroxidase	TTTCATGTGCGGACATCTTG	TGTTCTTCCATCCTTCCTTCC	
phenylalanine ammonia-lyase	TTCGAGGAGGAGCTCAAGG	CATTCTTGATCTGGTTGGG	
phenylpyruvate aminotransferase	AGAGATGGAGCACATTTCCG	CAATCTTCCATCCGGTCAAT	
prephenate dehydratase	CTCAAATAAAGGCAGTGCCAA	CAGATGTCCCAAGGCAAGTT	
HistoneH2B	GAGCGTGGAGACGTACAAGA	GGCGAGTTTCTCGAAGATGT	
RibPtnL23A	AAGGACCCTGAAGAAGGACA	CCTCAATCTTCTTCATCGCA	
Heat shock proteinF	TTGTGATTGACGTGATTTG	ATCGTGGTTCTTAAGATCGC	
ChaperoninF	CCTACTTGCCCAATTGCAG	TGCTGCCTCAAATATCGACT	
Cyclin_AF	GGTGAAGTCATTCCTGATGC	TAGCAGTGTGGACCGGATA	
Elf3F	CGACGAGGAGATCCTCAAGT	ACGTCACCTCGGTGTGGTAGA	
PI3d10F	TCACTTGGTGAGTTGGGAGA	AAGCATCCTTCCAGCAAAT	
PI4f2F	GCCAGCATTGAGGTAACTG	GAACCAGATGAAAGGCATGA	

## APENDICE 2

### Cell wall formation: polysaccharide metabolism

#### PLACA 1

1.	$\beta$ -(1,3)(1,4)-glucosidase PI1/A1	<a href="#">EUGR-ML-000-001-E12-BA.R</a>
2.	$\beta$ -(1,3)-glucanase PI1/A2	<a href="#">EUUR-XY-000-025-A09-BA.R</a>
3.	$\alpha$ -amylase (endoamylase, multigene family) PI1/A3	<a href="#">EUGR-ML-000-021-F03-BA.R</a>
4.	$\beta$ -amylase (exoamylase, multigene family) PI1/A4	<a href="#">EUGR-ML-000-075-A12-BA.R</a>
5.	$\alpha$ -arabinosidase PI1/A5	<a href="#">EUUR-XY-000-043-H03-BA.R</a>
6.	$\alpha$ -fucosidase PI1/A6	<a href="#">EUUR-XY-001-105-A01-BA.T</a>
7.	$\alpha$ -galactosidase PI1/A7	<a href="#">EUPE-XY-001-002-F03-BA.R</a>
8.	xyloglucan-endo- $\beta$ -glucanase PI1/A8	<a href="#">EUUR-XY-000-012-C07-BA.R</a>
9.	$\alpha$ -glucuronidase PI1/A9	<a href="#">EUUR-XY-000-037-D02-BA.R</a>
10.	1,6- $\alpha$ -galactosyltransferase PI1/A10	<a href="#">EUUR-XY-000-085-G09-BA.R</a>
11.	ADP-glucose pyrophosphorylase PI1/A11	<a href="#">EUGR-ML-000-006-D07-BA.S</a>
12.	aldolase (latex plastidic aldolase-like protein)PI1/A12	<a href="#">EUGR-ML-000-015-C07-BA.R</a>
13.	aldolase (fructose-bisphosphate aldolase) PI1/B1	<a href="#">EUGR-ML-000-018-E02-BA.R</a>
14.	aldolase (latex plastidic aldolase-like protein) PI1/B2	<a href="#">EUGR-ML-000-012-E09-BA.R</a>
15.	branching enzyme (N-acetylglucosaminyltransferase family) PI1/B3	<a href="#">EUUR-XY-000-013-D12-BA.R</a>
16.	branching enzyme (1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme)PI1/B4	<a href="#">EUGR-ML-000-001-F11-BA.R</a>
17.	Cellbiohydrolase endo-1,4-beta-glucanase PI1/B5	<a href="#">EUUR-XY-000-008-G10-BA.R</a>
18.	Cellulose PI1/B6	<a href="#">EUUR-XY-001-002-B10-BA.R</a>
19.	cellulose synthase-7 PI1/B7	<a href="#">EUUR-XY-000-011-D05-BA.R</a>
20.	endo- $\beta$ -glucanase PI1/B8	<a href="#">EUUR-XY-000-011-F03-BA.R</a>
21.	endo- $\beta$ -mannanase PI1/B9	<a href="#">EUUR-XY-001-096-A06-BA.R</a>
22.	endo- $\beta$ -xylanase PI1/B10	<a href="#">EUUR-XY-000-039-D11-BA.R</a>
23.	Endo <b>polygalacturonase</b> PI1/B11	<a href="#">EUUR-XY-000-086-A06-BA.R</a>
24.	exo-1-4 galactanase PI1/B12	<a href="#">EUUR-XY-000-085-H03-BA.R</a>
25.	Expansin PI1/C1	<a href="#">EUPE-XY-001-002-B06-BA.R</a>
26.	Extensin PI1/C2	<a href="#">EUUR-XY-000-020-C04-BA.R</a>
27.	Fructokinase PI1/C3	<a href="#">EUUR-XY-000-013-B08-BA.R</a>
28.	<b>B</b> -galactanase PI1/C4	<a href="#">EUUR-XY-000-085-H03-BA.R</a>
29.	glycine rich protein PI1/C5	<a href="#">EUGR-XY-001-002-F03-BA.R</a>
30.	glycosyltransferases. arbutin synthase PI1/C6	<a href="#">EUUR-XY-001-002-H05-BA.R</a>
31.	hexose phosphate isomerase (hexose P isomerase) Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic 1 PI1/C7	<a href="#">EUUR-XY-000-029-B04-BA.R</a>
32.	hydroxyproline rich protein PI1/C8	<a href="#">EUUR-XY-000-020-A12-BA.R</a>
33.	Lichenase PI1/C9	<a href="#">EUGR-ML-000-041-E04-BA.R</a>
34.	myo-inositol-1-monophosphatase PI1/C10	<a href="#">EUGR-ML-001-085-E06-BA.R</a>
35.	pectin acetylerase PI1/C11	<a href="#">EUUR-XY-001-106-G08-BA.T</a>
36.	pectin methyltransferase PI1/C12 <b>pectin-glucuronyltransferase</b>	<a href="#">EUUR-XY-000-024-C01-BA.R</a>
37.	Xyloglucan-endo-B-transglycosilase".PI1/D1	<a href="#">EUUR-XY-000-009-H10-BA.R</a>
38.	Phosphoglucomutase PI1/D2	<a href="#">EUUR-XY-000-009-F01-BA.R</a>
39.	phosphohexose isomerase PI1/D3	<a href="#">EUUR-XY-000-029-B04-BA.R</a>
40.	Polygalacturonase PI1/D4	<a href="#">EUUR-XY-000-011-E06-BA.R</a>
41.	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate kinase PI1/D5	<a href="#">EUUR-XY-000-016-E10-BA.R</a>
42.	fructose 1,6-bisphosphatase PI1/D6	<a href="#">EUGR-ML-000-054-G11-BA.R</a>
43.	pyrophosphatase (plastidic) PI1/D7	<a href="#">EUUR-XY-001-096-B07-BA.R</a>
44.	starch synthase PI1/D8	<a href="#">EUGR-ML-000-013-D10-BA.R</a>
45.	sucrose synthase (UDP-glucose:D-fructose-2-glucosyltransferase; sucrose-UDP glucosyltransferase) PI1/D9	<a href="#">EUUR-XY-000-010-F11-BA.R</a>
46.	triose phosphate-phosphate translocator PI1/D10	<a href="#">EUGR-ML-000-018-D01-BA.R</a>
47.	UDP-glucose dehydrogenase PI1/D11	<a href="#">EUUR-XY-000-010-F06-BA.R</a>
48.	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase PI1/D12	<a href="#">EUUR-XY-001-111-B09-BA.R</a>

### Phenylpropanoid (including lignin) biosynthesis

49.	4-coumarate:CoA ligase (4-coumaric acid:CoA ligase) PI1/E1	<a href="#">EUUR-XY-000-013-B12-BA.R</a>
50.	caffeate <i>O</i> -methyltransferase (cafeic acid <i>O</i> -methyltransferase; lignin-	<a href="#">EUUR-XY-000-024-C12-BA.R</a>

	bispecific <i>O</i> -methyltransferase) PI1/E2	
51.	caffeoyl-CoA <i>O</i> -methyltransferase PI1/E3	<a href="#">EUUR-XY-000-010-A04-BA.R</a>
52.	chalcone isomerase (chi) PI1/E4	<a href="#">EUGR-ML-000-001-E04-BA.R</a>
53.	chalcone synthase (chs) PI1/E5	<a href="#">EUPE-XY-001-002-E09-BA.R</a>
54.	cinnamate 4-hydroxylase (cinnamic acid 4-hydroxylase) PI1/E6	<a href="#">EUUR-XY-001-002-A11-BA.R</a>
55.	cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase (ccr) PI1/E7	<a href="#">EUUR-XY-000-011-A12-BA.R</a>
56.	cinnamyl alcohol dehydrogenase (cad) PI1/E8	<a href="#">EUUR-XY-000-024-E05-BA.R</a>
57.	ferulate 5-hydroxylase (ferulic acid 5-hydroxylase) (f5h) PI1/E9	<a href="#">EUUR-XY-000-083-H11-BA.R</a>
58.	Laccase PI1/E10	<a href="#">EUUR-XY-000-020-C03-BA.R</a>
59.	<i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase ( <i>p</i> -coumeric acid 3-hydroxylase) PI1/E11	<a href="#">EUUR-XY-000-088-E09-BA.R</a>
60.	Peroxidase PI1/E12	<a href="#">EUUR-XY-000-019-D01-BA.R</a>
61.	phenylalanine ammonia-lyase (pal) PI1/F1	
		<a href="#">EUUR-XY-000-009-E05-BA.R</a>
62.	phenylpyruvate aminotransferase (phenylpyruvic acid aminotransferase) PI1/F2	<a href="#">EUUR-XY-000-025-D09-BA.R</a>
63.	prephenate dehydratase (prephenic acid dehydratase) PI1/F3	<a href="#">EUUR-XY-001-109-A05-BA.R</a>

