

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caracterização da Família de Fatores de Transcrição *Dof* de *Eucalyptus grandis*

Gabriel Silveira d'Almeida

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

Fevereiro de 2014

Instituição e Fontes Financiadoras

Esta dissertação foi desenvolvida sob a orientação do Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais.

Ao meu orientador Gian, pelas oportunidades e ensinamentos ao longo desses dois anos.

Aos membros da minha comissão de acompanhamento, Luís Fernando e Márcia, que estiveram sempre disponíveis para me auxiliar.

Aos secretários do PPGBCM, à direção e pessoal do CBiot, pelo apoio técnico e de infraestrutura, sem os quais este trabalho não poderia ser desenvolvido.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, incluindo aqueles que já nos deixaram, que compartilharam as longas horas de trabalho necessárias para que essa dissertação ficasse pronta. Muito obrigado Camila, Daniel, Guilherme, Juliana, Luisa, Patrícia Picolotto, Patrícia Martins, e Rochele!

Ao pessoal da Embrapa Uva e Vinho, que me aconselharam e auxiliaram tanto na dissertação quanto nas disciplinas. Obrigado Vítor e Jaiana!

Aos habitantes da Alameda Picles (mesmo os eventuais), pelas jantares e discussões filosóficas que serviram para animar as semanas, especialmente aos Srs. Von, Peters e Busnello.

Ao Marcelo, companheiro sempre confirmado para jogar os últimos lançamentos do PS3.

Aos meus primos Alice e Lourenço, pelos finais de semana de diversão em Charqueadas.

Índice

Lista de Abreviaturas	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Fatores de Transcrição	9
A Família Dof de Fatores de Transcrição.....	11
Estrutura das Proteínas Dof.....	12
Funções dos Fatores de Transcrição Dof	14
Engenharia Genética no Melhoramento de Plantas	15
<i>Eucalyptus grandis</i> como Alvo de Biotecnologia	16
Objetivos.....	20
Characterization of the <i>Eucalyptus grandis</i> Dof gene family of transcription factors	21
Summary	22
Keywords	22
Introduction.....	22
Materials and Methods.....	24
Obtaining <i>Dof</i> Gene Sequences.....	24
Sequence Alignment and Phylogenetic analysis.....	24
Search for Conserved Motifs.....	25
Plant Germination	25
Biotic and Abiotic Treatments	26
Total DNA and RNA Extractions.....	26
Primer Design and RT-qPCR Assays.....	26
Results and Discussion	27
Phylogenetic Analysis	27
<i>E. grandis</i> Dof Relative Gene Expression	37
Conclusion.....	43
Reference List.....	44
Supplemental Material	48
Figure S1	48
Figure S2	49

Figure S3	50
Figure S4	51
Figure S5	52
Discussão	53
Análises Filogenéticas	53
Expressão Relativa dos Genes <i>Dof</i> em <i>E. grandis</i>	56
Conclusão.....	58
Referências	59
Curriculum Vitae Resumido	65

Lista de Abreviaturas

ABA - Ácido abscísico (*abscisic acid*)

cDNA - DNA Complementar (*complementary DNA*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNase - Desoxirribonuclease (*deoxyribonuclease*)

Dof - Ligação a DNA com um dedo (*DNA binding with one finger*)

M-MLV - Transcritase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (*Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*)

mRNA - RNA mensageiro (*messenger RNA*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR - PCR quantitativa ou em tempo real (*quantitative PCR or real-time PCR*)

KIN - Cinetina (*kinetin*)

RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

NAA - Ácido naftalenoacético (*naphthaleneacetic acid*)

NaCl - Cloreto de sódio (*sodium chloride or natrium chloride*)

RT-qPCR - qPCR precedida de transcrição reversa

Resumo

O eucalipto é a arbórea mais cultivada no mundo para a exploração comercial de madeira. No Brasil, a principal espécie do gênero *Eucalyptus* utilizada é *E. grandis*, cujo cultivo, principalmente de híbridos com outras espécies, é voltado para a produção de celulose e papel. A relevância econômica do eucalipto para o Brasil e para vários países do mundo tem estimulado avanços científicos e tecnológicos, desde a área de biologia molecular até a silvicultura e a indústria de processamento da madeira. Entre os tópicos de interesse em biologia molecular estão genes e proteínas responsáveis pelo crescimento, pela qualidade da madeira e pela resposta vegetal a estresses ambientais. A família de proteínas Dof (*DNA binding with one finger*) compreende fatores de transcrição exclusivos de plantas, caracterizados pela presença do domínio Dof de ligação ao DNA, que contém uma estrutura semelhante ao domínio “dedo-de-zinco”. Esses fatores estão relacionados à ativação e à inibição de promotores de genes envolvidos nos mais variados fenômenos metabólicos das plantas tais como desenvolvimento do endosperma, metabolismo de carboidratos, germinação de sementes, desenvolvimento vascular e resposta a fitormônios.

Pelo presente trabalho, visou-se caracterizar os fatores de transcrição Dof de *E. grandis* realizando-se análises filogenéticas com ferramentas de bioinformática, além de ensaios de RT-qPCR para se determinar perfis de expressão relativa dos genes *Dof* de *E. grandis* em folhas, caules e raízes de plantas sob diferentes tratamentos bióticos e abióticos que incluíram ABA, NAA, KIN, NaCl e seca. As análises filogenéticas permitiram a identificação de dez pares de genes parálogos no genoma de *E. grandis*, além de 13 grandes clados e nove pequenos grupos de genes ortólogos entre *E. grandis*, *Arabidopsis thaliana* e *Populus trichocarpa*. Os resultados permitiram-nos sugerir funções aos fatores de transcrição Dof de *E. grandis*. Os perfis de expressão relativa exibidos levaram-nos a concluir que os genes *Dof* são expressos em diversos órgãos e apresentam diferentes graus de acúmulo de mRNAs sob diferentes tratamentos.

Abstract

Eucalypt is the most widely cultivated tree in the world for commercial logging. In Brazil, the main species of the *Eucalyptus* genus used is *E. grandis*, whose cultivation, mainly done with hybrids, is geared primarily for the production of pulp and paper. The economic relevance of eucalypts in Brazil and many countries worldwide has stimulated scientific and technological advances, from molecular biology to forestry and wood processing industry. Among the topics of interest in molecular biology are genes and proteins responsible for growth, the quality of wood and the plant response to environmental stress. The Dof (DNA binding with one finger) family of proteins comprehends plant exclusive transcription factors characterized by the presence of the DNA binding Dof domain, which is similar to the zinc finger domain. Dof transcription factors are related to the activation and inhibition of the promoters of genes involved in various plant metabolisms such as endosperm development, carbohydrate metabolism, seed germination, vascular development and response to phytohormones.

In this study, we aimed to characterize the Dof transcription factors of *E. grandis* through phylogenetic analyzes using bioinformatic tools, in addition to RT-qPCR assays to determine the relative expression profiles of *E. grandis* Dof genes in leaves, stalks and roots of plants under different biotic and abiotic treatments that included ABA, NAA, KIN, NaCl and drought. Phylogenetic analysis allowed the identification of 10 pairs of paralogous genes in the genome of *E. grandis*, in addition to 13 major clusters and 9 small groups of orthologous genes between *E. grandis*, *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*, which allowed us to suggest functions for the *E. grandis* Dof transcription factors. The relative expression profiles showed that the Dof genes are expressed in various organs and display different degrees of mRNA accumulation under different treatments.

Introdução

Fatores de Transcrição

O controle do início da transcrição é considerado o nível mais importante da regulação da expressão gênica. Em procariotos, nos quais os genes estão organizados em operons e as células devem responder rapidamente a alterações do meio externo, o controle dá-se por meio de proteínas repressoras, que precisam ser removidas para que a transcrição ocorra, ou proteínas ativadoras, que aumentam a taxa de formação de complexos de início da transcrição. Uma única enzima RNA polimerase está presente em células procarióticas, a qual é capaz de reconhecer e ligar motivos conservados do DNA por meio de sua subunidade variável sigma (σ), e sintetizar RNA sem auxílio de outras enzimas. A modulação da transcrição de células procarióticas envolve, eventualmente, outros mecanismos de regulação, incluindo, entre outros, a própria tradução de proteínas como é o caso do mecanismo conhecido por atenuação (FILTZ *et al.*, 2013; SCHWECHHEIMER & BEVAN, 1998; ZAHA *et al.*, 2003).

Nos eucariotos, a maior parte dos genes está organizada em unidades de transcrição únicas, compostas por uma região codificadora e regiões controladoras a montante (promotor) e a jusante (terminador), classicamente. Cinco tipos distintos de RNA polimerases estão presentes nas células vegetais, incluindo as RNA polimerases I, II e III nucleares, a RNA polimerase mitocondrial e, também, uma RNA polimerase plastídica como a dos cloroplastos. Os complexos proteicos basais (holoenzimas) das enzimas nucleares são incapazes de, por si só, reconhecer motivos na sequência de DNA e, conseqüentemente, de se ligar ao mesmo para promover a transcrição. Para que ocorra a transcrição, são necessários fatores acessórios, isto é, moléculas proteicas que apresentam domínios de ligação ao DNA e que são capazes de interagir com elementos regulatórios de ação *cis* (sequências nucleotídicas do próprio DNA), como

exemplificado na Figura 1. Os fatores de transcrição podem ser gerais, ligando-se a elementos *cis* presentes em quase todas as sequências promotoras como TATA-*box*, CAAT-*box* ou CG-*box*, ou específicos, capazes de reconhecer uma sequência *cis* dentro de cada grupo de promotores. Os fatores de transcrição específicos designam quais genes deverão ser ativados ou reprimidos em resposta a sinais endógenos ou exógenos. Eles determinam quando, onde e em resposta a quais sinais os genes deverão ser transcritos ou reprimidos. A modulação da atividade dos próprios fatores de transcrição em resposta aos sinais é mediada por diferentes cascatas de ativação e transmissão. No caso da ativação da transcrição, fatores específicos recrutam fatores gerais e uma das RNA polimerases para que ocorra a transcrição. Portanto, as funções dos fatores de transcrição incluem o reconhecimento e a ligação a motivos de regulação *cis*, o recrutamento (ou o bloqueio) de outros fatores de transcrição, o recrutamento (ativadores) ou o bloqueio (repressores) da RNA polimerase, o direcionamento da atividade da RNA polimerase e a iniciação ou o bloqueio da transcrição (FILTZ *et al.*, 2013; SCHWECHHEIMER & BEVAN, 1998; ZAHA *et al.*, 2012).

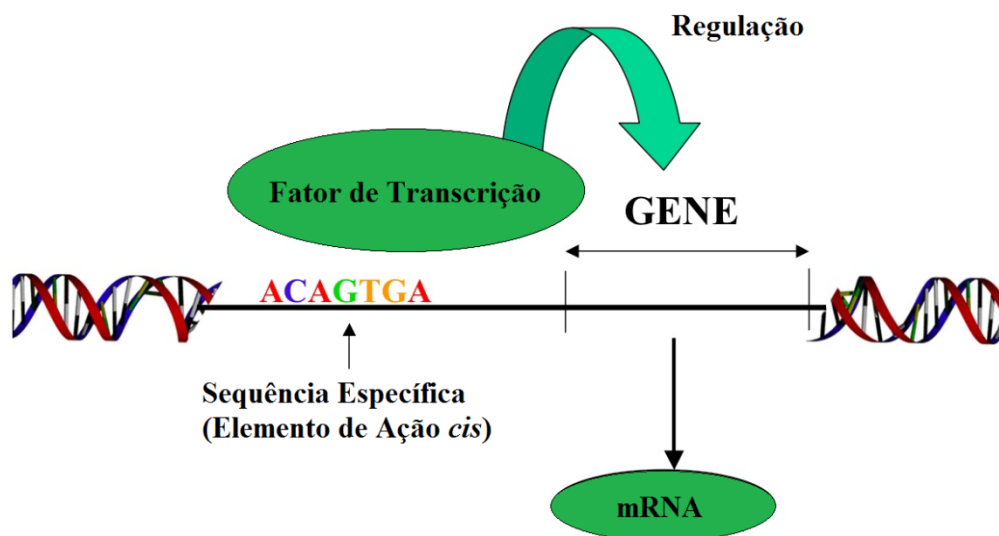


Figura 1. Visão geral da ação dos fatores de transcrição. O fator de transcrição, uma molécula proteica com sítio de ligação ao DNA, reconhece e liga uma sequência específica no promotor do gene. Essa ligação é capaz de regular (ativando ou reprimindo) a transcrição do mesmo. Material adaptado da DUKE University,

disponível em <https://howardhughes.trinity.duke.edu/blogs/2011/06/24/zinc-fingers-plasmids-and-my-battle-with-e-coli>.