## Cell division and expansion

64.	Actin PI1/F4	<a href="#">EUUR-XY-000-024-H07-BA.R</a>
65.	CKS1 PI1/F5	<a href="#">EUUR-XY-000-014-E02-BA.R</a>
66.	cyclin A PI1/F6	<a href="#">EUUR-XY-000-014-E02-BA.R</a>
67.	cyclin D3 PI1/F7	<a href="#">EUUR-XY-000-017-H12-BA.R</a>
68.	cyclin-dependend kinase (related to multifunctional cyclin-dependent kinase) PI1/F8	<a href="#">EUGR-ML-000-001-D07-BA.R</a>
69.	knotted-like PI1/F9	<a href="#">EUUR-XY-000-018-C11-BA.R</a>
70.	MYB-like (TF) PI1/F10	<a href="#">EUUR-XY-000-011-C04-BA.R</a>
71.	pectate lyase PI1/F11	<a href="#">EUUR-XY-000-019-C12-BA.R</a>
72.	pectin esterase PI1/F12	<a href="#">EUUR-XY-001-001-F02-BA.F</a>
73.	Tubulin PI1/G1	<a href="#">EUUR-XY-000-019-H09-BA.R</a>

## Photosynthesis and photoreceptors (many chloroplast-resident proteins)

74.	ATP synthase – subunit PI1/G2	<a href="#">EUUR-XY-000-018-F12-BA.R</a>
75.	ATP synthase – subunit PI1/G3	<a href="#">EUUR-XY-000-020-G09-BA.R</a>
76.	ATP synthase – subunit PI1/G4	<a href="#">EUGR-ML-000-015-D10-BA.R</a>
77.	ATP synthase – subunit PI1/G5	<a href="#">EUUR-XY-000-024-A12-BA.R</a>
78.	ATP synthase – subunit II PI1/G6	<a href="#">EUUR-XY-000-020-H01-BA.R</a>
79.	cryptochrome 1 PI1/G7	<a href="#">EUUR-XY-001-102-G09-BA.R</a>
80.	cryptochrome 2 PI1/G8	<a href="#">EUUR-XY-000-019-G02-BA.R</a>
81.	cytochrome- <i>b/c</i> <sub>1</sub> complex proteins (b5) PI1/G9	<a href="#">EUUR-XY-000-013-D04-BA.R</a>
82.	ferredoxin-NADP reductase PI1/G10	<a href="#">EUGR-ML-000-010-B10-BA.R</a>
83.	iron-sulfur proteins – superfamily PI1/G11	<a href="#">EUGR-ML-000-025-C03-BA.R</a>
84.	light harvesting complex I protein (LHC) – superfamily (or chlorophyll a/b-binding proteins – superfamily) PI1/G12	<a href="#">EUGR-ML-000-020-C07-BA.R</a>
85.	light harvesting complex IIa protein (LHC-IIa) PI1/H1	<a href="#">EUGR-ML-000-016-F02-BA.R</a>
86.	Phototropin PI1/H2	<a href="#">EUGR-ML-000-006-D10-BA.S</a>
87.	PS I – photosystem I proteins – superfamily PI1/H3	<a href="#">EUGR-ML-001-085-E09-BA.R</a>
88.	PS II – photosystem II proteins – superfamily PI1/H4	<a href="#">EUGR-ML-000-001-B06-BA.R</a>

## CO<sub>2</sub> assimilation (Calvin Cycle, many chloroplast-resident proteins)

89.	ferredoxin-thioredoxin reductase PI1/H5	<a href="#">EUGR-ML-000-010-D08-BA.R</a>
90.	glucose 6-phosphate dehydrogenase PI1/H6	<a href="#">EUUR-XY-000-089-H02-BA.R</a>
91.	phosphoglycerate kinase PI1/H7	<a href="#">EUUR-XY-000-010-A11-BA.R</a>
92.	ribose phosphate isomerase PI1/H8	<a href="#">EUGR-ML-000-009-A12-BA.R</a>
93.	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) PI1/H9	<a href="#">EUGR-ML-000-059-C02-BA.R</a>
94.	ribulose phosphate epimerase PI1/H10	<a href="#">EUGR-ML-001-085-G11-BA.R</a>
95.	Transaldolase PI1/H11	<a href="#">EUUR-XY-000-010-E11-BA.R</a>
96.	Transketolase PI1/H12	<a href="#">EUUR-XY-000-020-C10-BA.R</a>

## Cell respiration (biological oxidation, many mitochondrion-resident proteins)

### PLACA 2

97.	Aconitase PLACA 2 A1	<a href="#">EUUR-XY-000-054-G11-BA.R</a>
98.	Fumarase PI2/A2	<a href="#">EUUR-XY-000-041-F06-BA.R</a>
99.	isocitrate dehydrogenase (isocitric acid dehydrogenase) PI2/A3	<a href="#">EUUR-XY-000-091-D03-BA.R</a>
100.	malate dehydrogenase (malic acid dehydrogenase) PI2/A4	<a href="#">EUUR-XY-000-084-F05-BA.R</a>
101.	NAD-malic enzyme PI2/A5	<a href="#">EUUR-XY-000-009-C08-BA.R</a>
102.	PDC – pyruvate dehydrogenase (pyruvic acid dehydrogenase) PI2/A6	<a href="#">EUGR-ML-000-073-A10-BA.R</a>
103.	phosphate translocator PI2/A7	<a href="#">EUGR-ML-000-018-D01-BA.R</a>

## Photorespiration (many chloroplast-resident proteins – amino acid biosynthesis)

104.	glutamate synthase PI2/A8	<a href="#">EUGR-ML-000-060-G12-BA.R</a>
105.	glutamine synthetase PI2/A9	<a href="#">EUUR-XY-000-081-G09-BA.R</a>
106.	glycolate oxidase PI2/A10	<a href="#">EUGR-ML-000-010-G04-BA.R</a>
107.	phosphoglycolate phosphatase PI2/A11	<a href="#">EUUR-XY-000-001-A03-BA.R</a>
108.	serine hydroxymethyl-transferase PI2/A12	<a href="#">EUGR-ML-000-017-B10-BA.R</a>

## Drought and Cold Responsive Genes

109.	-tonoplast intrinsic protein (tip) PI2/B1	<a href="#">EUUR-XY-000-010-H01-BA.R</a>
110.	Aquaporin PI2/B2	<a href="#">EUUR-XY-000-017-G05-BA.R</a>
111.	ascorbate peroxidase PI2/B3	<a href="#">EUUR-XY-000-089-D09-BA.R</a>
112.	calcium-binding EF hand protein PI2/B4	<a href="#">EUUR-XY-000-091-G11-BA.R</a>
113.	catalase 3 PI2/B5	<a href="#">EUGR-ML-000-065-E10-BA.R</a>
114.	cold acclimation protein PI2/B6	<a href="#">EUGR-ML-001-080-C06-BA.R</a>
115.	cysteine proteinase PI2/B7	<a href="#">EUGR-ML-001-086-D08-BA.R</a>
116.	cysteine proteinase inhibitor PI2/B8	<a href="#">EUGR-ML-000-009-C11-BA.R</a>
117.	DC 1.2 PI2/B9	<a href="#">EUUR-XY-001-001-F02-BA.F</a>
118.	Enolase PI2/B10	<a href="#">EUUR-XY-000-024-B01-BA.R</a>
119.	Ferritin PI2/B11	<a href="#">EUGR-ML-000-054-F03-BA.R</a>
120.	glyoxylase I (homolog) <b>glyoxylase family protein</b> PI2/B12	<a href="#">EUGR-ML-001-086-A06-BA.T</a>
121.	jasmonate-inducible protein PI2/C1	<a href="#">EUGR-ML-000-064-F11-BA.R</a>
122.	late embryogenesis abundant protein (lea, multigene family) PI2/C2	<a href="#">EUGR-FL-001-001-H12-BA.F</a>
123.	nodulin PI2/C3	<a href="#">EUPE-XY-001-002-B11-BA.R</a>
124.	peroxiredoxin (thioredoxin peroxidase) PI2/C4	<a href="#">EUUR-XY-000-020-D10-BA.R</a>
125.	reversibly-glycosylated polypeptide-3 PI2/C5 <b>reversibly-glycosylated polypeptide</b>	<a href="#">EUUR-XY-000-052-A06-BA.R</a>
126.	thiol protease PI2/C6	<a href="#">EUUR-XY-000-016-C03-BA.R</a>
127.	water channel protein (putative) PI2/C7	<a href="#">EUUR-XY-000-010-G05-BA.R</a>

## Nitrate assimilation (many chloroplast-resident proteins – amino acid biosynthesis)

128.	nitrate reductase PI2/C8	<a href="#">EUUR-XY-000-010-H11-BA.R</a>
129.	aspartate kinase PI2/C9	<a href="#">EUGR-ML-000-055-A07-BA.R</a>
130.	Enolase PI2/C10	<a href="#">EUUR-XY-000-024-B01-BA.R</a>
131.	homoserine dehydrogenase PI2/C11	<a href="#">EUUR-XY-001-108-G06-BA.T</a>
132.	magnesium chelatase (plastidic) PI2/C12	<a href="#">EUGR-ML-000-061-B06-BA.R</a>
133.	phosphoenolpyruvate carboxylase PI2/D1	<a href="#">EUUR-XY-000-062-A06-BA.R</a>
134.	phosphoglycerate mutase PI2/D2	<a href="#">EUGR-ML-000-062-G11-BA.R</a>

135.	pyrroline 5-carboxylate reductase PI2/D3	<a href="#">EUSP-FX-001-007-H05-BA.R</a>
136.	pyruvate kinase PI2/D4	<a href="#">EUUR-XY-000-016-D10-BA.R</a>
137.	symport protein PI2/D5 <b>MFS family, L-arabinose: proton symport protein</b>	<a href="#">EUGR-ML-000-007-D05-BA.R</a>

## Nitrogen fixation

138.	Allantoinase PI2/D6	<a href="#">EUGR-ML-000-021-E02-BA.R</a>
139.	lectin (phytohaemagglutinin, generic term)PI2/D7	<a href="#">EUUR-XY-000-015-C02-BA.R</a>
140.	nodulin (generic term) PI2/D8	<a href="#">EUPE-XY-001-002-B11-BA.R</a>
141.	Uricase PI2/D9	<a href="#">EUUR-XY-000-036-G11-BA.R</a>

## Sulfate assimilation (amino acid biosynthesis)

142.	acetyl-CoA synthetase PI2/D10	<a href="#">EUUR-XY-000-061-A10-BA.R</a>
143.	APS kinase (adenosine monophosphate sulfate kinase) PI2/D11	<a href="#">EUGR-ML-000-007-H10-BA.R</a>
144.	cystathionine -lyase PI2/D12	<a href="#">EUGR-ML-000-063-A11-BA.R</a>
145.	cystathionine -synthase PI2/E1	<a href="#">EUGR-ML-001-078-G01-BA.R</a>
146.	homocysteine methyltransferase PI2/E2 <b>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase</b>	<a href="#">EUGR-ML-000-072-E09-BA.R</a>
147.	phytochelatin synthase <b>homo-phytochelatin synthase</b> PI2/E3	<a href="#">EUUR-XY-000-066-D02-BA.R</a>
148.	pyrophosphatase <b>inorganic pyrophosphatase</b> PI2/E4	<a href="#">EUUR-XY-000-009-C03-BA.R</a>

## Storage proteins

149.	Patatin PI2/E5	<a href="#">EUUR-XY-001-093-A05-BA.R</a>
150.	proteinase inhibitor <b>cysteine proteinase inhibitor</b> PI2/E6	<a href="#">EUGR-ML-000-009-C11-BA.R</a>

## Fatty acid biosynthesis (cell membrane and oil body formation)

151.	(fatty acid) alcohol dehydrogenase PI2/E7	<a href="#">EUUR-XY-000-087-F12-BA.R</a>
152.	(fatty acid) catalase PI2/E8	<a href="#">EUUR-XY-000-086-C12-BA.R</a>
153.	(fatty acid) isomerase PI2/E9	<a href="#">EUUR-XY-000-081-C07-BA.R</a>
154.	-hydroxyacyl-ACP dehydratase PI2/E10	<a href="#">EUUR-XY-000-053-E12-BA.R</a>
155.	-ketoacyl-ACP synthase II PI2/E11	<a href="#">EUGR-ML-001-078-F06-BA.R</a>
156.	acetyl CoA synthetase PI2/E12	<a href="#">EUUR-XY-000-061-A10-BA.R</a>
157.	acetyl CoA carboxylase PI2/F1	<a href="#">EUUR-XY-001-099-G05-BA.R</a>
158.	acyl CoA oxidase PI2/F2	<a href="#">EUGR-ML-001-087-E11-BA.R</a>
159.	acyl-ACP-glycerol 3-phosphate acyl transferase PI2/F3	<a href="#">EUGR-ML-000-009-H01-BA.R</a>
160.	acyl-carrier protein (ACP) PI2/F4	<a href="#">EUUR-XY-001-092-C02-BA.R</a>
161.	biotin carboxylase PI2/F5	<a href="#">EUGR-ML-000-001-E11-BA.R</a>
162.	enoyl CoA hydratase PI2/F6	<a href="#">EUUR-XY-000-087-E04-BA.R</a>
163.	hydroperoxide lyase PI2/F7	<a href="#">EUGR-ML-000-011-C07-BA.R</a>
164.	Lipoxygenase PI2/F8	<a href="#">EUGR-ML-000-014-C12-BA.R</a>
165.	pyruvate dehydrogenase PI2/F9	<a href="#">EUGR-ML-000-073-A10-BA.R</a>

## Secondary metabolism (except phenylpropanoids)

166.	farnesyl- pyrophosphate (PP) synthase PI2/F10	<a href="#">EUSP-FX-001-014-D11-BA.R</a>
167.	geraniol-10-hydroxylase PI2/F11	<a href="#">EUGR-ML-000-015-D01-BA.R</a>

168.	HMG-CoA synthase ( -hydroxy- -methylglutaryl-coenzyme A synthase) PI2/F12	<a href="#">EUGR-ML-000-006-G08-BA.R</a>
169.	hydroxynitrile lyase PI2/G1	<a href="#">EUGR-ML-000-077-F09-BA.R</a>
170.	isoprene synthase PI2/G2	<a href="#">EUGR-ML-000-063-A08-BA.R</a>
171.	limonene synthase PI2/G3	<a href="#">EUGR-ML-000-063-A08-BA.R</a>
172.	phytoene synthase PI2/G4	<a href="#">EUGR-ML-000-017-G01-BA.R</a>
173.	prenyl transferase (isoprene or polyisoprene transferase) PI2/G5	<a href="#">EUUR-XY-001-094-F09-BA.R</a>
174.	squalene synthase PI2/G6	<a href="#">EUUR-XY-001-095-G04-BA.R</a>
175.	strictosidine synthase PI2/G7	<a href="#">EUGR-ML-000-019-E03-BA.R</a>

## Phytohormone synthesis and response

176.	amine oxidase PI2/G8	<a href="#">EUGR-ML-000-074-D07-BA.R</a>
177.	auxin-binding protein (generic term) PI2/G9	<a href="#">EUGR-FL-001-001-E12-BA.F</a>
178.	cytokinin-binding protein (generic term) PI2/G10	<a href="#">EUUR-XY-000-090-A01-BA.R</a>
179.	abscisic acid-binding protein (generic term) PI2/G11	<a href="#">EUSP-FX-001-018-H09-BA.R</a>
180.	ethylene-binding protein (generic term) PI2/G12	<a href="#">EUUR-XY-000-023-F02-BA.R</a>
181.	ACC oxidase (aminocyclopropane carboxylate oxidase) PI2/H1	<a href="#">EUUR-XY-000-024-H01-BA.R</a>
182.	Ubiquitin PI2/H2	<a href="#">EUUR-XY-000-063-D10-BA.R</a>

## Replication

183.	tankyrase (telomere structure) PI2/H3	<a href="#">EUUR-XY-000-057-E10-BA.R</a>
------	---------------------------------------	--

## DNA repair

184.	endonuclease (generic term) PI2/H4	<a href="#">EUUR-XY-000-013-G05-BA.R</a>
185.	exonuclease (generic term) PI2/H5	<a href="#">EUUR-XY-000-014-B03-BA.R</a>

## Transcription and RNA processing

186.	reverse transcriptase (viral, generic term) PI2/H6	<a href="#">EUUR-XY-000-020-C05-BA.R</a>
187.	RNase, ribonuclease (generic term) PI2/H7	<a href="#">EUUR-XY-001-111-G10-BA.T</a>
188.	snRNP U6 PI2/H8	<a href="#">EUGR-ML-001-085-H10-BA.R</a>
189.	snRNP, small nuclear ribonucleoprotein (spliceosome, generic term) PI2/H9	<a href="#">EUGR-ML-001-081-C03-BA.R</a>
190.	TBP (TATA-box binding protein) PI2/H10	<a href="#">EUUR-XY-000-017-B01-BA.R</a>
191.	TFII (RNA polymerase II transcription factor, generic term) PI2/H11	<a href="#">EUUR-XY-000-073-D10-BA.R</a>
192.	transcriptase (viral, generic term)	
193.	transcription factor (general term) PI2/H12	<a href="#">EUGR-ML-000-017-A11-BA.R</a>
	<b>PLACA 3</b>	
194.	transposase (transposon, generic term) PLACA 3 A1	<a href="#">EUGR-ML-000-074-B11-BA.R</a>
195.	U2AF (splicing factor) PI3/A2	<a href="#">EUGR-ML-000-007-F06-BA.R</a>

## Signal transduction

196.	protein kinase (generic term) PI3/A3	<a href="#">EUSP-FX-001-007-A08-BA.R</a>
197.	protein kinase C PI3/A4	<a href="#">EUUR-XY-001-102-B04-BA.S</a>
198.	cyclin-dependent kinase (CDK) PI3/A5	<a href="#">EUUR-XY-001-093-F02-BA.R</a>
199.	mitogen-activated protein kinase (MAPK) PI3/A6	<a href="#">EUGR-ML-000-077-A07-BA.R</a>
200.	MAPK-activated protein kinase (MAPK-PK) PI3/A7	<a href="#">EUGR-ML-000-022-A07-BA.R</a>