A Família Dof de Fatores de Transcrição

A família Dof (ligação a DNA com um dedo, do inglês, *DNA binding with one finger*) compreende fatores de transcrição exclusivos de plantas, caracterizados pela presença de um motivo de ligação ao DNA semelhante ao domínio dedo-de-zinco. Estas proteínas podem agir tanto como ativadores quanto repressores da transcrição gênica, e parecem ter evoluído para controlar a expressão de genes de processos característicos de plantas (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004).

O primeiro gene *Dof* (*MNB1/ZmDOF1*) foi isolado e caracterizado a partir do milho (*Zea mais*) e demonstrado estar envolvido com outro gene *Dof* desta mesma espécie (*ZmDOF2*) na regulação da expressão, pela luz, do gene que codifica a C4-fosfenolpiruvato-carboxilase (C4-PEPC). Ambos os genes são expressos constitutivamente em folhas e colmos de milho e são, respectivamente, ativadores e repressores transcricionais do promotor do gene *C4-PEPC* em ensaios de expressão transiente em protoplastos de folhas de milho (YANAGISAWA & SHEEN, 1998). Nas últimas décadas, genes codificadores de fatores de transcrição Dof foram identificados em diversas outras espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas incluindo trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), *Brachypodium distachyon*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, abóbora (*Cucurbita pepo*), batata (*Solanum tuberosum*), ervilha (*Pisum sativum*), mamão (*Carica papaya*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), álamo (*Populus trichocarpa*), algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*, alfafa (*Medicago truncatula*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e aveia (*Avena sativa*) (revisado em NOGUERO *et al.*, 2013; e YANAGISAWA, 2004). Considerando-se as relações filogenéticas dos organismos onde foram identificados, os genes *Dof* parecem ter se originado de um ancestral comum que manteve uma única cópia na alga unicelular *C. reinhardtii* e,

posteriormente, expandiu-se para outros grupos taxonômicos, aumentando de número por meio de eventos de duplicação (MORENO-RISUENO *et al.*, 2007).

Estrutura das Proteínas Dof

A estrutura das proteínas Dof pode ser dividida em um domínio Dof na região conservada N-terminal e uma região “não-Dof” na região C-terminal altamente variável. O domínio Dof apresenta-se como um domínio de ligação ao DNA com 52 resíduos de aminoácidos, com uma estrutura única contendo quatro resíduos de cisteína (C) que ligam um átomo de zinco (Zn; Figura 2). O domínio Dof é designado pela sequência conservada $CX_2CX_{21}CX_2C$, onde X corresponde a qualquer aminoácido. Este domínio permite aos fatores Dof reconhecerem motivos *cis* contendo a sequência 5'-AAAG-3' nos promotores de genes (UMEMURA *et al.*, 2004; YANAGISAWA & SCHMIDT, 1999). Já a região fora do domínio Dof não aparenta ter função de ligação ao DNA. Devido à sua alta variabilidade, a região não-Dof está provavelmente relacionada às diferentes funções exercidas por essas proteínas (YANAGISAWA & SCHMIDT, 1999).

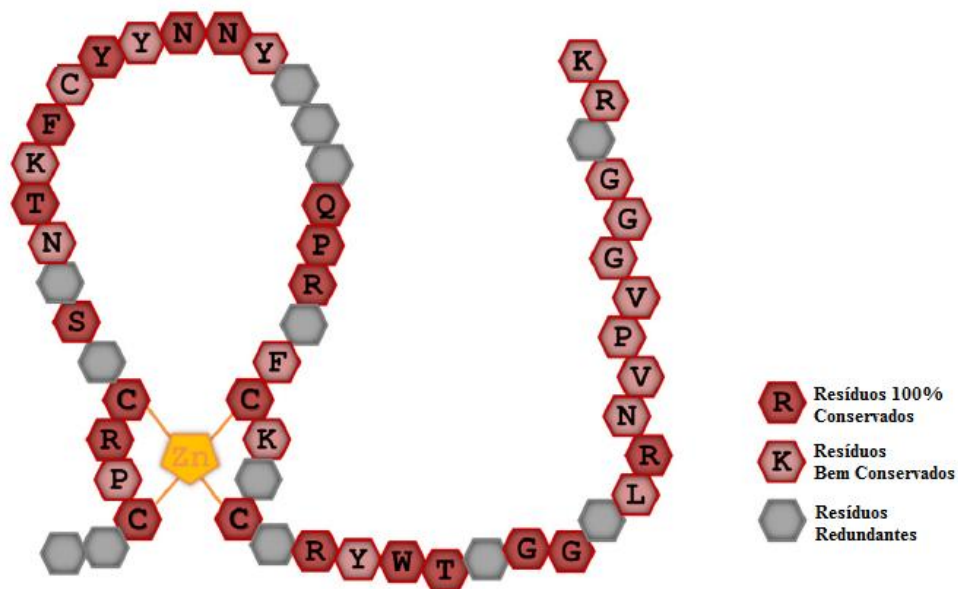


Figura 2. O domínio Dof de ligação ao DNA. Resíduos de aminoácidos são apresentados com seu código IUPAC de uma letra. Resíduos bem conservados são aqueles que apresentam pelo menos 75% de conservação. Imagem adaptada de NOGUERO *et al.* (2013).

Cada gene *Dof* codifica apenas um domínio Dof e, conseqüentemente, cada proteína codificada apresenta apenas um motivo de ligação ao DNA (DÍAZ-RIQUELME *et al.*, 2009). Experimentos utilizando agentes quelantes de metal permitiram mostrar a inibição da ligação dos fatores Dof ao DNA. A adição posterior de Zn ao meio foi capaz de restaurar esta ligação. Além disso, a substituição dos resíduos conservados de cisteína por serina (S) e alanina (A) inibiu completamente a capacidade de ligação dessas proteínas ao DNA, *in vivo* e *in vitro* (YANAGISAWA, 2004).

O domínio Dof também é caracterizado pela sua bifuncionalidade, sendo capaz de mediar interações proteína-proteína. Interações deste tipo foram demonstradas em *arabidopsis* e milho. Em ambos os casos, foi demonstrado que os fatores Dof são capazes de se ligar a proteínas de resposta ao estresse contendo um domínio de “zíper-de-leucinas”. Também foi demonstrada a interação entre o domínio Dof e o domínio HMG-*box*. Este domínio representa os

sítios de ligação ao DNA de proteínas nucleares não-histonas da família do grupo de alta mobilidade (do inglês, *high mobility group*). Foi demonstrado que a ligação do fator de transcrição Dof1 de milho ao DNA foi facilitada pela proteína HMG. Mesmo que apenas algumas proteínas Dof tenham apresentado interação proteína-proteína *in vitro*, considera-se que a maioria desses fatores de transcrição deva ser capaz de realizar as interações também *in vivo*, tendo-se em vista que o domínio é altamente conservado em todos os membros da família (YANAGISAWA, 2004).

Funções dos Fatores de Transcrição Dof

As funções dos produtos de genes *Dof* são tão variadas quanto suas regiões não-Dof. Já foram descritos fatores Dof relacionados com desenvolvimento do endosperma (VICENTE-CARBAJOSA *et al.*, 1997), metabolismo de carboidratos (YANAGISAWA & SHEEN, 1998), mecanismos de defesa específicos de vegetais (BAUMANN *et al.*, 1999), germinação de sementes (PAPI *et al.*, 2000), florescimento (FORNARA *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2009), desenvolvimento vascular (KONISHI & YANAGISAWA, 2007) e resposta a reguladores de crescimento (KISU *et al.*, 1998). Além disso, proteínas Dof foram incluídas em redes de interações de fatores de transcrição em resposta a estresses (COOPER *et al.*, 2003) e ao silenciamento de certas enzimas como a ascorbato-oxidase em abóbora (KISU *et al.*, 1998).

Os fatores de transcrição Dof podem ter sua ação modificada por alterações estruturais e a expressão dos genes *Dof* pode ser alterada pela própria via de metabolismo de um nutriente ou composto utilizado pela planta. O fator de transcrição TaDof1 de trigo foi relacionado com o metabolismo de nitrogênio, sofrendo, inclusive, regulação positiva sob baixas concentrações deste composto (KUMAR *et al.*, 2009). Alterações nas estruturas das proteínas DAG1 e DAG2 de *Arabidopsis* determinaram modificações no processo de germinação da planta (GUALBERTI *et al.*, 2002). Portanto, os fatores de transcrição Dof estão envolvidos na regulação de genes característicos de plantas, cujos produtos

podem possuir inúmeras funções. Visto que genes ortólogos normalmente apresentam funções semelhantes, estudos filogenéticos permitiram sugerir pistas sobre a função de fatores Dof, obtidas quando proteínas recém-descobertas desta família são comparadas a outras já identificadas e devidamente caracterizadas (LIJAVETZKY *et al.*, 2003).

Engenharia Genética no Melhoramento de Plantas

A alteração da expressão de genes endógenos ou a inserção de genes exógenos em plantas mostrou-se eficaz para atingir diversos objetivos segundo ampla literatura científica. Alguns exemplos a destacar incluem: Indivíduos do gênero *Citrus*, onde a superexpressão dos fatores de transcrição *LEAFY* ou *APETALA1* de arábida foi capaz de gerar plantas com fase juvenil reduzida e florescimento precoce, capazes de gerar frutos em apenas 20 meses (PEÑA *et al.*, 2001). Em tomate, a superexpressão do gene *LeCOP1-Like*, um homólogo do gene *COP1* de arábida, foi capaz de gerar plantas que produziam frutos com concentração de carotenoides até 43% maior do que as selvagens, comprovando que a alteração da expressão de genes responsivos à luz é uma via válida para a alteração do valor nutritivo de frutos (LIU *et al.*, 2004). Em arábida, a superexpressão do transportador de sódio *HKT1* em raiz gerou plantas resistentes à alta salinidade (MØLLER *et al.*, 2009). Em tabaco, a expressão em cloroplasto dos genes bacterianos *merA* e *merB* gerou plantas resistentes a altas concentrações de mercúrio, com acentuada capacidade de biorremediação (RUIZ *et al.*, 2003). Finalmente, em arroz, a expressão do gene *psy* de milho, foi capaz de gerar plantas que produziam e armazenavam β -caroteno nos grãos, gerando o produto conhecido como “Golden Rice 2”, cujo consumo pode reduzir a deficiência de vitamina A que acomete diversos povos da África e Ásia central (PAINE *et al.*, 2005).

Esse mesmo potencial para alterar o metabolismo de plantas está presente nos indivíduos da família Dof: Em estudo realizado com *A. thaliana*, a expressão da proteína GmDof4, de soja, gerou plantas cujas sementes apresentavam maior

concentração de lipídeos (WANG *et al.*, 2007). A superexpressão da proteína Dof DAG1, também em *A. thaliana*, gerou plantas que apresentavam dormência reduzida (PAPI *et al.*, 2008). Finalmente, em batata, a superexpressão da proteína Dof SRF1 gerou modificações no metabolismo de carboidratos do tubérculo, resultando em maiores concentrações de amido e reduzida concentração de monossacarídeos (TANAKA *et al.*, 2009).