201.	Calmoduli PI3/A8	<a href="#">EUUR-XY-000-076-A09-BA.R</a>
202.	phospholipase C PI3/A9	<a href="#">EUUR-XY-000-084-F12-BA.R</a>
203.	receptor (generic term) PI3/A10	<a href="#">EUUR-XY-001-098-E03-BA.R</a>
204.	phosphatidyl inositol kinase PI3/A11	<a href="#">EUUR-XY-000-086-D03-BA.R</a>
205.	inositol 1,4,5-triphosphate phosphatase PI3/A12	<a href="#">EUGR-ML-001-078-B06-BA.R</a>

## Protein synthesis and processing

206.	40S ribosomal protein (generic term) PI3/B1	<a href="#">EUUR-XY-000-009-B07-BA.R</a>
207.	60S ribosomal protein (generic term) PI3/B2	<a href="#">EUUR-XY-001-002-B12-BA.R</a>
208.	aa-tRNAs, asparaginyl-tRNA synthetase PI3/B3	<a href="#">EUGR-ML-000-015-G07-BA.R</a>
209.	aa-tRNAs, phenylalanyl-tRNA synthetase PI3/B4	<a href="#">EUGR-ML-000-019-H10-BA.R</a>
210.	chaperone (generic term) PI3/B5	<a href="#">EUUR-XY-000-016-G09-BA.R</a>
211.	chaperonin (generic term) PI3/B6	<a href="#">EUUR-XY-000-021-F01-BA.R</a>
212.	eEF1 (eukaryotic elongation factor 1 ) PI3/B7	<a href="#">EUUR-XY-001-107-D04-BA.S</a>
213.	eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) PI3/B8	<a href="#">EUGR-ML-000-020-E07-BA.R</a>
214.	eIF4 (eukaryotic initiation factor 4) PI3/B9	<a href="#">EUGR-ML-000-012-E03-BA.R</a>
215.	hsp (heat shock protein, generic term) PI3/B10	<a href="#">EUUR-XY-001-003-H08-BA.R</a>
216.	hsp70 (heat shock protein 70) PI3/B11	<a href="#">EUGR-ML-001-084-G01-BA.R</a>
217.	OEP (outer envelope protein, generic term) PI3/B12	<a href="#">EUGR-ML-001-079-E03-BA.R</a>
218.	OEP86 (outer envelope protein, generic term 86) PI3/C1	<a href="#">EUUR-XY-001-103-F10-BA.R</a>
219.	ribosomal protein (generic term) PI3/C2	<a href="#">EUUR-XY-001-003-A10-BA.R</a>
220.	thylakoid processing peptidase (plastidic) PI3/C3	<a href="#">EUGR-ML-000-015-F06-BA.R</a>
221.	TOM40 (translocase outer mitochondrial membrane 40) PI3/C4	<a href="#">EUGR-ML-000-063-C05-BA.R</a>
222.	TOM7 (translocase outer mitochondrial membrane 7) PI3/C5	<a href="#">EUGR-ML-000-063-H01-BA.R</a>

## Função Não Determinada

	<a href="#">EUGR-ML-000-021-B11-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C6
L-ascorbate peroxidase	<a href="#">EUGR-ML-000-010-H12-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C7
glutathione S-transferase/oxidoreductase (glutathione transferase)	<a href="#">EUGR-ML-000-010-F08-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C8
Superoxide dismutase	<a href="#">EUUR-XY-000-016-B01-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C9
peptidase (several)	<a href="#">EUSP-FX-001-021-F09-BA.T</a> [Blastx (nr)] PL3/C10
protease (several)	<a href="#">EUUR-XY-000-012-A10-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C11
chitinase (several)	<a href="#">EUGR-ML-000-020-H07-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/C12
Xyloglucan-endo-B-transglycosylase	<a href="#">EUUR-XY-000-009-H10-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/D1
Triose phosphate isomerase	<a href="#">EUUR-XY-001-106-D12-BA.F</a> [Blastx (nr)] PL3/D2
Glutamate dehydrogenase	<a href="#">EUUR-XY-000-059-C03-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/D3
S-adenosylmethionine synthetase	<a href="#">EUUR-XY-000-012-D02-BA.R</a> [Blastx (nr)] PL3/D4
transcription factor LIM	<a href="#">EUUR-XY-000-030-D08-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D5
transcription initiation factor IIB (TFIIB)	<a href="#">EUUR-XY-000-073-D10-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D6
60S ribosomal protein L10	<a href="#">EUUR-XY-000-025-A04-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D7
leucine zipper-containing protein	<a href="#">EUGR-ML-000-011-H01-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D8
QM-like protein	<a href="#">EUUR-XY-001-108-B01-BA.T</a> [Blastx (nr)] PI3/D9
60S ribosomal protein L10	<a href="#">EUGR-ML-001-086-B02-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D10
homeodomain transcription factor	<a href="#">EUUR-XY-000-052-B09-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D11
transcription factor LIM	<a href="#">EUUR-XY-000-091-D09-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/D12
transcription factor LIM	<a href="#">EUSP-FX-001-011-G09-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/E1
putative transcription factor	<a href="#">EUSP-FX-001-018-E02-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/E2
homeodomain-leucine zipper protein	<a href="#">EUSP-FX-001-007-F09-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/E3
NPR1-interactor protein 1	<a href="#">EUUR-XY-000-069-F08-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/E4
homeodomain-leucine zipper protein	<a href="#">EUGR-ML-000-019-H06-BA.R</a> [Blastx (nr)] PI3/E5

60S ribosomal protein L10	· EUUR-XY-000-036-B11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/E6
60S ribosomal protein L10	· EUUR-XY-001-111-A02-BA.T [Blastx (nr)] PI3/E7
homeodomain-leucine zipper protein	· EUSP-FX-001-007-F09-BA.F [Blastx (nr)] PI3/E8
Putative Transcription initiation factor IIE, beta subunit	· EUUR-XY-000-054-F11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/E9
myb-related transcription factor	· EUUR-XY-000-042-G10-BA.R [Blastx (nr)] PI3/E10
EIN3-like protein	EUSP-FX-001-009-E07-BA.R [Blastx (nr)] PI3/E11
QM-like protein	EUGR-ML-000-024-E02-BA.R [Blastx (nr)] PI3/E12
E2, ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9)	EUGR-ML-000-001-G04-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F1
60S ribosomal protein L10	EUUR-XY-000-077-G11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F2
homeodomain-leucine zipper protein	EUUR-XY-001-096-E01-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F3
myb-like transcription factor 6	EUGR-ML-000-074-H10-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F4
TFIIB-related protein	EUGR-ML-000-052-D12-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F5
receptor like protein (fragment)	EUUR-XY-000-078-E03-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F6
receptor like protein (fragment)	EUUR-XY-001-098-E03-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F7
unknown [Arabidopsis thaliana]	· EUUR-XY-000-049-D07-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F8
transcription factor LIM	· EUUR-XY-001-002-C01-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F9
unnamed protein product	· EUSP-FX-001-015-F08-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F10
transcription factor LIM	· EUUR-XY-000-054-E01-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F11
Oryza sativa (japonica cultivar-group)	· EUUR-XY-000-054-G03-BA.R [Blastx (nr)] PI3/F12
Myb15 protein [Oryza sativa]	· EUUR-XY-000-076-B10-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G1
SNF5 homolog BSH	· EUGR-ML-000-074-F04-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G2
putative SCARECROW gene regulator	· EUGR-ML-000-053-G12-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G3
transcription factor LIM	· EUSP-FX-001-020-E05-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G4
putative transcription factor APFI	· EUUR-XY-001-110-F05-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G5
typical P-type R2R3 Myb protein	· EUSP-FX-001-015-D08-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G6
BEL1-related homeotic protein 29	· EUGR-ML-000-023-G06-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	· EUSP-FX-001-003-F07-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G8
transcription factor [Cucumis melo]	· EUGR-ML-001-087-H05-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G9
transcription factor LIM	· EUUR-XY-000-058-C03-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G10
unknown protein	· EUUR-XY-000-020-G07-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G11
Revoluta [Arabidopsis thaliana]	· EUUR-XY-000-017-D12-BA.R [Blastx (nr)] PI3/G12
homeodomain transcription factor	· EUUR-XY-001-100-A11-BA.S [Blastx (nr)] PI3/H1
putative transcription factor	· EUUR-XY-000-023-B10-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H2
transcriptional regulator, putative	· EUGR-ML-000-022-H10-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H3
sigma-like factor	· EUGR-ML-000-055-F03-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H4
putative bHLH transcription factor	· EUUR-XY-000-042-G09-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H5
similar to yeast dcp1	· EUUR-XY-001-102-A02-BA.S [Blastx (nr)] PI3/H6
tuber-specific and sucrose-responsive element binding factor	· EUUR-XY-000-051-F06-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H7
homeodomain-leucine zipper protein	· EUUR-XY-001-100-A11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H8
similar to yeast dcp1	· EUUR-XY-001-102-A02-BA.T [Blastx (nr)] PI3/H9
putative transcription factor	· EUGR-ML-000-074-E05-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H10
putative transcription factor	· EUUR-XY-000-027-C11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H11
110 kDa protein HMP	· EUSP-FX-001-016-G11-BA.R [Blastx (nr)] PI3/H12
orf [Ricinus communis]	· EUUR-XY-000-025-D11-BA.R [Blastx (nr)] PLACA 4 A1
putative RNA polymerase B transcription factor 3	· EUUR-XY-000-018-G05-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A2
LIM domain protein WLIM-1	· EUGR-ML-000-050-G11-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A3
transcription factor, putative	· EUUR-XY-000-056-C12-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A4
LIM domain protein WLIM-1	· EUSP-FX-001-001-F04-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A5
homeobox protein HAT22	· EUUR-XY-000-071-D10-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A6
HD-zip transcription factor (athb-8)	· EUUR-XY-001-104-A06-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A7
WRKY DNA-binding protein	· EUUR-XY-000-026-F01-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A8
auxin-regulated protein	· EUUR-XY-000-084-A05-BA.R [Blastx (nr)] PI4/A9

orf [Ricinus communis]	· EUUR-XY-000-032-D09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/A10
aux/IAA protein	· EUUR-XY-001-099-G06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/A11
transcription factor-like protein	· EUUR-XY-001-094-D09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/A12
myb-like protein	· EUUR-XY-000-082-A08-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B1
anther ethylene-upregulated protein ER1	· EUUR-XY-000-043-D02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B2
putative CCR4-associated factor	· EUUR-XY-000-006-E08-BA.F	[Blastx (nr)]	PI4/B3
IbMADS3 [Ipomoea batatas]	· EUUR-XY-000-018-D01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B4
putative MADS-domain transcription factor MpMADS1	· EUUR-XY-001-108-F03-BA.T	[Blastx (nr)]	PI4/B5
non-phototropic hypocotyl-like protein	· EUUR-XY-000-009-G07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B6
transcription factor Hap5a	· EUSP-FX-001-007-G11-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B7
Unknown protein	· EUGR-ML-000-072-A07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B8
unknown protein	· EUUR-XY-000-089-E06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B9
homeobox-leucine zipper protein	· EUUR-XY-000-054-F01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B10
GHMYB9 [Gossypium hirsutum]	· EUUR-XY-000-089-F01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B11
heat shock transcription factor 29	· EUGR-ML-000-007-B01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/B12
transcription factor IIA small subunit	· EUSP-FX-001-022-B03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C1
expressed protein; protein id: At1g08370.1	· EUUR-XY-001-102-A02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C2
similar to VP1/ABI3 family regulatory protein	· EUUR-XY-001-103-F03-BA.T	[Blastx (nr)]	PI4/C3
bZIP family transcription factor	· EUUR-XY-000-019-F02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C4
CCAAT-binding factor B subunit-like protein	· EUUR-XY-000-076-G12-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C5
putative DNA repair and recombination protein	· EUUR-XY-000-066-H02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C6
ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9)	· EUUR-XY-000-068-A06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C7
putative MADS-domain transcription factor MpMADS1	· EUUR-XY-001-108-F03-BA.S	[Blastx (nr)]	PL4/C8
ubiquitin-conjugating enzyme 10 (UBC10)	· EUUR-ML-000-029-D01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C9
LIM domain protein WLIM2	· EUUR-XY-001-093-B09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/C10
DNA repair/transcription factor protein	· EUUR-XY-000-068-H05-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/C11
F24B9.20 [Arabidopsis thaliana]	· EUUR-XY-001-102-B11-BA.T	[Blastx (nr)]	PL4/C12
Putative SCARECROW gene regulator-like	· EUUR-XY-000-056-B03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D1
AT4g10340/F24G24_140	· EUUR-XY-000-090-G01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D2
transcription factor LIM	· EUUR-XY-000-029-G05-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D3
WRKY2	· EUSP-FX-001-020-F01-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/D4
transcription factor LIM	· EUUR-XY-000-024-G02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D5
transcription factor LIM	· EUUR-XY-000-006-C04-BA.F	[Blastx (nr)]	PI4/D6
HAHB-1 [Helianthus annuus]	· EUGR-ML-000-009-H08-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/D7
LIM domain protein WLIM2	· EUUR-XY-000-021-C08-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D8
WRKY2	· EUSP-FX-001-002-G09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D9
putative RNA polymerase B transcription factor 3	· EUUR-XY-000-020-B05-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/D10
PROBABLE TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN	· EUGR-ML-000-027-B03-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/D11
Contains similarity to a hypothetical protein	· EUUR-XY-000-083-B06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/D12
MADS-box protein AGL16	· EUUR-XY-001-002-G07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E1
transcription factor	· EUUR-XY-001-096-D07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E2
SET-domain transcriptional regulator family	· EUUR-XY-000-010-E08-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/E3
putative photoreceptor-interacting protein-like	· EUUR-XY-001-109-H10-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/E4
orf [Ricinus communis]	· EUUR-XY-000-048-A10-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E5
unknown [Arabidopsis thaliana]	· EUUR-XY-000-075-G01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E6
ARF2 [Arabidopsis thaliana]	· EUUR-XY-000-021-C03-BA.R	[Blastx (nr)]	PL4/E7
putative photoreceptor-interacting protein-like	· EUUR-XY-000-035-H03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E8
pollen specific LIM domain protein 1a	· EUUR-XY-000-030-E03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E9
Contains similarity to gb AF136530 transcriptional regulator	· EUUR-XY-000-058-E07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E10
contains similarity to pherophorin~gene	· EUGR-ML-000-020-D09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E11
myb-like protein	· EUUR-XY-000-040-E01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/E12
histone acetyltransferase	· EUUR-XY-001-109-B03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F1

putative bHLH transcription factor	· EUGR-ML-000-026-C11-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F2
DNA-binding protein WRKY3	· EUUR-XY-000-045-C04-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F3
unknown protein	· EUUR-XY-001-108-B09-BA.S	[Blastx (nr)]	PI4/F4
WRKY transcription factor 50	· EUGR-ML-000-007-B03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F5
transcription activator	· EUGR-ML-000-016-A08-BA.S	[Blastx (nr)]	PI4/F6
T27G7.7 [Arabidopsis thaliana]	· EUGR-ML-000-040-G11-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F7
auxin response factor 6 (ARF6)	· EUSP-FX-001-008-G11-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F8
MADS-box transcription factor FBP22	· EUGR-ML-000-061-A08-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F9
auxin-regulated protein	· EUUR-XY-000-007-D11-BA.F	[Blastx (nr)]	PI4/F10
hypothetical protein	· EUUR-XY-000-037-A08-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F11
heat shock transcription factor 34	· EUUR-XY-000-015-G03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/F12
putative CCR4-associated factor	· EUGR-ML-000-027-H03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G1
B1088D01.2 Oryza sativa	· EUUR-XY-001-098-F04-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G2
GHMYB9 [Gossypium hirsutum]	· EUGR-ML-000-008-C04-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G3
TATA box binding protein (TBP) associated factor	· EUSP-FX-001-013-G07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G4
bZIP transcription factor ATB2	· EUUR-XY-000-056-G03-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G5
ethylene responsive element binding protein	· EUGR-ML-000-033-G10-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G6
GHMYB9 [Gossypium hirsutum]	· EUUR-XY-000-011-C04-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G7
bZIP transcription factor	· EUUR-XY-000-070-H12-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G8
putative bHLH transcription factor bHLH106	· EUUR-XY-000-086-G07-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G9
putative GATA transcription factor 3	· EUUR-XY-000-021-D10-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G10
LIM domain protein WLIM2	· EUUR-XY-000-028-H01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G11
putative DNA binding protein	· EUSP-FX-001-015-C12-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/G12
putative bZIP DNA-binding protein	· EUUR-XY-000-025-A10-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H1
putative heat shock transcription factor	· EUUR-XY-001-098-D09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H2
LIM domain protein PLIM1	· EUUR-XY-001-100-C12-BA.S	[Blastx (nr)]	PI4/H3
zinc finger transcription factor-like protein	· EUGR-ML-000-057-A06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H4
TATA-binding protein	· EUUR-XY-000-014-C06-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H5
unknown	· EUUR-XY-000-067-E08-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H6
DNA-binding protein -related	· EUSP-FX-001-022-A01-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H7
transcription factor Hap5a	· EUSP-FX-001-007-G11-BA.F	[Blastx (nr)]	PI4/H8
DNA-binding protein p24	· EUGR-ML-000-073-G10-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H9
putative bZIP DNA-binding protein	· EUUR-XY-000-045-E04-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H10
AP2 domain containing protein	· EUUR-XY-000-058-C02-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H11
putative DNA-binding protein RAV1	· EUGR-ML-000-012-B09-BA.R	[Blastx (nr)]	PI4/H12