***Eucalyptus grandis* como Alvo de Biotecnologia**

O eucalipto é a arbórea mais cultivada no mundo para exploração comercial de madeira. No Brasil, o cultivo de eucalipto é voltado principalmente para a produção de celulose e papel que, além de abastecer o mercado interno, gera matéria-prima e produtos beneficiados para exportação. De acordo com dados publicados pela Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA), a exportação de celulose brasileira tem como principais mercados a Europa (40%), a China (30%), a América do Norte (20%), a Ásia/Oceania (7%) e a América Latina (1%). Essas exportações corresponderam a US\$ 4,7 bilhões entre janeiro e novembro de 2013. Já as exportações de papel têm como principais mercados a América Latina (56%), a Europa (15%), a América do Norte (13%), a Ásia/Oceania (7%), a África (5%) e a China (4%), e atingiram US\$ 1,9 bilhão neste mesmo período (Figura 3). Essa produção ocorreu em 220 empresas, de 450 municípios, em 17 estados, gerando 114 mil empregos diretos e 500 mil indiretos (BRACELPA, 2013 – dados acessáveis em www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/34).

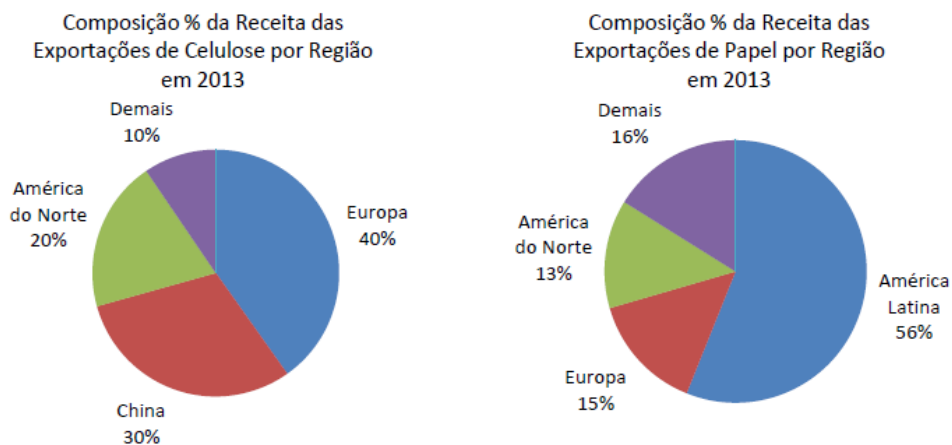


Figura 3. Composição percentual da receita das exportações de celulose e papel por região em 2013. Dados disponíveis em www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/34.

A alta variabilidade característica do gênero *Eucalyptus*, com mais de 700 espécies descritas, despertou interesse no melhoramento genético destas plantas, visando modificações desejáveis para a indústria. No Brasil, *E. grandis* (Figura 4) é a espécie mais importante para a obtenção de papel e pasta de celulose, principalmente na forma de híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* (MOKFIENSKI & COLODETTE, 2008). Devido ao seu valor econômico para o Brasil, seu ótimo desenvolvimento em regiões de clima tropical e subtropical, seu rápido crescimento volumétrico, o bom conteúdo de celulose e a resistência a pragas, esta espécie tornou-se candidata óbvia a estudos genéticos e genômicos.



Figura 4. *Eucalyptus grandis* de 27 anos de idade em floresta plantada na costa de Hamakua, Havaí. Foto do Dr. J.B. Friday, disponível em www.ctahr.hawaii.edu/forestry.

Em 2002, no âmbito do Fundo Setorial Verde-Amarelo do Ministério da Ciência e Tecnologia e com o apoio de 14 empresas de celulose e papel, foi lançado o projeto “*GENOLYPTUS*: Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*”, pelo qual se realizou o sequenciamento do transcrito de *E. grandis* e de outras espécies de *Eucalyptus*, além de vários outros estudos de genética, fitopatologia e fisiologia deste vegetal (JAHNS, 2008; MEDEIROS, 2009). Em virtude do impacto da cultura de *E. grandis* mundialmente, um projeto internacional de sequenciamento genômico foi sediado no *Joint Genome Institute* (JGI) do Departamento de Energia dos Estados Unidos (USDoE). A árvore selecionada para sequenciamento do genoma foi desenvolvida pela empresa Suzano Papel e Celulose S.A. (Suzano, SP), e as amostras de ácidos nucleicos enviadas ao JGI foram preparadas na Universidade Federal de Viçosa e pelo nosso grupo no CBiot/UFRGS. O Projeto *EucaGen*, como foi denominado, contou com a coordenação dos Drs. Jerry Tuskan (JGI, USDoE, EUA), Zander Myburg

(Universidade de Pretória, África do Sul) e Dario Grattapaglia (Embrapa-Cenargen, Brasília, DF).

Com a finalização do sequenciamento e montagem do genoma de *E. grandis*, os dados foram disponibilizados à comunidade científica mundial no banco de dados *online* Phytozome (www.phytozome.com). O sequenciamento do genoma apresenta cobertura de 8X, apresentando 691 Mb distribuídas em 4.952 *scaffolds*. Um manuscrito de artigo científico com os resultados da análise completa do genoma de *E. grandis* está submetido para publicação, com participação autoral de nosso grupo de pesquisa (Zander Myburg, comunicação pessoal). As sequências gênicas potencialmente codificadoras de fatores Dof de *E. grandis* foram obtidas a partir destes dados junto ao Phytozome. Essas sequências, porém, não estão acompanhadas de quaisquer outras informações necessárias para futuros estudos envolvendo a família Dof de *E. grandis*, tais como possíveis funções, sítios e padrões de expressão e possíveis ortólogos.

Objetivos

O presente trabalho visa caracterizar, a família de genes *Dof* de eucalipto e as proteínas por eles codificadas.

Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

(i) Obter as sequências potencialmente codificadoras dos fatores de transcrição *Dof* de *E. grandis*, *A. thaliana* e *P. trichocarpa*.

(ii) Caracterizar *in silico* a estrutura das proteínas *Dof* codificadas;

(iii) Localizar a posição dos genes *Dof* nos cromossomos de *E. grandis*;

(iv) Realizar análises filogenéticas dos genes *Dof* e suas proteínas codificadas, de modo a sugerir possíveis funções.

(v) Avaliar os perfis de expressão relativa dos genes *Dof* de *E. grandis* em diferentes tecidos e diferentes tratamentos de estresses bióticos e abióticos.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *New Phytologist* (Fator de Impacto 6,736)

Characterization of the *Eucalyptus grandis* Dof gene family of transcription factors

Gabriel Silveira d'Almeida¹; Michèle Claire Breton¹; Patrícia Dalcin Martins²; Vítor da Silveira Falavigna¹; Andreia Carina Turchetto-Zolet³; Luís Fernando Revers⁴; Giancarlo Pasquali^{1§}

¹Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

²Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

³Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil;

⁴Laboratory of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bento Gonçalves, RS, 95700-000, Brazil

[§]Corresponding author.

Summary

Dof proteins are a family of plant-exclusive transcription factors (TFs) that contain a highly conserved zinc finger-like DNA binding domain. These TFs have been found to control the transcription of genes related to plant specific phenomena such as endosperm development, flowering and seed germination. In the current study, we have obtained 26 gene sequences putatively encoding Dof TFs in the genome of *Eucalyptus grandis*. Phylogenetic analyses including *E. grandis* Dof genes and the known Dof genes from *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa* were performed. We have also assayed the relative expression levels of the *E. grandis* Dof genes under selected biotic and abiotic treatments in leaf, stalk and root by RT-qPCR. The results of phylogenetic analysis demonstrated the formation of 13 main clusters and nine minor groups of orthologous genes between the analyzed species. The RT-qPCR assays resulted in the expression patterns of 20 *E. grandis* Dof genes both under standard growth conditions and under high concentrations of abscisic acid, kinetin, 1-naphthaleneacetic acid, sodium chloride and drought. This work represents the first steps towards a genome-wide analysis of Dof genes in *Eucalyptus*.

Keywords

Eucalyptus grandis; Dof; Phylogenetic Analysis; Relative Expression; RT-qPCR.

Introduction

The Dof (DNA binding with one finger) family of proteins comprehends plant exclusive transcription factors (TFs), characterized by the presence of a highly conserved zinc finger-like DNA binding domain (NOGUERO *et al.*, 2013). These proteins seem to control the transcription of genes related to plant specific

phenomena such as endosperm development (VICENTE-CARBAJOSA *et al.*, 1997), carbohydrate metabolism (YANAGISAWA & SHEEN, 1998), plant specific defense mechanisms (BAUMANN *et al.*, 1999), seed germination (PAPI *et al.*, 2000), flowering (FORNARA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009), and vascular development (KONISHI & YANAGISAWA, 2007).

The first gene encoding a Dof protein was named MNB1/ZmDOF1 and it was isolated from corn. Along with another *Dof* gene from this species (ZmDof2), it was shown to act in the regulation of the gene that encodes the C4-phosphoenolpyruvate carboxylase (YANAGISAWA & SHEEN, 1998). Since then, Dof transcription factors have been identified in several plant species, including wheat, barley, rice, tobacco, arabidopsis, pumpkin, potato, pea, papaya, poplar and tomato (NOGUERO *et al.*, 2013). These genes appear to have originated from a common ancestor that kept a single copy in the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* and, afterwards, expanded to different taxonomic groups, increasing in number by means of duplication events (Moreno-Risueno *et al.*, 2007).

The DNA binding Dof domain is characterized by a highly conserved amino acid sequence, with two pairs of cysteine residues that create the zinc finger-like motif by interacting with a zinc (Zn) atom (UMEMURA *et al.*, 2004; YANAGISAWA & SCHMIDT, 1999). Experiments with metal chelators were able to prevent the binding of these proteins to DNA, and the addition of Zn restored the binding ability. The substitution of critical cysteine residues with serine or alanine also inhibited the binding (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004).

The Dof domain is also involved in protein-protein interactions, being classified as a bifunctional domain (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004). Interactions between proteins mediated by the Dof domain were already described in arabidopsis and corn (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004). In both cases, Dof proteins were capable of interacting with stress response proteins containing a leucine zipper domain. Since the Dof domain is highly conserved, it is presumed that all Dof proteins should be able to perform protein-protein interactions *in vivo*.

In order to better understand the importance of *Dof* genes and proteins in *Eucalyptus* trees, especially in what concerns wood biogenesis and defense mechanisms, we started an effort to characterize this gene/protein family in *E. grandis*. In this study, we describe the characterization of 26 *E. grandis* *Dof* genes. We performed phylogenetic analysis including *Dof* gene sequences from *E. grandis*, *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*, as well as RT-qPCR assays on three organs (leaf, stalk and root) from *E. grandis* plants under selected biotic or abiotic stresses. All together, these results shed light on possible functions of *Dof* genes from *E. grandis*.

Materials and Methods

Obtaining *Dof* Gene Sequences

Both nucleotide and amino acid-derived sequences corresponding to *Dof* genes from *E. grandis* (26 genes), *A. thaliana* (36 genes) and *P. trichocarpa* (41 genes) were obtained from their genomes available in the online genome databank Phytozome (GOODSTEIN *et al.*, 2012), The Arabidopsis Information Resource (LAMESCH *et al.*, 2011), and the Plant Transcription Factor Database (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009), respectively. One sequence from *P. trichocarpa* (Ptr_DOF7) presented an incomplete *Dof* domain, and was excluded from further analysis.

Sequence Alignment and Phylogenetic analysis

The complete *Dof* deduced amino acid sequences from the three species were aligned using the MUSCLE algorithm (EDGAR, 2004) implemented in the software MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). Two distinct alignments were performed: one containing only the sequences from *E. grandis*, and another

containing the sequences from the three species. The best amino acid substitution model for both results was determined as Jones–Thornton–Taylor with gamma distribution (JTT+G), also using MEGA. Both alignments were then used to generate two phylogenetic trees with the software MrBayes (RONQUIST *et al.*, 2012), using the JTT+G model: one containing the complete amino acid sequences from *E. grandis*, and another containing the 102 complete amino acid sequences from the three species. Both trees were calculated using 2 million generations with a sample frequency of 100. Finally, the *Dof* nucleotide sequences from *E. grandis* were located to their respective chromosomes with the software MapChart (VOORRIPS, 2002), using the chromosomal sizes (Mb) and genes physical positions published at Phytozome.