### APENDICE 3

E. grandis				
read ID	gene ID	fold change	p.value	Função
EUUR-XY-000-043-D02-BA.R	unknown	5,47	0	
EUGR-ML-000-020-E07-BA.R	eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) PI3/B8	4,97	0	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-001-094-D09-BA.R	unknown	4,54	0,005	
EUGR-ML-001-085-G11-BA.R	ribulose phosphate epimerase PI1/H10	3,97	0,002	CO2 assimilation (Calvin Cycle, many chloroplast-resident proteins)
EUUR-XY-000-090-G01-BA.R	unknown	3,96	0,001	
EUGR-ML-001-086-B02-BA.R	unknown	3,53	0,002	
EUUR-XY-000-030-E03-BA.R	unknown	3,34	0,006	
	thiol protease PI2/C6	3,18	0,027	Drought and Cold Responsive Genes
EUUR-XY-000-078-E03-BA.R	unknown	2,92	0,003	
EUUR-XY-000-049-D07-BA.R	unknown	2,92	0,011	
EUUR-XY-000-020-C05-BA.R	reverse transcriptase (viral, generic term) PI2/H6	2,75	0,019	Transcription and RNA processing
EUUR-XY-000-077-G11-BA.R	unknown	2,65	0,001	
EUGR-ML-000-019-H06-BA.R	unknown	2,62	0,017	
	cryptochrome 1 PI1/G7	2,61	0,023	Photosynthesis and photoreceptors
EUUR-XY-000-023-B10-BA.R	unknown	2,5	0,027	
EUUR-XY-000-042-G10-BA.R	unknown	2,36	0,004	
EUGR-ML-000-074-B11-BA.R	transposase (transposon, generic term)	2,35	0,036	Transcription and RNA processing
EUGR-ML-000-074-E05-BA.R	unknown	2,32	0,019	
	cyclin-dependend kinase	2,29	0,019	Cell division and expansion
EUUR-XY-001-003-H08-BA.R	hsp (heat shock protein, generic term) PI3/B10	2,28	0,001	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-001-002-G07-BA.R	unknown	2,22	0,022	
EUUR-XY-000-091-D09-BA.R	unknown	2,2	0,02	
EUGR-ML-001-079-E03-BA.R	OEP (outer envelope protein, generic term) PI3/B12	2,2	0,01	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-026-F01-BA.R	unknown	2,16	0,012	
EUGR-ML-000-040-G11-BA.R	unknown	2,16	0,006	
EUUR-XY-000-032-D09-BA.R	unknown	2,13	0,022	
EUUR-XY-000-042-G09-BA.R	unknown	2,07	0,009	
EUGR-ML-001-078-B06-BA.R	inositol 1,4,5-triphosphate phosphatase PI3/A12	2,03	0,035	Signal transduction
EUUR-XY-000-077-G11-BA.R	unknown	2,02	0,041	
EUGR-ML-000-015-G07-BA.R	aa-tRNAs, asparaginyl-tRNA synthetase PI3/B3	-2,02	0,005	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-009-C03-BA.R	inorganic pyrophosphatase PI2/E4	-2,05	0,049	Sulfate assimilation
EUUR-XY-000-019-G02-BA.R	cryptochrome 2 PI1/G8	-2,07	0,039	Photosynthesis and photoreceptors
EUGR-ML-000-063-A08-BA.R	isoprene synthase PI2/G2	-2,09	0,04	Secondary metabolism (except phenylpropanoids)
EUUR-XY-000-010-G05-BA.R	water channel protein (putative) PI2/C7	-2,11	0,027	Drought and Cold Responsive Genes
EUUR-XY-001-102-G09-BA.R	cryptochrome 1 PI1/G7	-2,11	0,005	Photosynthesis and photoreceptors

EUGR-ML-000-015-D10-BA.R	ATP synthase – d subunit PI1/G4	-2,13	0,037	Photosynthesis and photoreceptors
EUUR-XY-000-020-A12-BA.R	hydroxyproline rich protein PI1/C8	-2,32	0,012	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-000-029-B04-BA.R	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic 1 PI1/C7	-2,51	0,009	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-001-085-E06-BA.R	myo-inositol-1- monophosphatase PI1/C10	-2,56	0,018	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
	DC 1.2 PI2/B9	-2,59	0,021	Drought and Cold Responsive Genes
	amine oxidase PI2/G8	-2,65	0,004	Phytohormone synthesis and response
	exo-1-4 galactanase PI1/B12	-2,67	0,001	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-000-021-C08-BA.R	unknown	-3	0,025	
	cyclin A PI1/F6	-4,24	0,005	Cell division and expansion
	glycine rich protein PI1/C5	-4,47	0,001	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-001-096-B07-BA.R	pyrophosphatase (plastidic) PI1/D7	-4,62	0	Cell wall formation: polysaccharide metabolism

E. globulus				
read ID	gene ID	Fold change	p.value	function
EUUR-XY-000-014-E02-BA.R	cyclin A PI1/F6	5,2	0,015	Cell division and expansion
EUUR-XY-001-003-H08-BA.R	hsp (heat shock protein, generic term) PI3/B10	5,02	0	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-021-F01-BA.R	chaperonin (generic term) PI3/B6	4,63	0	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-013-D12-BA.R	branching enzyme (N- acetylglucosaminyltransferase family) PI1/B3	4,06	0,021	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-000-058-E07-BA.R	unknown	3,99	0	
EUGR-ML-000-063-C05-BA.R	TOM40 (translocase outer mitochondrial membrane 40) PI3/C4	3,75	0,001	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-001-100-C12-BA.S	unknown	3,47	0	
EUUR-XY-000-058-C02-BA.R	unknown	3,21	0	
EUUR-XY-000-082-A08-BA.R	unknown	3,07	0,005	
EUUR-XY-000-091-D09-BA.R	unknown	2,96	0,002	
EUUR-XY-000-020-H01-BA.R	ATP synthase – subunit II PI1/G6	2,91	0,003	Photosynthesis and photoreceptors
EUGR-ML-000-077-A07-BA.R	mitogen-activated protein kinase (MAPK) PI3/A6	2,71	0,014	Signal transduction
EUUR-XY-000-006-C04-BA.F	unknown	2,71	0,001	
EUUR-XY-000-025-D11-BA.R	unknown	2,67	0,001	
	cinnamoyl-CoA NADP oxidoreductase (ccr) PI1/E7	2,63	0,013	
EUUR-XY-000-068-H05-BA.R	unknown	2,53	0,001	
EUUR-XY-000-012-A10-BA.R	protease (several) PI3/C11	2,53	0	Unclassified up to now
EUUR-XY-001-093-F02-BA.R	cyclin-dependent kinase (CDK) PI3/A5	2,47	0,004	Signal transduction
EUUR-XY-000-007-D11-BA.F	unknown	2,4	0	
EUUR-XY-000-045-E04-BA.R	unknown	2,37	0,008	
EUUR-XY-000-089-E06-BA.R	unknown	2,33	0,003	
EUUR-XY-000-071-D10-BA.R	unknown	2,3	0,005	

EUGR-ML-000-022-A07-BA.R	MAPK-activated protein kinase (MAPK-PK) PI3/A7	2,29	0,007	Signal transduction
EUUR-XY-000-073-D10-BA.R	unknown	2,28	0,011	
EUGR-ML-000-033-G10-BA.R	unknown	2,24	0,001	
EUUR-XY-000-043-D02-BA.R	unknown	2,22	0,007	
EUSP-FX-001-009-E07-BA.R	unknown	2,17	0,03	
EUGR-ML-000-007-F06-BA.R	U2AF (splicing factor) PI3/A2	2,17	0,003	Transcription and RNA processing
EUUR-XY-000-014-E02-BA.R	CKS1 PI1/F5	2,13	0,052	Cell division and expansion
EUUR-XY-000-029-G05-BA.R	unknown	2,09	0,039	
EUUR-XY-001-094-D09-BA.R	unknown	2,08	0,059	
EUGR-ML-000-015-F06-BA.R	thylakoid processing peptidase (plastidic) PI3/C3	2,04	0,025	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-008-G10-BA.R	Cellbiohydrolase endo-1,4-beta-glucanase PI1/B5	2,04	0,007	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-001-003-A10-BA.R	ribosomal protein (generic term) PI3/C2	2,02	0,007	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-010-G05-BA.R	water channel protein (putative) PI2/C7	2,01	0,047	Drought and Cold Responsive Genes
EUSP-FX-001-011-G09-BA.R	unknown	2,01	0,037	
EUUR-XY-000-061-A10-BA.R	acetyl-CoA synthetase PI2/D10	-2,07	0,017	Sulfate assimilation (amino acid biosynthesis)
EUUR-XY-000-070-H12-BA.R	unknown	-2,13	0,001	
EUGR-ML-000-001-E12-BA.R	b-(1,3)(1,4)-glucosidase PI1/A1	-2,15	0,063	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-000-075-A12-BA.R	b-amylase (exoamylase, multigene family) PI1/A4	-2,19	0,005	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUSP-FX-001-007-F09-BA.F	unknown	-2,22	0,04	
EUUR-XY-001-092-C02-BA.R	acyl-carrier protein (ACP) PI2/F4	-2,41	0,036	Fatty acid biosynthesis (cell membrane and oil body formation)
EUUR-XY-000-084-A05-BA.R	unknown	-2,43	0,021	
EUUR-XY-000-019-G02-BA.R	cryptochrome 2 PI1/G8	-2,5	0,016	Photosynthesis and photoreceptors
EUGR-ML-001-086-A06-BA.T	glyoxylase I (homolog) glyoxylase family protein PI2/B12	-2,53	0,04	Drought and Cold Responsive Genes
EUUR-XY-000-018-C11-BA.R	knotted-like PI1/F9	-2,56	0,007	Cell division and expansion
EUPE-XY-001-002-E09-BA.R	chalcone synthase (chs) PI1/E5	-2,61	0,059	LIGNIN
EUUR-XY-000-013-D04-BA.R	cytochrome-b/c1 complex proteins (b5) PI1/G9	-2,66	0,014	Photosynthesis and photoreceptors (many chloroplast-resident proteins)
EUUR-XY-001-002-H05-BA.R	glycine rich protein PI1/C5	-2,69	0,039	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-000-001-D07-BA.R	cyclin-dependend kinase (related to multifunctional cyclin-dependent kinase) PI1/F8	-2,96	0,01	Cell division and expansion
EUGR-ML-000-006-D07-BA.S	ADP-glucose pyrophosphorylase PI1/A11	-3,16	0,005	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-001-085-E06-BA.R	myo-inositol-1-monophosphatase PI1/C10	-3,63	0,003	Cell wall formation: polysaccharide metabolism

## E. urophylla

read ID	gene ID	Fold change	p.value	function
EUUR-XY-000-013-D12-BA.R	branching enzyme (N-acetylglucosaminyltransferase family) PI1/B3	6,49	0,007	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-000-010-E08-BA.R	unknown	3,96	0,011	
EUGR-FL-001-001-H12-BA.F	late embryogenesis abundant protein (lea, multigene family) pl2/c2	3,85	0,062	Drought and Cold Responsive Genes
EUGR-ML-000-026-C11-BA.R	unknown	3,48	0	
EUGR-ML-000-063-A11-BA.R	cystathionine b-lyase PI2/D12	2,56	0,005	Sulfate assimilation (amino acid biosynthesis)
EUUR-XY-000-082-A08-BA.R	unknown	2,53	0,022	
EUUR-XY-001-103-F10-BA.R	OEP86 (outer envelope protein, generic term 86) PI3/C1	2,52	0,009	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-076-G12-BA.R	unknown	2,48	0,004	
EUUR-XY-001-002-G07-BA.R	unknown	2,4	0,016	
EUUR-XY-001-106-G08-BA.T	pectin acetylesterase PI1/C11	2,25	0,053	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUSP-FX-001-009-E07-BA.R	unknown	2,25	0,031	
EUUR-XY-001-096-D07-BA.R	unknown	2,21	0,007	
EUUR-XY-000-068-H05-BA.R	unknown	2,17	0,009	
EUUR-XY-000-045-C04-BA.R	unknown	2,17	0,005	
EUUR-XY-001-108-F03-BA.S	unknown	2,16	0,005	
EUGR-ML-000-064-F11-BA.R	jasmonate-inducible protein PI2/C1	2,05	0,02	Drought and Cold Responsive Genes
EUUR-XY-000-027-C11-BA.R	unknown	2,04	0,024	
EUUR-XY-000-032-D09-BA.R	unknown	2,02	0,024	
EUUR-XY-001-102-A02-BA.S	unknown	2	0,026	
EUUR-XY-000-018-C11-BA.R	knotted-like PI1/F9	-2,1	0,012	Cell division and expansion
EUUR-XY-000-020-A12-BA.R	hydroxyproline rich protein PI1/C8	-2,29	0,018	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-001-084-G01-BA.R	hsp70 (heat shock protein 70) PI3/B11	-2,38	0,011	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-014-E02-BA.R	cyclin A PI1/F6	-3,92	0,008	Cell division and expansion

### E. pellita

read ID	gene ID	Fold change	p.value	function
EUGR-ML-000-061-A08-BA.R	unknown	12,3	0,003	
EUUR-XY-001-093-A05-BA.R	Patatin PI2/E5	11,23	0,047	Storage proteins
EUGR-ML-001-078-F06-BA.R	b-ketoacyl-ACP synthase II PI2/E11	11,08	0,002	Fatty acid biosynthesis (cell membrane and oil body formation)
EUUR-XY-001-106-G08-BA.T	pectin acetylesterase PI1/C11	7,16	0	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-001-104-A06-BA.R	unknown	6,84	0,001	
EUUR-XY-000-014-B03-BA.R	exonuclease (generic term) PI2/H5	4,97	0,01	DNA repair
EUSP-FX-001-007-F09-BA.R	unknown	4,4	0	
EUUR-XY-000-027-C11-BA.R	unknown	2,76	0,002	



EUGR-ML-000-074-H10-BA.R	unknown	2,68	0,001	
	protein kinase (generic term) PI3/A3	2,59	0,026	Signal transduction
EUUR-XY-001-102-A02-BA.S	unknown	2,52	0,011	
EUGR-ML-000-019-E03-BA.R	strictosidine synthase PI2/G7	2,49	0	Secondary metabolism (except phenylpropanoids)
EUUR-XY-000-009-G07-BA.R	unknown	2,37	0,008	
	TOM7 (translocase outer mitochondrial membrane 7) PI3/C5	2,32	0,016	Protein synthesis and processing
EUGR-ML-000-073-A10-BA.R	pyruvate dehydrogenase PI2/F9	2,31	0,024	Fatty acid biosynthesis (cell membrane and oil body formation)
EUGR-ML-000-009-A12-BA.R	ribose phosphate isomerase PI1/H8	2,3	0,033	CO2 assimilation (Calvin Cycle, many chloroplast-resident proteins)
EUUR-XY-000-010-G05-BA.R	water channel protein (putative) PI2/C7	2,28	0,012	Drought and Cold Responsive Genes
EUUR-XY-000-030-D08-BA.R	unknown	2,12	0,007	
EUGR-ML-000-063-H01-BA.R	unknown	2,1	0,22	
EUGR-ML-000-009-C11-BA.R	proteinase inhibitor cysteine proteinase inhibitor PI2/E6	2,08	0,049	Storage proteins
EUUR-XY-001-003-H08-BA.R	hsp (heat shock protein, generic term) PI3/B10	-2,01	0,004	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-001-003-A10-BA.R	ribosomal protein (generic term) PI3/C2	-2,01	0,013	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-054-F01-BA.R	unknown	-2,02	0,038	
EUGR-ML-000-040-G11-BA.R	unknown	-2,02	0,015	
EUUR-XY-001-107-D04-BA.S	eEF1a (eukaryotic elongation factor 1a) PI3/B7	-2,08	0,012	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-000-025-A10-BA.R	unknown	-2,09	0,046	
EUUR-XY-000-069-F08-BA.R	unknown	-2,18	0,008	
EUGR-ML-001-084-G01-BA.R	hsp70 (heat shock protein 70) PI3/B11	-2,21	0,041	Protein synthesis and processing
EUGR-ML-000-011-C07-BA.R	hydroperoxide lyase PI2/F7	-2,24	0,007	Fatty acid biosynthesis (cell membrane and oil body formation)
EUGR-FL-001-001-E12-BA.F	auxin-binding protein (generic term) PI2/G9	-2,32	0,019	Phytohormone synthesis and response
EUUR-XY-001-001-F02-BA.F	pectin esterase PI1/F12	-2,59	0,02	Cell division and expansion
EUGR-ML-000-033-G10-BA.R	unknown	-2,63	0	
EUGR-ML-000-020-E07-BA.R	eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) PI3/B8	-2,69	0,008	Protein synthesis and processing
EUUR-XY-001-102-A02-BA.T	unknown	-2,69	0,007	
EUSP-FX-001-016-G11-BA.R	unknown	-2,89	0,002	
	chalcone synthase (chs) PI1/E5	-3,01	0,017	
EUGR-ML-000-001-B06-BA.R	PS II – photosystem II proteins – superfamily PI1/H4	-3,25	0,01	Photosynthesis and photoreceptors (many chloroplast-resident proteins)
EUUR-XY-000-070-H12-BA.R	unknown	-3,28	0	
EUGR-ML-000-019-H06-BA.R	unknown	-3,37	0,002	

	unknown	-3,55	0	
EUUR-XY-000-019-G02-BA.R	cryptochrome 2 PI1/G8	-3,56	0	Photosynthesis and photoreceptors (many chloroplast-resident proteins)
EUUR-XY-000-020-C04-BA.R	Extensin PI1/C2	-3,57	0,015	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUUR-XY-000-024-C01-BA.R	pectin methyltransferase PI1/C12	-3,59	0,015	Cell wall formation: polysaccharide metabolism
EUGR-ML-000-015-D10-BA.R	ATP synthase – d subunit PI1/G4	-4,04	0,006	Photosynthesis and photoreceptors
EUUR-XY-000-019-F02-BA.R	unknown	-4,24	0	
EUUR-XY-000-089-H02-BA.R	glucose 6-phosphate dehydrogenase PI1/H6	-4,58	0,018	CO2 assimilation (Calvin Cycle, many chloroplast-resident proteins)
EUGR-XY-001-002-F03-BA.R	glycine rich protein PI1/C5	-5,97	0,001	Cell wall formation: polysaccharide metabolism