Search for Conserved Motifs

Two searches for conserved motifs were performed using the online software MEME Suit (BAILEY *et al.*, 2009). The first search was performed with the 26 full-length *E. grandis* *Dof*-derived amino acid sequences to find 20 different motifs, with minimum and maximum length of 6 and 55, respectively. Other search options were left at standard values. The second search was performed with the 102 full-length amino acid sequences from the tree species chosen, using the same parameters as before. In the second search, the *Dof* domain was found divided between motifs 1 and 2, which were combined for further analysis.

Plant Germination

E. grandis seeds were germinated and plants were grown on plastic vials (50 mL) with an equivalent mix of soil and vermiculite, under 16-hours photoperiod at 25 °C in growth chambers. Plants received fresh water continuously during three months of growth.

Biotic and Abiotic Treatments

Twenty-one *E. grandis* plants (90-days-old) were organized in seven groups of three morphologically equivalent individuals, with each group receiving either a biotic or an abiotic treatment in the form of a 20 mL solution administered once on soils. Concentrations were defined based on referenced works with other plant species. Biotic treatments included 100 μ M abscisic acid (ABA; ZOU *et al.*, 2009), 50 μ M 1-naphthaleneacetic acid (NAA; SON *et al.*, 2005) or 10 μ M kinetin (KIN; GAUDINO & PIKAARD, 1997). Abiotic treatments included 200 mM sodium chloride (NaCl; CORNEY *et al.*, 2003) or drought for six days. Two control groups received 20 mL of ultrapure water. Leaf, stalk and root samples were harvested after 72 hours of administration (YANG *et al.*, 2011), frozen immediately in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. At the harvesting day, only drought plants displayed morphological alterations in the form of prostrated leaves.

Total DNA and RNA Extractions

Total DNA and RNA extractions were performed with frozen samples using the cetrimonium bromide (EB-CTAB) protocol, modified from BOKSZCZANIN & PRZYBLA (2006). Nucleic acid samples were visualized in 1% agarose gels containing ethidium bromide and quantified with a spectrophotometer. RNA quality was confirmed spectrophotometrically and samples were treated with DNase I (Promega).

Primer Design and RT-qPCR Assays

Thirteen pairs of oligonucleotide primers for *E. grandis* *Dof* genes were designed with the online software from Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT), using complete gene sequences. RNA samples were used as templates for cDNA synthesis with M-MLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs). Complementary DNA samples were then used in qPCR assays with primer pairs specific to each *E. grandis* *Dof* gene. Samples from each treatment group were pooled and biological triplicates and technical quadruplicates were employed to assess *Dof* steady-state mRNA levels using the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) and represented graphically. For all assays, Ct values were normalized with two *E. grandis* constitutive genes *Eucons4* and *Eucons8* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). An untreated control sample was used as calibrator for normalization of the relative expression of treated samples. Values obtained from root samples were used as calibrators for leaf and stalk for the relative expression of the untreated plants.

Results and Discussion

Phylogenetic Analysis

In order to characterize the *Dof* genes from *E. grandis*, the 26 *E. grandis* amino acid sequences obtained from Phytozome were phylogenetically compared to the *Dof* amino acid sequences from *P. trichocarpa* (a woody plant, closer to *E. grandis* than other species with published *Dof* genes) and *A. thaliana* (the species with the most well-described *Dof* family), by both alignment of the full-length sequences, and the construction of phylogenetic trees. Conserved motifs were also identified and used to complement the results obtained from the trees. Finally, each *Dof* gene from *E. grandis* was located to its respective chromosome, and putative paralogs were linked.

As expected, the alignment of the full-length *E. grandis* protein sequences from the 26 *Dof* genes resulted in a low identity outcome, with many gaps. Only the Dof domain exhibited high identity between peptide sequences, including the two pairs of cysteine residues critical for the zinc finger-like motif of the protein (Fig. 1).

Similar results were obtained by the alignment of the 102 Dof sequences from *E. grandis*, *A. thaliana* and *P. trichocarpa*. These results are consistent with the high variability of the non-Dof domains of the proteins, contrasted by the highly conserved Dof domain (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004).

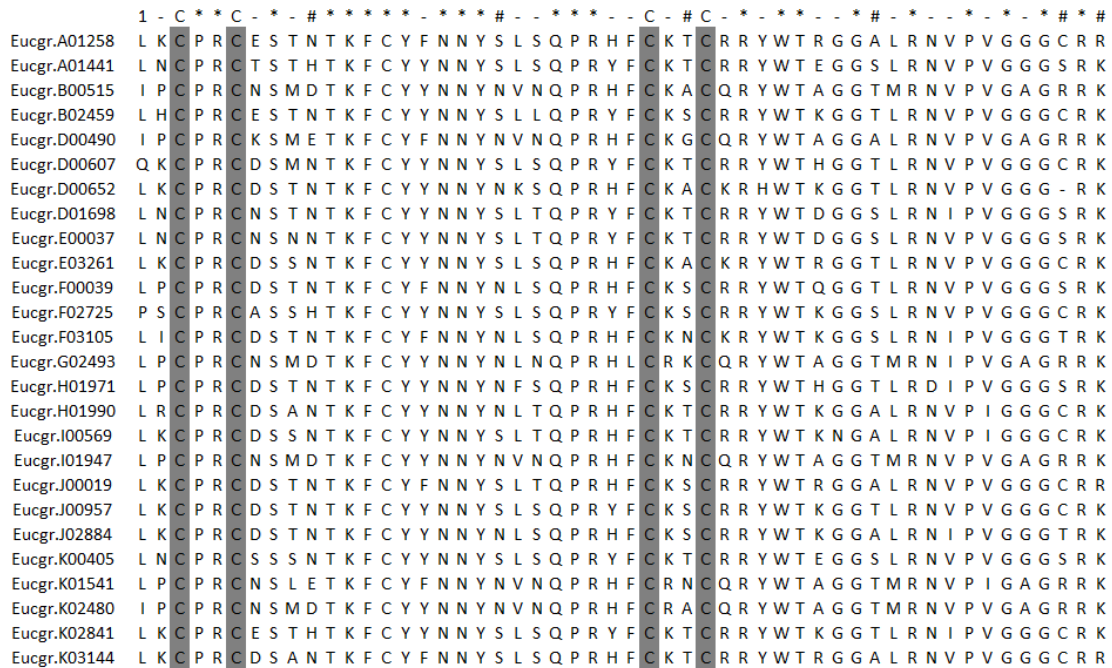


Figure 1

Alignment of 26 *E. grandis* *Dof*-deduced amino acid sequences corresponding to the conserved Dof domain with 52 residues. Residues with 100% conservation are marked with an asterisk. The two pairs of cysteine residues that create the zinc finger-like motif are shaded in gray.

The first phylogenetic tree constructed with protein sequences deduced from the 26 full-length *Dof* encoding sequences allowed the identification of 10 pairs or paralogous genes (identified by roman numerals in Fig. 2A). Paralogs are probably the result of gene duplications and usually display different functions within the organism (LIJAVETZKY *et al.*, 2003). Motifs identified with the MEME Suit and shown in Table 1 are represented graphically in Fig. 2B. The motifs identified were mostly very short, but corroborated with the locations of paralogous gene in the tree. Pair X displayed 12 motifs in common other than the Dof domain; pair V exhibited nine motifs in common; pair VI displayed six; pair III, presented four; pairs I, II, IV and VII presented three; pair IX, presented two; and pair VIII presented only the Dof domain in common. Again, deduced Dof proteins presented little structure similarity outside the Dof domain. However, the data allied with the probability values found when constructing the phylogenetic tree (Fig. 2A) strongly support their position as putative paralogs. Finally, all pairs of paralogous genes identified were located in different chromosomes, as depicted in Fig. 3, suggesting that segmental duplication might have contributed to the expansion of *Dof* genes in *E. grandis* (CAI *et al.*, 2013).

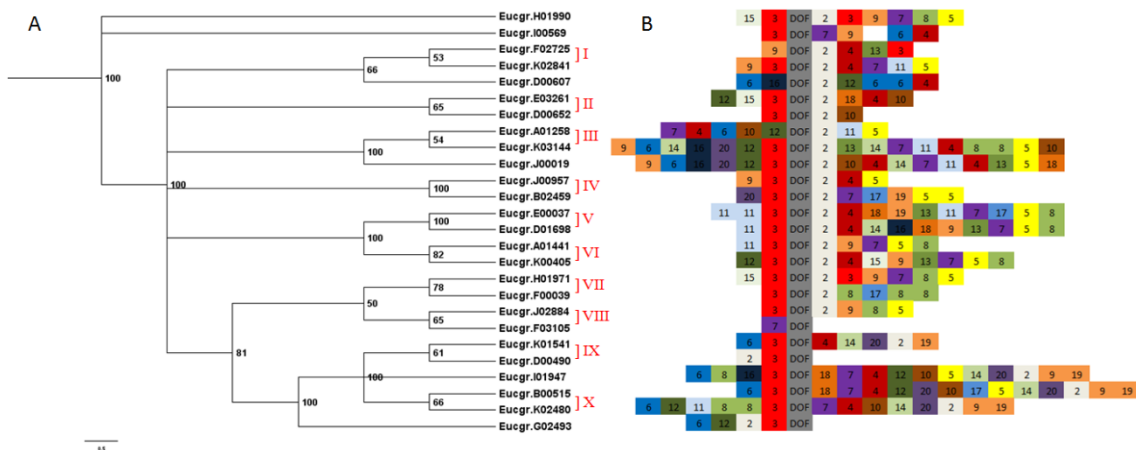


Figure 2

(A) Phylogenetic tree generated with the MrBayes algorithm using the 26 full-length *E. grandis* Dof-deduced amino acid sequences. Tree was automatically rooted by the software. Values of posterior probability are displayed as decimals (0 to 100) on the nodes. Pairs of putative paralogous genes are identified with roman numerals (I to X). (B) Representation of conserved motifs identified with the MEME Suit. Each motif was numbered and received a different color.

Table 1 Conserved motifs identified with MEME Suit within the 26 full-length *E. grandis* Dof-deduced amino acid sequences.

Motif	Multilevel Consensus Sequence
DOF	CPRC[DN]STNTKFCY[YF]NNY[SN]L[ST]QPR[HY]FCK[TS]CRRYWT[KA]GG[TAS]LRN[V I]PVGGG[CRS]RK
2	[NT]KRS[SK]S[SP]SS[SA]SSSSSxSxGx
3	[PK][QK]P[QED][QE][AQ]L[KPN]
4	x[DG]L[NAV]LxFG
5	xxGYW[NS]GL
6	DPANK[LQ][FQ][GQ]
7	RL[LD]FPFGxLxQ
8	[GLF]GGG[GS]W
9	[SVG][FL]SSLP[AV]A
10	[ST]S[AST]Tx[ST]
11	xVKPEE
12	MA[DT]AARLA
13	L[GN]F[GS]LG
14	[LNM]G[NK][HQ]Sx
15	MxSSSS
16	[QE]NPQPP
17	LDGNG[GN]
18	SSxS[LH][YL]
19	xFQESx
20	GLLRPG

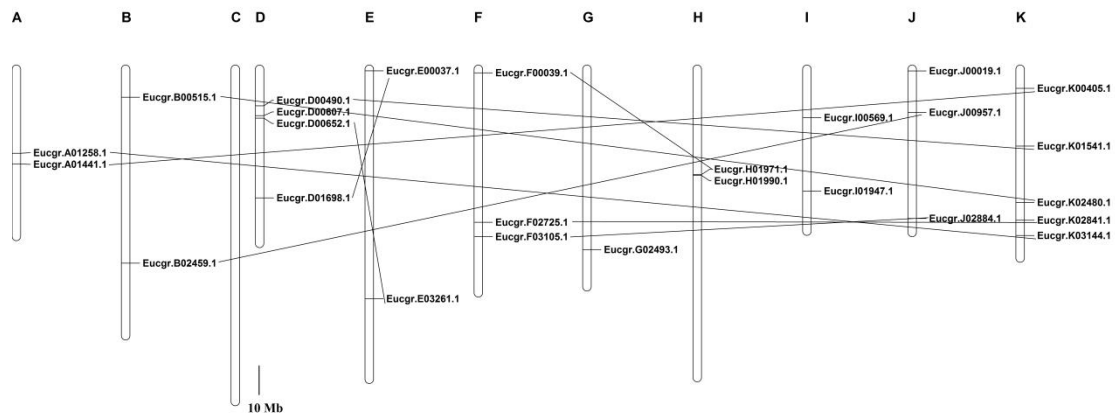


Figure 3

Chromosomal mapping generated with MapChart based on the physical position (Mb) of the genes in the 11 *E. grandis* chromosomes. Each chromosome is identified with a letter (A to K). Putative paralogs are connected by lines. Scale represents a 10 Mb chromosomal distance.

The second phylogenetic tree constructed with the 102 Dof protein sequences from *E. grandis*, *A. thaliana* and *P. trichocarpa* allowed the identification of 13 main clusters of orthologous genes, shown colored and identified with roman numerals in Fig. 4, with the largest cluster (II) contained 15 genes from the three species. Orthologous genes are probably the result of the splitting of taxonomic lines, and usually display the same functions within different organisms (LIJAVETZKY *et al.*, 2003). Taking that into consideration, *Dof* genes from *E. grandis* that were clustered in proximity (no more apart than two nodes) to *Dof* genes from *A. thaliana* were further classified into nine smaller subgroups (identified with roman numerals in Fig. 4). Again, conserved motifs located with the MEME Suit (Fig. 5 and Table 3) corroborated the location of genes in the tree: group II presented 11 motifs in common, other than the Dof domain; group IX exhibited eight motifs; group VII displayed seven motifs; group VI presented six motifs; group V displayed five motifs; group VIII exhibited four motifs; groups I and III presented three motifs; group IV exhibited two motifs. Reinforcing their

classification as putative paralogs, six of the 10 paralogous pairs from the first analysis were located in close proximity in the second tree: pair III (Eucgr.A01258 and Eucgr.K03144) was in cluster IX; pair IV (Eucgr.J00957 and Eucgr.B02459) was in cluster VIII; pair VII (Eucgr.H01971 and Eucgr.F00039) was in cluster X; pair VIII (Eucgr.J02884 and Eucgr.F03105) was also in cluster X. Interestingly, pair VI (Eucgr.A01441 and Eucgr.K00405) was separated, with Eucgr.K00405 not located to any cluster (Fig. 4).

Since *A. thaliana Dof* genes are currently the most well-described, information about them was obtained from TAIR and inferred to their putative orthologs in *E. grandis* (Table 2) as a first step to suggest their putative functions. Such an approach allowed us to identify five *A. thaliana Dof* genes that might present orthologs in the *E. grandis* genome. Eucgr.D00490 was located close to At1g29160, or COG1, a light-inducible transcription factor that negatively regulates phytochrome signaling (PARK *et al.*, 2003). Eucgr.B00515 was located close to At3G47500 and At5G62430, or CDF3 and CDF1, two transcription factors that participate in photoperiodic flowering (LI *et al.*, 2009; NOGUERO *et al.*, 2013). Further studies with relative expression profiles from reproductive organs are needed to elucidate the relationships. Eucgr.I00569 was located close to At5G65590, or SCAP1, a transcription factor that regulates key elements of stomatal morphogenesis and function (NEGI *et al.*, 2013). Corroborating with a stomatal expression, Eucgr.I00569 expression profile in untreated plants displayed significant higher values in leaf and stalk, as shown later (Fig. 6). Finally, Eucgr.K02841 was located close to At5G62940, or HCA2, a transcription factor that regulates vascular tissue development (GUO *et al.*, 2009). Interestingly, as presented in the next session, in *E. grandis* plants treated with NAA, levels of Eucgr.K02841 steady-state mRNA displayed a significant increase in roots (Fig. 6), which could be related to a vascular development response induced by auxins. All groups were further supported by high posterior probability values, presented on tree nodes (Fig. 4), and shared motifs located by MEME Suit (Fig. 5).

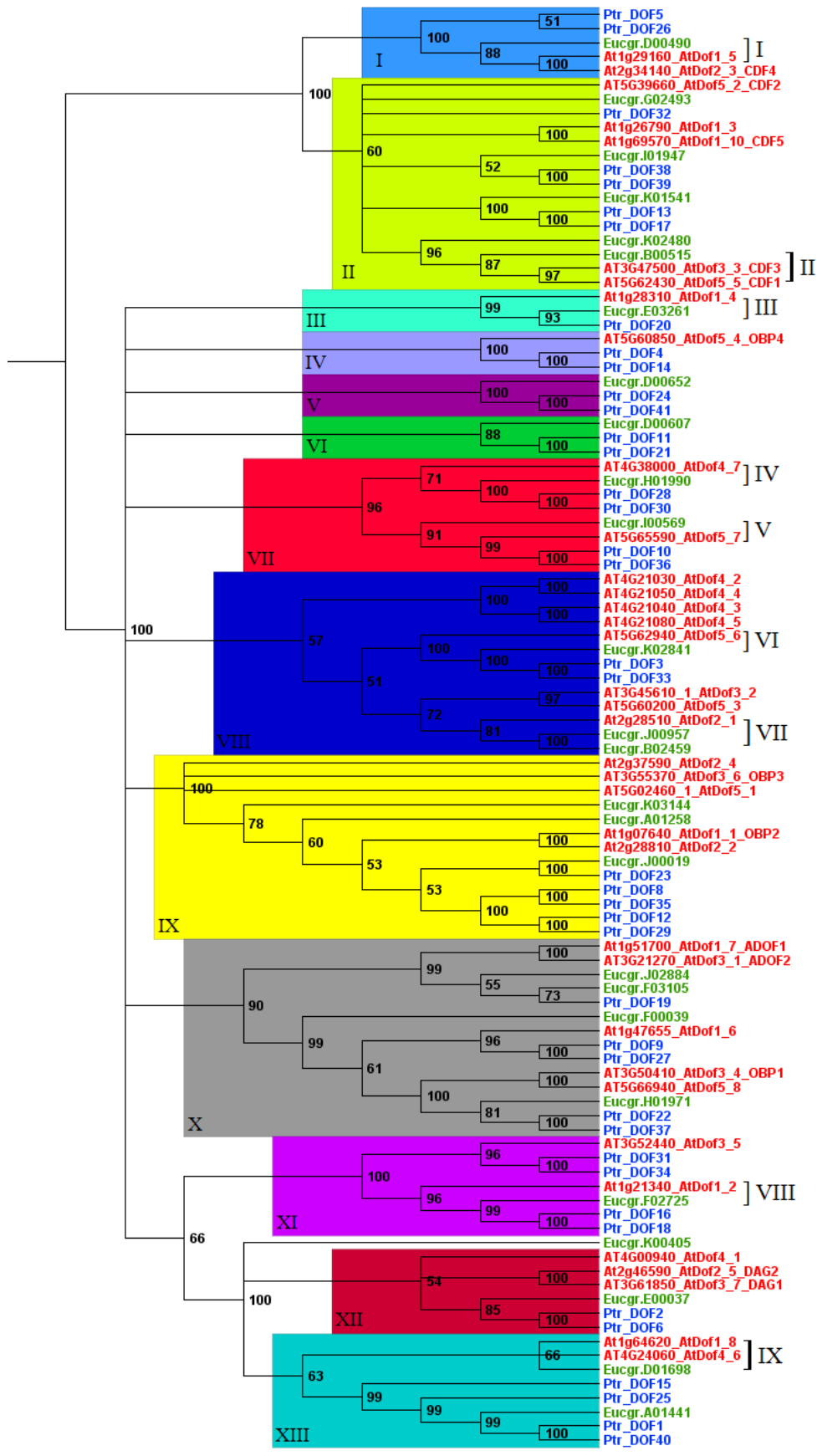


Figure 4

Phylogenetic tree generated with MrBayes using the 102 full-length *E. grandis*, *A. thaliana* and *P. trichocarpa* *Dof*-deduced amino acid sequences. The tree was automatically rooted by the software. Values of posterior probability are displayed as decimals (0 to 100) on the nodes. Major clusters of orthologous genes are identified with different colors and roman numerals (I to XIII). Smaller groups of orthologous genes between *E. grandis* and *A. thaliana* are identified with roman numerals (I to IX) at the right side of gene names. Scale represents the number of amino acid substitutions per site, and was generated automatically by the software.

Table 2 Comparison of *Dof* Putative Orthologous Genes between *E. grandis* and *A. thaliana*

<i>Eucalyptus grandis</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>		
Group	Orthologs	Orthologs	Expression	Protein
I	Eucgr.D00490	At1g29160	Several Tissues	COG1
		At2g34140	Hypocotyl, Root, Flower, Stamen	-
II	Eucgr.B00515	At3G47500	Several Tissues	CDF3
		At5G62430	Several Tissues	CDF1
III	Eucgr.E03261	At1g28310	Stomata Guard Cell	-
IV	Eucgr.H01990	At4G38000	Several Tissues	
V	Eucgr.I00569	At5G65590	Stomata Guard Cell	SCAP1
VI	Eucgr.K02841	At5G62940	Several Tissues	HCA2
VII	Eucgr.J00957	At2g28510	Several Tissues	-
	Eucgr.B02459			
VIII	Eucgr.F02725	At1g21340	-	-
IX	Eucgr.D01698	At1g64620	Several Tissues	-
		At4G24060	Several Tissues	-

All information regarding *A. thaliana* genes and proteins was obtained from TAIR. When expression information contained more than 10 different tissues, it was regarded as several tissues.

I	Ptr_DOF5					5	DOF	7													
	Ptr_DOF26					5	DOF														
	Eucgr.D00490		5	9	11	13	DOF	6													
	At1g29160_AtDof1_5					5	13	DOF	19												
	At2g34140_AtDof2_3_CDF4				5	3	13	DOF	6												
II	AT5G39660_AtDof5_2_CDF2				5	17	13	DOF	16	18	6	7	3	8	10						
	Eucgr.G02493				5	7	13	DOF	19												
	Ptr_DOF32		5	12	16	13	DOF	9	19	4	18	6	7	3	8	14	10				
	At1g26790_AtDof1_3				5	11	13	DOF	7	18	9	10									
	At1g69570_AtDof1_10_CDF5		5	3	11	13	DOF	4	18	6	7	11	13	10							
	Eucgr.I01947		5	12	17	13	DOF	19	4	9	18	6	7	3	8	10					
	Ptr_DOF38			5	11	13	DOF	19	4	16	9	18	6	7	3	8	10	12			
	Ptr_DOF39		5	11	3	13	DOF	19	4	16	9	18	6	7	3	8	10	12			
	Eucgr.K01541				5	13	DOF	4	9	15	7	3	8	10							
	Ptr_DOF13			5	12	13	DOF	16	4	10	18	6	11	7	3	8	10				
	Ptr_DOF17				5	13	DOF	16	4	18	6	11	7	3	8	10					
	Eucgr.K02480			5	14	13	DOF	4	9	18	6	7	3	8	10						
	Eucgr.B00515		5	16	3	13	DOF	19	4	16	20	18	6	7	8	14	10	12	12		
	AT3G47500_AtDof3_3_CDF3				5	13	DOF	19	4	12	18	9	6	15	7	3	8	14	10		
	AT5G62430_AtDof5_5_CDF1				5	13	DOF	4	18	6	7	3	8	10							
III	At1g28310_AtDof1_4					5	DOF	3	11	9	14	6									
	Eucgr.E03261					5	DOF	3	11	4	15	17									
	Ptr_DOF20				7	5	DOF	3	14	4	11	8	6								
IV	AT5G60850_AtDof5_4_OBP4					18	DOF	3	10	9	5	6	17								
	Ptr_DOF4					17	DOF	3	9	5	8	6									
	Ptr_DOF14					17	DOF	3	11	9	5	6									
V	Eucgr.D00652					5	DOF	3	11												
	Ptr_DOF24					7	DOF	3	5	4	9	16	11	15	6	8					
	Ptr_DOF41				10	7	DOF	3	5	16	11	15	6	8							
VI	Eucgr.D00607					13	DOF	3	14	5	6	4	9								
	Ptr_DOF11						DOF	3	5	9	17	5	11								
	Ptr_DOF21					5	DOF	3	10	15	6	11	20								
VII	AT4G38000_AtDof4_7						DOF	15	5	20											
	Eucgr.H01990		16	7	18	11	DOF	3	4	5	17	10	6	20							
	Ptr_DOF28				19	11	DOF	3	4	10	15	6									
	Ptr_DOF30				19	11	DOF	3	4	8	10	15	11	6							
	Eucgr.I00569					13	DOF	3	12	11	19	15	5	4	8						
	AT5G65590_AtDof5_7						DOF	3	8	14	15	5	4	7							
	Ptr_DOF10					7	DOF	3	14	9	11	20	15	5	4	8	6				
Ptr_DOF36					7	DOF	3	19	14	9	11	16	15	5	4	8	6				
VIII	AT4G21030_AtDof4_2						DOF	5	3	12	6										
	AT4G21050_AtDof4_4					13	DOF	3	10	12	6										
	AT4G21040_AtDof4_3					13	DOF	3	6												
	AT4G21080_AtDof4_5					13	DOF	3	5												
	AT5G62940_AtDof5_6					9	5	DOF	3	12	10	17	6								
	Eucgr.K02841		9	5	15	7	DOF	3	4	12	17	6									
	Ptr_DOF3			9	5	7	DOF	3	4	12	10	8	20	6	11						
	Ptr_DOF33			5	16	7	DOF	3	4	12	10	17	8	20	6	11					
	AT3G45610_1_AtDof3_2					7	DOF	3	4	5											
	AT5G60200_AtDof5_3					20	7	DOF	3	4	5										
	At2g28510_AtDof2_1					7	DOF	3	4	5	6										
	Eucgr.J00957					17	7	DOF	3	4	6	5									
	Eucgr.B02459					7	DOF	3	6												