## APÊNDICE 4

		Gene Induzidos			
			Eletronic Northern %		
Read ID	Contig	Gene ID	Folha	Xilema	Total
EUUR-XY-000-011-A12-BA.R	Contig11442	cinnamoyl CoA reductase [Eucalyptus globulus]	0.0442087	0.0529234	766
EUUR-XY-000-030-D08-BA.R	Contig3117	transcription factor lim1 [Eucalyptus camaldulensis]	3.37288	47.9484	122
EUSP-FX-001-011-G09-BA.R	Contig3117	transcription factor lim1 [Eucalyptus camaldulensis]	3.37288	47.9484	122
EUUR-XY-000-029-G05-BA.R	Contig3117	transcription factor lim1 [Eucalyptus camaldulensis]	3.37288	47.9484	122
EUUR-XY-000-091-D09-BA.R	Contig3117	transcription factor lim1 [Eucalyptus camaldulensis]	3.37288	47.9484	122
EUUR-XY-000-010-G05-BA.R	Contig221	putative plasma membrane intrinsic protein [Populus tremula x Populus]	0	46.9385	91
EUGR-ML-001-086-B02-BA.R	Contig11754	QM-like protein [Elaeis guineensis]	8.07979	6.04533	68
EUUR-XY-000-077-G11-BA.R	Contig11754	QM-like protein [Elaeis guineensis]	8.07979	6.04533	68
EUSP-FX-001-007-A08-BA.R	Contig7255	NtK-1-like [Solanum tuberosum]	5.02075	4.88351	38
EUUR-XY-000-023-B10-BA.R	Contig3665	BTF3-like transcription factor [Lycopersicon esculentum]	0	7.31804	33
EUUR-XY-001-096-D07-BA.R	Contig3665	BTF3-like transcription factor [Lycopersicon esculentum]	0	7.31804	33
EUGR-ML-000-033-G10-BA.R	Contig8912	ethylene response factor [Manihot esculenta]	8.85218	19.8697	31
EUUR-XY-000-058-C02-BA.R	Contig8912	ethylene response factor [Manihot esculenta]	8.85218	19.8697	31
EUUR-XY-000-008-G10-BA.R	Contig10319	endo-1,4-beta-glucanase [Gossypium hirsutum]	0	41.3836	30
EUGR-ML-000-009-C11-BA.R	Contig1316	cysteine protease inhibitor cystatin [Malus x domestica]	14.6192	17.501	28
EUUR-XY-000-007-D11-BA.F	Contig1391	GH1 protein [Glycine max]	0	31.1363	28
EUGR-ML-000-074-E05-BA.R	Contig6952	putative transcription factor BTF3-like [Solanum tuberosum]	16.6369	14.9374	27
EUUR-XY-000-027-C11-BA.R	Contig6952	putative transcription factor BTF3-like [Solanum tuberosum]	16.6369	14.9374	27
EUUR-XY-000-025-D11-BA.R	Contig8835	orf [Ricinus communis]	1.73417	2.59503	23
EUUR-XY-000-032-D09-BA.R	Contig8835	orf [Ricinus communis]	1.73417	2.59503	23
EUSP-FX-001-009-E07-BA.R	Contig7356	EIN3-like protein [Cucumis melo]	12.4048	20.4189	22
EUUR-XY-000-045-E04-BA.R	Contig16317	bZIP transcription factor ATB2 [Glycine max]	0	29.8655	20
EUUR-XY-001-003-A10-BA.R	Contig11226	structural constituent of ribosome [Arabidopsis thaliana]	13.3385	13.9718	17
EUUR-XY-000-071-D10-BA.R	Contig14272	HAT22	0	39.9357	17
EUUR-XY-000-042-G09-BA.R	Contig10820	DNA binding / transcription factor [Arabidopsis thaliana]	29.1736	15.2795	16
EUUR-XY-000-020-H01-BA.R	Contig275	Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 2 (V-ATPase B subunit 2)	19.2179	25.882	15
EUGR-ML-000-019-H06-BA.R	Contig3893	class III HD-Zip protein 6 [Populus trichocarpa]	18.1262	21.6993	15
EUGR-ML-000-074-H10-BA.R	Contig224	myb-like transcription factor 6 [Gossypium raimondii]	34.4404	15.4611	13
EUUR-XY-000-021-F01-BA.R	Contig11021	ATP binding / protein binding [Arabidopsis thaliana]	0	10.3997	9
EUGR-ML-000-020-E07-BA.R	Contig3112	eIF3e [Arabidopsis thaliana]	32.0043	14.3674	7
EUUR-XY-001-003-H08-BA.R	Contig14832	heat shock protein binding / unfolded protein binding [Arabidopsis]	43.8348	32.7973	7
EUGR-ML-000-040-G11-BA.R	Contig370	unknown [Solanum tuberosum]	63.349	18.9592	7
EUUR-XY-000-042-G10-BA.R	Contig761	MYB85	0	62.7453	7
EUUR-XY-000-078-E03-BA.R	Contig10703	DNA binding / protein binding / zinc ion binding [Arabidopsis]	0	26.3195	7
EUUR-XY-000-090-G01-BA.R	Contig990	At5g58290 [Arabidopsis thaliana]	0	27.2342	7
EUUR-XY-001-102-A02-BA.S	Contig370	unknown [Solanum tuberosum]	63.349	18.9592	7

EUUR-XY-001-103-F10-BA.R	Contig2227	chloroplast protein import component Toc159 [Pisum sativum]	0	38.3795	6
EUUR-XY-001-106-G08-BA.T	Contig15883	carboxylic ester hydrolase [Arabidopsis thaliana]	0	58.3944	6
EUUR-XY-000-045-C04-BA.R	Contig2693	WRKY82 [Glycine max]	0	34.888	6
EUUR-XY-001-108-F03-BA.S	Contig15889	MADS box transcription factor [Populus tomentosa]	0	21.9179	6
EUUR-XY-001-102-G09-BA.R	Contig8505	cryptochrome 1 [Nicotiana sylvestris]	0	31.8396	5
EUUR-XY-000-056-B03-BA.R	Contig8597	At4g17230/dl4650c [Arabidopsis thaliana]	0	6.71706	5
EUUR-XY-000-089-E06-BA.R	Contig12483	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0	6.05034	5
EUGR-ML-000-009-A12-BA.R	Contig9139	putative ribose-5-phosphate isomerase [Oryza sativa (japonica)]	7.85043	0	4
EUUR-XY-001-002-G07-BA.R	Contig14914	transcription factor MADS27 [Oryza sativa (japonica)]	0	45.7145	4
EUUR-XY-001-094-D09-BA.R	Contig2929	ATMYB103	0	100	4
EUUR-XY-001-100-C12-BA.S	Contig16704	putative pollen specific LIM domain protein [Lycopersicon]	0	21.9179	4
EUGR-ML-000-074-B11-BA.R	Contig7194	No hits found	76.9656	23.0344	3
EUGR-ML-001-079-E03-BA.R	Contig509	TOC75	76.9656	23.0344	3
EUUR-XY-000-040-E01-BA.R	Contig13228	MYB transcription factor R3 type [Populus tremula x Populus]	0	9.73148	3
EUGR-ML-000-001-D07-BA.R	Contig6485	SRG3 (SENESCENCE-RELATED GENE 3)	100	0	2
EUUR-XY-000-043-D02-BA.R	Contig2875	anther ethylene-upregulated protein ER1 [Nicotiana tabacum]	0	100	2
EUUR-XY-000-058-E07-BA.R	Contig15624	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	0	21.9179	2
EUUR-XY-000-089-F01-BA.R	Contig15473	GHMYB9 [Gossypium hirsutum]	0	100	2

Gene Reprimidos					
			Eletronic Northern %		
Read ID	Contig	Gene ID	Folha	Xilema	Total
EUGR-XY-001-002-F03-BA.R	Contig14085	putative glycine-rich RNA-binding protein [Prunus avium]	3.13909	6.67024	226
EUUR-XY-000-012-C07-BA.R	Contig3846	xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 16 protein [Lycopersicon]	0	51.6279	126
EUUR-XY-000-058-C03-BA.R	Contig3117	transcription factor lim1 [Eucalyptus camaldulensis]	3.37288	47.9484	122
EUGR-ML-001-084-G01-BA.R	Contig8358	heat shock protein 70-3 [Nicotiana tabacum]	11.2487	25.8102	77
EUGR-ML-000-001-B06-BA.R	Contig6962	photosystem II 22 kda polypeptide [Spinacia oleracea]	60.5085	0	54
EUGR-ML-000-015-D10-BA.R	Contig6927	14-3-3 family protein [Malus x domestica]	30.7664	6.90587	49
EUUR-XY-001-107-D04-BA.S	Contig13510	EF-1 alpha [Oryza sativa]	14.1857	14.8593	36
EUUR-XY-001-092-C02-BA.R	Contig16828	acyl carrier protein [Casuarina glauca]	0	13.2641	32
EUGR-FL-001-001-E12-BA.F	Contig3961	auxin-binding protein ABP19 [Prunus persica]	0	0	30
EUGR-ML-000-020-C07-BA.R	Contig13193	light harvesting chlorophyll a/b-binding protein [Nicotiana]	72.927	2.04616	28
EUUR-XY-000-024-C01-BA.R	Contig14259	secondary cell wall-related glycosyltransferase family 47 [Populus]	0	100	24
EUGR-ML-000-010-D08-BA.R	Contig3477	lipoic acid synthase-like protein [Arabidopsis thaliana]	62.4947	0.850159	23
EUUR-XY-000-025-A10-BA.R	Contig16317	bZIP transcription factor ATB2 [Glycine max]	0	29.8655	20
EUUR-XY-000-070-H12-BA.R	Contig16317	bZIP transcription factor ATB2 [Glycine max]	0	29.8655	20
EUUR-XY-000-018-C11-BA.R	Contig16693	knotted-like homeobox protein [Populus tomentosa]	0	47.7066	17
EUUR-XY-001-003-A10-BA.R	Contig11226	structural constituent of ribosome [Arabidopsis thaliana]	13.3385	13.9718	17
EUGR-ML-001-086-A06-BA.T	Contig7216	catalytic/ lactoylglutathione lyase [Arabidopsis thaliana]	85.6029	1.06747	16

EUGR-ML-001-085-E06-BA.R	Contig10672	L-galactose-1-phosphate phosphatase [Actinidia deliciosa]	22.0353	3.29739	15
EUPE-XY-001-002-E09-BA.R	Contig15017	naringenin-chalcone synthase [Juglans nigra x Juglans regia]	0	62.7453	14
EUUR-XY-000-013-D04-BA.R	Contig11646	cytochrome b5 [Nicotiana tabacum]	0	18.6489	12
EUUR-XY-000-020-A12-BA.R	Contig655	putative protein [Arabidopsis thaliana]	25.1976	26.3941	11
EUUR-XY-000-054-F01-BA.R	Contig6914	homeobox-leucine zipper protein [Glycine max]	69.8403	15.6764	11
EUSP-FX-001-016-G11-BA.R	Contig2391	RNA binding protein Rp120 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0	52.8928	10
EUGR-ML-000-006-D07-BA.S	Contig7695	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit [Brassica napus]	39.8883	5.96891	9
EUUR-XY-000-089-H02-BA.R	Contig13335	G6PD6	0	4.31237	9
EUGR-ML-000-001-E12-BA.R	Contig6491	beta-1,3-glucanase [Prunus persica]	36.6466	0	7
EUUR-XY-000-018-D01-BA.R	Contig2613	MADS box transcription factor [Populus tomentosa]	0	100	6
EUGR-ML-000-001-D07-BA.R	Contig6485	SRG3 (SENESCENCE-RELATED GENE 3)	100	0	2
EUUR-XY-000-019-G02-BA.R	Contig2706	Cryptochrome 2 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	0	100	2