IX	At2g37590_AtDof2_4			9	7	5	6	DOF	3	11	20									
	AT3G55370_AtDof3_6_OBP3				9	5	7	DOF	3	11	6									
	AT5G02460_1_AtDof5_1				9	5	7	DOF	13	17	3	4	11	15						
	Eucgr.K03144			9	5	17	18	7	DOF	3	16	10	4	6	15					
	Eucgr.A01258	4	13	9	5	17	7	DOF	3	19										
	At1g07640_AtDof1_1_OBP2					5	4	DOF	3	4	17									
	At2g28810_AtDof2_2					5	11	7	DOF	3	4	6								
	Eucgr.J00019				9	5	13	7	DOF	3	11	4	12							
	Ptr_DOF23	9	5	11	13	18	7	DOF	3	12	17	8	4							
	Ptr_DOF8					9	5	7	DOF	3	15	14	12	8	4	6				
	Ptr_DOF35					9	5	7	DOF	3	15	14	12	8	4	6	15			
	Ptr_DOF12					9	5	7	DOF	3	13	12	10	8	4	6	15			
	Ptr_DOF29					9	18	7	DOF	3	13	16	14	12	5	17	8	6	15	
	X	At1g51700_AtDof1_7_ADOF1						6	DOF	3	7	9	4							
AT3G21270_AtDof3_1_ADOF2							5	DOF	3	9	4									
Eucgr.J02884							5	DOF	3	7	9	14	17	6						
Eucgr.F03105								DOF	5											
Ptr_DOF19							5	DOF	3	9	14									
Eucgr.F00039								DOF	3	9	12	6	8							
At1g47655_AtDof1_6									DOF	3	11	14	8							
Ptr_DOF9									DOF	3	14	6	16	4						
Ptr_DOF27									DOF	3	10	9	14	6	4					
AT3G50410_AtDof3_4_OBP1									DOF	3	5	8								
AT5G66940_AtDof5_8									DOF	3	10	9	4	11	5					
Eucgr.H01971									DOF	3	8	14	6							
Ptr_DOF22							7		DOF	3	20	10	14	6	8					
Ptr_DOF37									DOF	3	10	14	6							
XI	AT3G52440_AtDof3_5							DOF	3	4	17	6								
	Ptr_DOF31							DOF	3	4	10	5	4							
	Ptr_DOF34							DOF	3	15	4	10	5	8	4					
	At1g21340_AtDof1_2					5	13	DOF	3	4	11	16								
	Eucgr.F02725						7	DOF	3	16	4	12	5							
	Ptr_DOF16							DOF	3	4	17	7	10	5						
	Ptr_DOF18						18	DOF	3	4	7	10	5							
	Eucgr.K00405								DOF	3	13	10	4	16	8	14	6			
XII	AT4G00940_AtDof4_1						17	11	DOF	3	4	7	9	6						
	At2g46590_AtDof2_5_DAG2			5	12	11	7	DOF	3	4	10	19	9	10	17	6				
	AT3G61850_AtDof3_7_DAG1				5	12	7	DOF	3	10	19	16	9	8	6					
	Eucgr.E00037					5	12	7	DOF	3	4	19	17	8	6					
	Ptr_DOF2						7	DOF	3	13	9	4	19	16	5	8	6			
	Ptr_DOF6						7	DOF	3	9	4	15	19	16	5	14	8	6		
XIII	At1g64620_AtDof1_8						5	7	DOF	3	4	14	15	20	6					
	AT4G24060_AtDof4_6						5	12	7	DOF	3	10	4	17	14	11	6			
	Eucgr.D01698			5	12	11	7	DOF	3	13	4	17	9	8	6					
	Ptr_DOF15				5	12	7	DOF	3	4	14	8	6							
	Ptr_DOF25					5	12	7	DOF	3	17	4	10	8	6					
	Eucgr.A01441						7	DOF	3	9	5	6								
	Ptr_DOF1						12	7	DOF	3	4	16	9	5	8	6				
	Ptr_DOF40						12	7	DOF	3	13	4	10	9	5	8	6			

Figure 5

Conserved motifs located with the MEME Suit within the 102 full-length amino acid sequences deduced from *Dof* genes from *E. grandis*, *A. thaliana* and *P. trichocarpa*. Major clusters of orthologous genes are identified by roman numerals. Smaller subgroups are shaded in gray.

Table 3 Conserved motifs identified with the MEME Suit within the 102 full-length amino acid sequences deduced from *Dof* genes from *E. grandis*, *A. thaliana* and *P. trichocarpa*.

Motif	Multilevel Sequence Consensus
DOF	AL[KP]CPRC[DN]STNTKFCY[YF]NNY[SN]L[STN]QPR[HY]FCK[TS]CRRYWT[KA] GG[TAS]LRN[VI]PVGGG[CRS]R
3	K[NT]K[RK]S[SK]S[SP]SS[SA]SSSS
4	N[DG]L[NVA]LxFG
5	DP[AQ][KW]L[QF][QEG]
6	GYW[GN]GMxGGGS
7	[SR]PTLE[KR]R[PS][RQ]P[EQ]
8	L[WF]P[LT]LG[IL]K
9	GFSSLPGY
10	LQAN[PH][HA]AL
11	ST[SA][TS][TA]T
12	[VL][DG]FGE[GE]
13	LK[KL]P[DP][PLK]
14	[GF]GG[LF][GQ][ES]
15	[ST]SST[SE]S
16	[GA][AE]SG[LME]N
17	[DV][HQ]D[QE]NG
18	[PV]PSPxP
19	E[LAI]LGS[GS]
20	[NG]TN[GS][NS]L

Motifs 1 and 2 are combined in the DOF motif.

E. grandis *Dof* Relative Gene Expression

Taking into consideration that expression profiles may provide valuable information about gene and protein functions in addition to the comparison of

orthologous genes, we have performed RT-qPCR assays using total RNA extracted from leaf, stalk and root obtained from *E. grandis* individuals using 26 pairs of primers, each specific to one *E. grandis* Dof gene. Relative expression profiles representing steady-state mRNA levels were obtained for 20 out of the 26 Dof genes from *E. grandis* and are presented in Figs. 6 and 7.

As expected, profiles displayed a wide variety of patterns both spatially (in different organs; Fig. 6) and in response to hormonal or stress treatments (Fig. 7; Figs. S1 to S5). This is consistent with previously reported works (CAI *et al.*, 2013; MORENO-RISUENO *et al.*, 2007) and with the multiple functional characteristics of known Dof proteins, which are expressed and involved in a wide variety of organs and plant phenomena (reviewed in NOGUERO *et al.*, 2013; and YANAGISAWA, 2004).

In the spatial analysis, all *E. grandis* Dof genes were expressed in all three organs, with little difference observed between their calculated relative expression values (Figure 6). We found that genes Eucgr.A01441, Eucgr.D00652 and Eucgr.K00405 were significantly more expressed in stalk samples; genes Eucgr.D00490, Eucgr.D00607, Eucgr.D01698, Eucgr.E00037 and Eucgr.K01541 were significantly less expressed in leaf samples; genes Eucgr.E03261, Eucgr.G02493, Eucgr.I00569, Eucgr.J02884 and Eucgr.K02841 were significantly less expressed in root samples. As in previously described works (NOGUERO *et al.*, 2013), no relationship could be established between Dof sequence similarity and their site of expression when comparing this results with the phylogenetic tree (Fig.4).

For the samples treated with ABA, NAA, KIN, NaCl and drought, most genes were up-regulated in all three organs, with few exceptions observed in each case (Fig. 7 and Figs S1 to S5): gene Eucgr.D00652, which was significantly less expressed in leaf samples in the spatial analysis, displayed no variation in leaf samples for any treatment, indicating that the gene may be related to stalk and root specific events. Also, gene Eucgr.I00569, which was significantly less expressed in roots in the spatial analysis, displayed no variation in root samples from plants treated with ABA, NAA, KIN and NaCl, indicating that the gene may be

related to leaf and stalk specific events. Unfortunately, we were not able to obtain results for Eucgr.I00569 in the drought treatment. These results corroborate with previously reports that Dof transcription factors are implicated in phytohormone action, being up-regulated by auxin (PAOLIS *et al.*, 1996; BAUMANN *et al.*, 1999), salicylic acid and jasmonic acid (KANG *et al.*, 2003). Dof factors are also involved in lignin production (ROGERS *et al.*; 2005), which is affected by auxin and gibberellin (ALONI *et al.*, 1990), however, further analysis are needed to infer whether the *E. grandis* Dof genes that were up-regulated by auxin are related to this phenomena.

Taken together, these results may be useful for future isolation and purification assays involving Dof proteins, as well as inferring functions for each member of the family, since relative expression profiles provide clues for characterizing unknown proteins (CAI *et al.*, 2013).

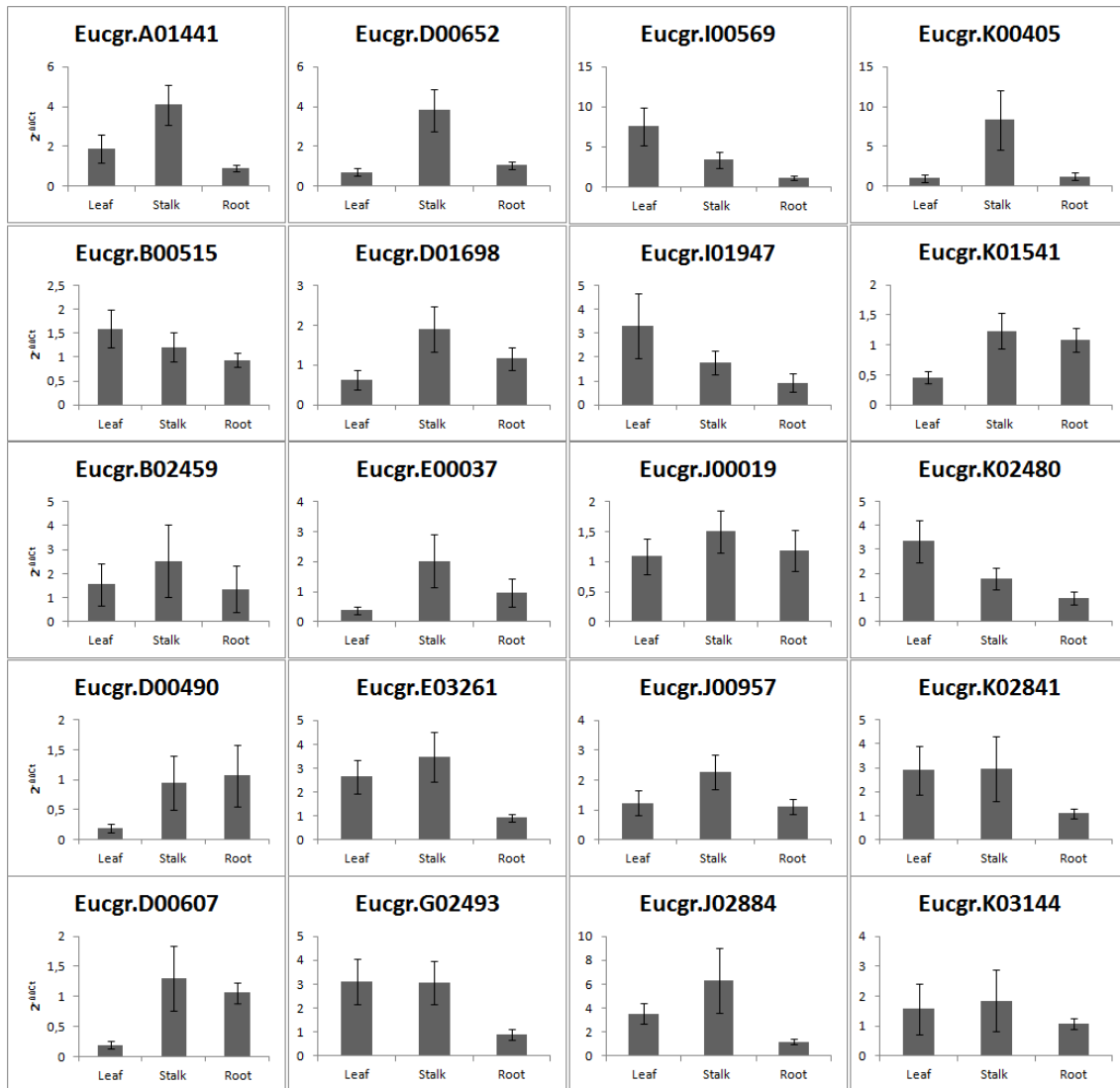
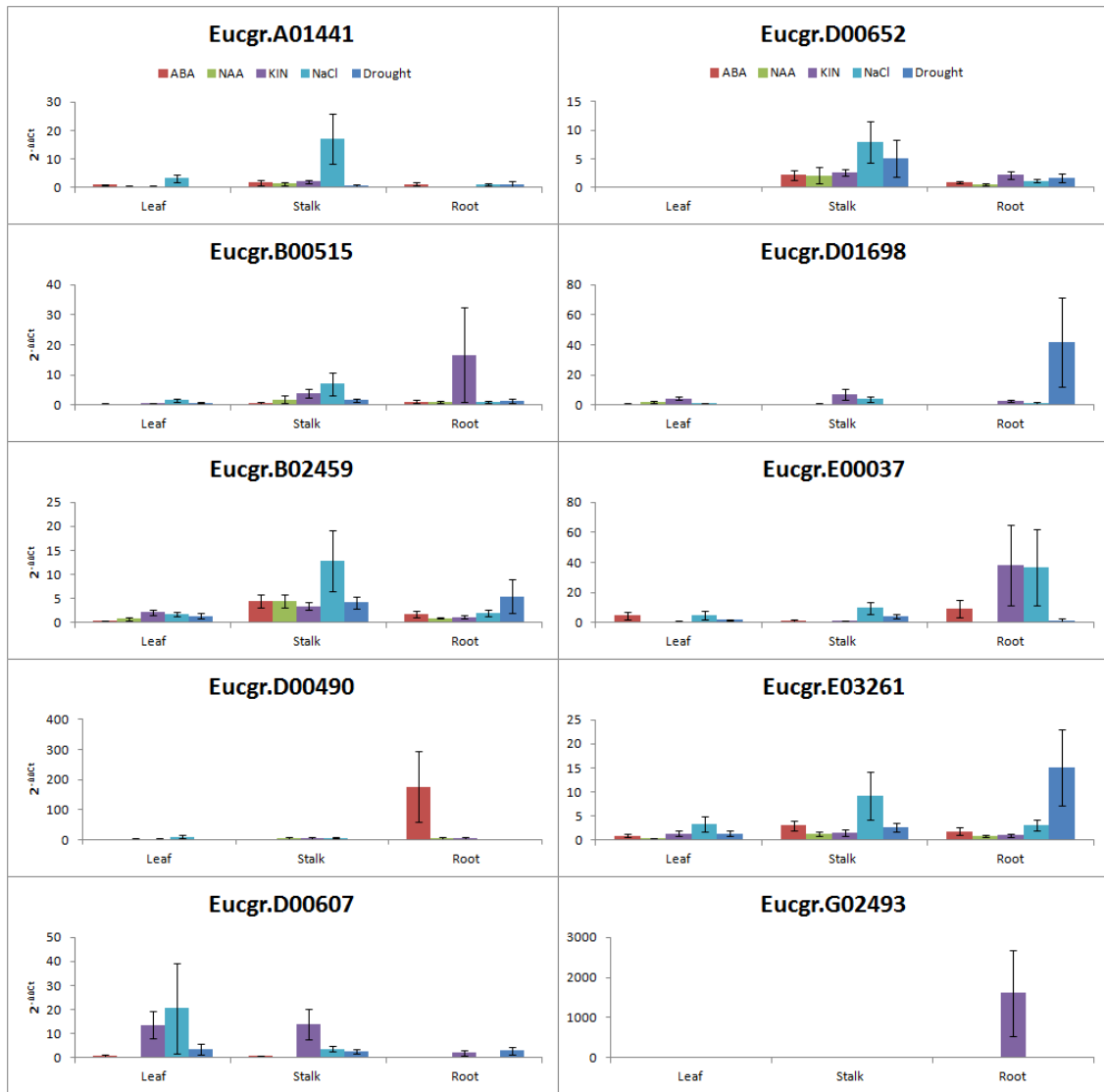


Figure 6

Spatial relative expression profiles of *Dof* genes assessed by RT-qPCR in untreated, 90-days-old *E. grandis* plants. Relative transcript levels in roots were set to 1. The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents the different organs tested. Error bars represent standard errors for biological triplicates and technical quadruplicates.



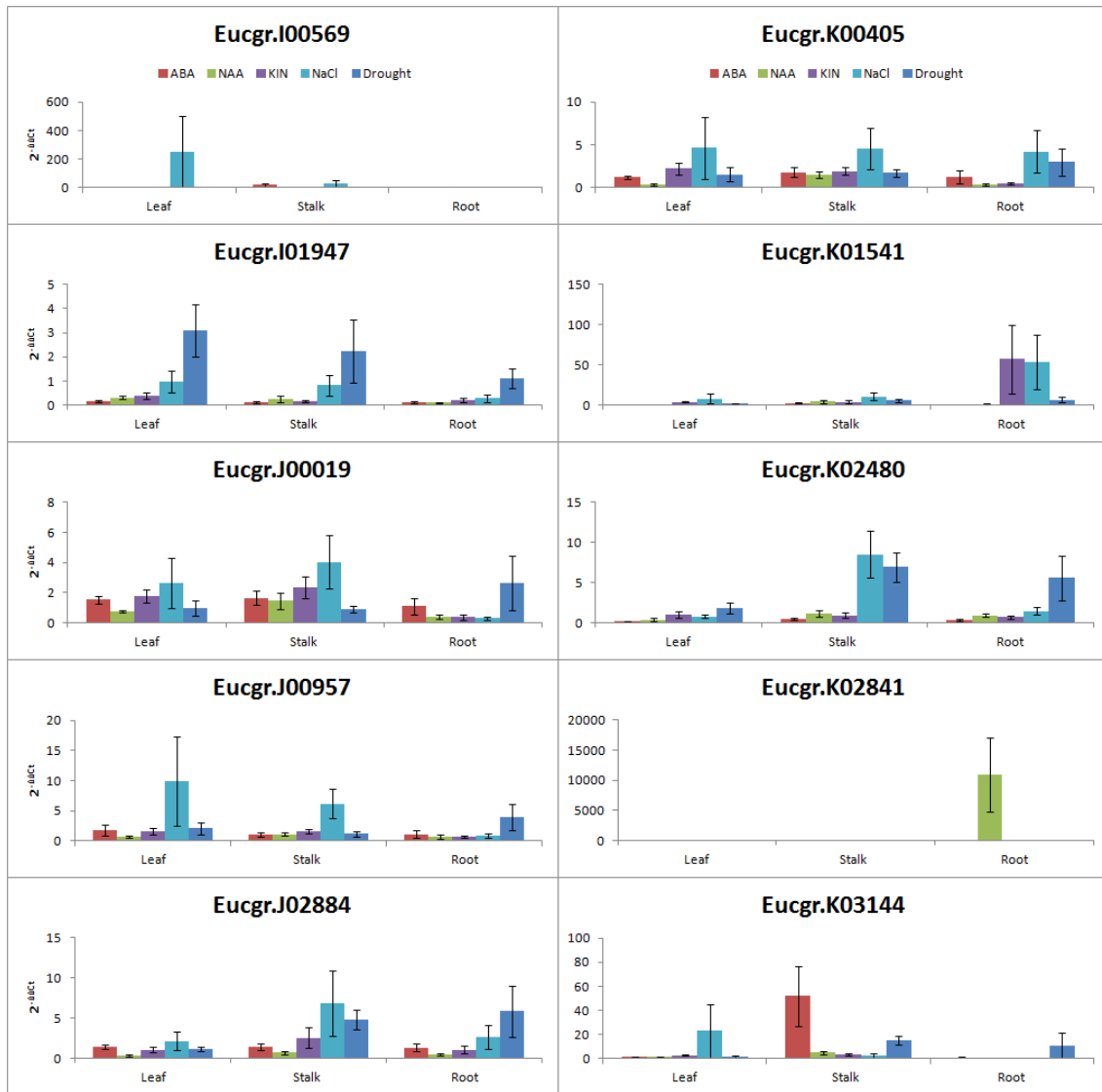


Figure 7

Relative expression profiles of *Dof* genes assessed by RT-qPCR in treated, 90-days-old *E. grandis* plants. Relative transcript levels in roots were set to 1. The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents the different organs tested after treatments. Treatments are represented by different colors as shown on top. Error bars represent standard errors for the biological triplicates and technical quadruplicates.

Conclusion

This work presents the first steps towards a genome-wide analysis of the Dof genes in *E. grandis*. The groups of orthologous genes identified between *A. thaliana* and *E. grandis* can be confirmed and further analyzed by proteomic studies and expression profiles obtained from different organs and tissues. The relative expression profiles presented may be useful for future isolation and purification assays involving the Dof proteins, as well as inferring functions for each member of the family.

Reference List

- Aloni R, Tollier MT, Monties B. 1990. The Role of Auxin and Gibberellin in Controlling Lignin Formation in Primary Phloem Fibers and in Xylem of *Coleus blumei* Stems 94: 1743-1747.
- Bailey TL, Boden M, Buske F a, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* 37: 202–208.
- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G. 1999. The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *The Plant cell* 11: 323–334.
- Bokszczanin K, Przybla A. 2006. New Simple and Efficient Method of DNA Isolation from Pear Leaves Rich in Polyphenolic Compounds. *International Journal of Horticultural Science* 12: 21–24.
- Cai X, Zhang Y, Zhang C, Zhang T, Hu T, Ye J, Zhang J, Wang T, Li H, Ye Z. 2013. Genome-wide Analysis of Plant-specific Dof Transcription Factor Family in Tomato. *Journal of Integrative Plant Biology* 55: 552–566.
- Corney HJ, Sasse JM, Ades PK. 2003. Assessment of salt tolerance in eucalypts using chlorophyll fluorescence attributes. *New Forests* 26: 233–246.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Fornara F, Panigrahi KCS, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo J a, Coupland G. 2009. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* 17: 75–86.
- Gaudino RJ, Pikaard CS. 1997. Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 6799–6804.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, et al. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40: 1178–1186.

- Guo Y, Qin G, Gu H, Qu L-J. 2009. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21: 3518–3534.
- Kang H-G, Foley RC, Oñate-Sánchez L, Lin C, Singh KB. 2003. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *The Plant Journal* 35(3): 362-372.
- Konishi M, Yanagisawa S. 2007. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 623–629.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, et al. 2011. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): Improved Gene Annotation and New Tools. *Nucleic Acids Research* 40: 1–9.
- Li D, Yang C, Li X, Gan Q, Zhao X, Zhu L. 2009. Functional characterization of rice OsDof12. *Planta* 229: 1159–1169.
- Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J. 2003. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology* 3: 17.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Moreno-Risueno MA, Martínez M, Vicente-Carbajosa J, Carbonero P. 2007. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 379–390.
- Negi J, Moriwaki K, Konishi M, Yokoyama R, Nakano T, Kusumi K, Hashimoto-Sugimoto M, Schroeder JI, Nishitani K, Yanagisawa S, et al. 2013. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Current Biology* 23: 479–484.
- Noguero M, Atif RM, Ochatt S, Thompson RD. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* 209: 32–45.
- De Oliveira LA, Breton MC, Bastolla FM, Camargo SDS, Margis R, Frazzon J, Pasquali G. 2012. Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. *Plant & Cell Physiology* 53: 405–422.
- DE PAOLIS, A.; SABATINI, S.; DE PASCALIS, L.; CONSTANTINO, P.; CAPONE, I. A rolB regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *The Plant Journal*, 10(2): 215-223, 1996.

Papi M, Sabatini S, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P. 2000. Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. *Genes & Development* 14: 28–33.

Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG. 2003. The Arabidopsis COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *The Plant Journal* 34: 161–171.

Pérez-Rodríguez P, Riaño-Pachón DM, Corrêa LGG, Rensing S a, Kersten B, Mueller-Roeber B. 2009. PInTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research* 38: 822–827.

ROGERS, L.A.; DUBOS, C.; SURMAN, C.; WILLMENT, J.; CULLIS, I.F.; MANSFIELD, S.D.; CAMPBELL, M.M. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *The New Phytologist*, 168: 123-140, 2005.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M a, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

Son O, Cho H-Y, Kim M-R, Lee H, Lee M-S, Song E, Park JH, Nam KH, Chun J-Y, Kim H-J, et al. 2005. Induction of a homeodomain-leucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in Arabidopsis roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 203–9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–9.

Umemura Y, Ishiduka T, Yamamoto R, Esaka M. 2004. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as Cys2/Cys2 Zn finger domain. *The Plant Journal* 37: 741–749.

Vicente-Carbajosa J. 1997. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proceedings of the ...* 94: 7685–7690.

Voorrips RE. 2002. Computer Note MapChart : Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93: 77–78.

Yanagisawa S. 2004. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant & Cell Physiology* 45: 386–391.

Yanagisawa S, Schmidt RJ. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal* 17: 209–214.

Yanagisawa S, Sheen J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *The Plant cell* 10: 75–89.

Yang LIU, Yan-feng D, Qiang-sheng W, Gang-hua LI, Jun-xu XU, Zheng-hui LIU, Shao-hua W. 2011. Effect of Plant Growth Regulators on Growth of Rice Tiller Bud and Changes of Endogenous Hormones. *Acta Agronomica Sinica* 37: 670–676.

Zou J, Liu A, Chen X, Zhou X, Gao G, Wang W, Zhang X. 2009. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Journal of Plant Physiology* 166: 851–861.

Supplemental Material

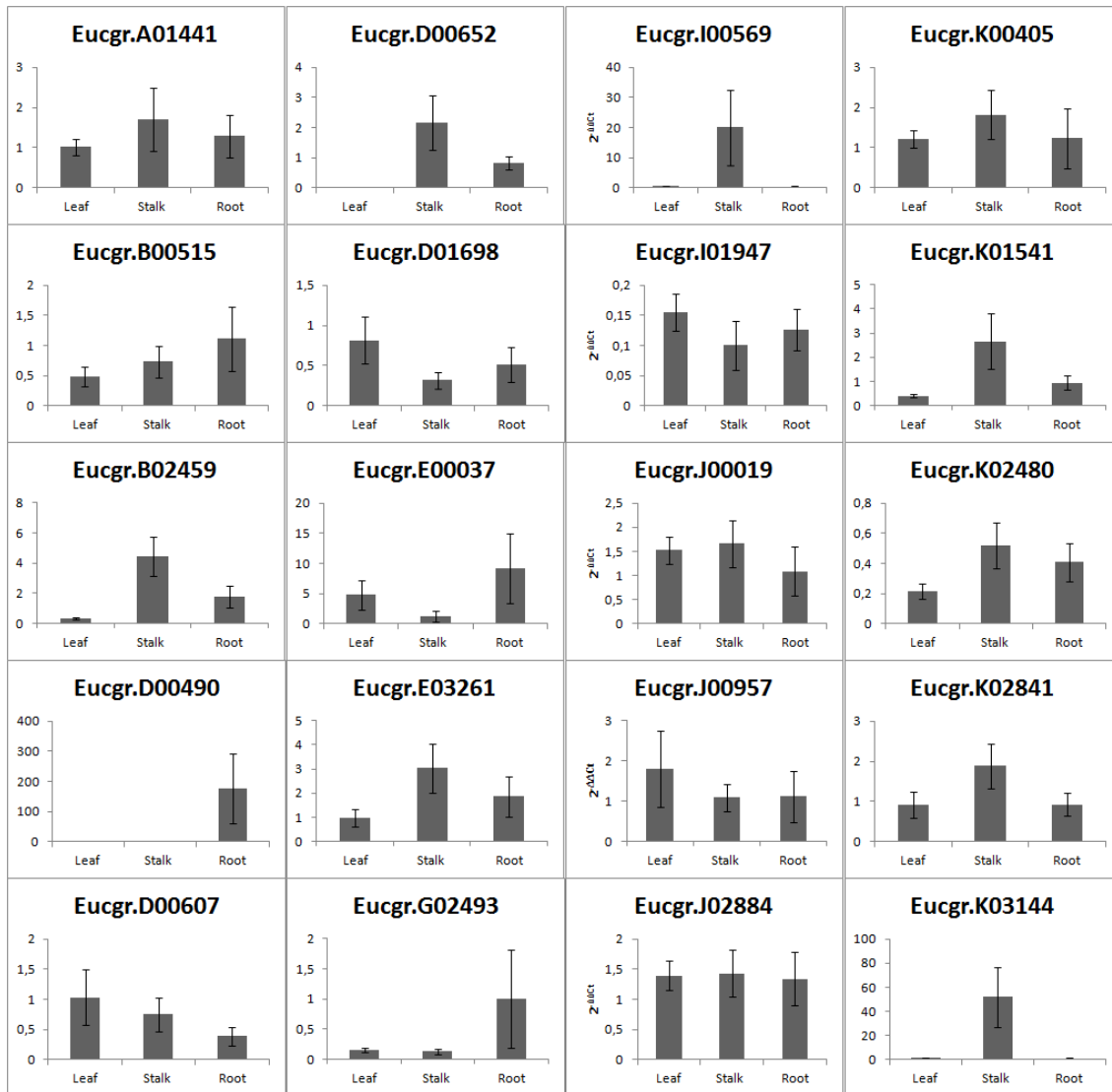


Figure S1

Relative expression profiles for ninety-days-old *E. grandis* plants treated with ABA 100 μ M. The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents different organs. Error bars represent standard errors for the biological triplicates.

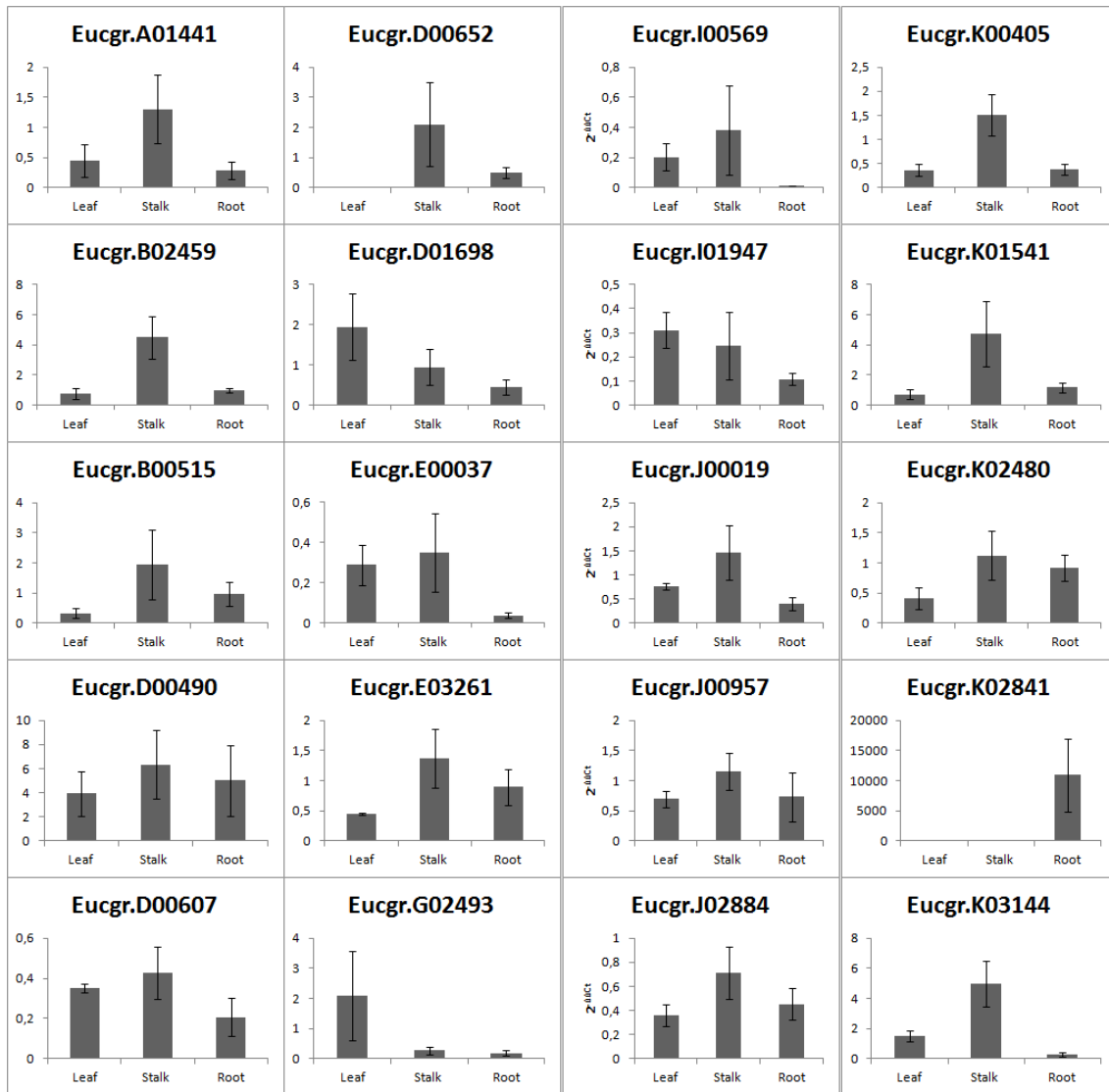


Figure S2

Relative expression profiles for ninety-days-old *E. grandis* plants treated with NAA 50 μM . The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents different organs. Error bars represent standard errors for the biological triplicates.

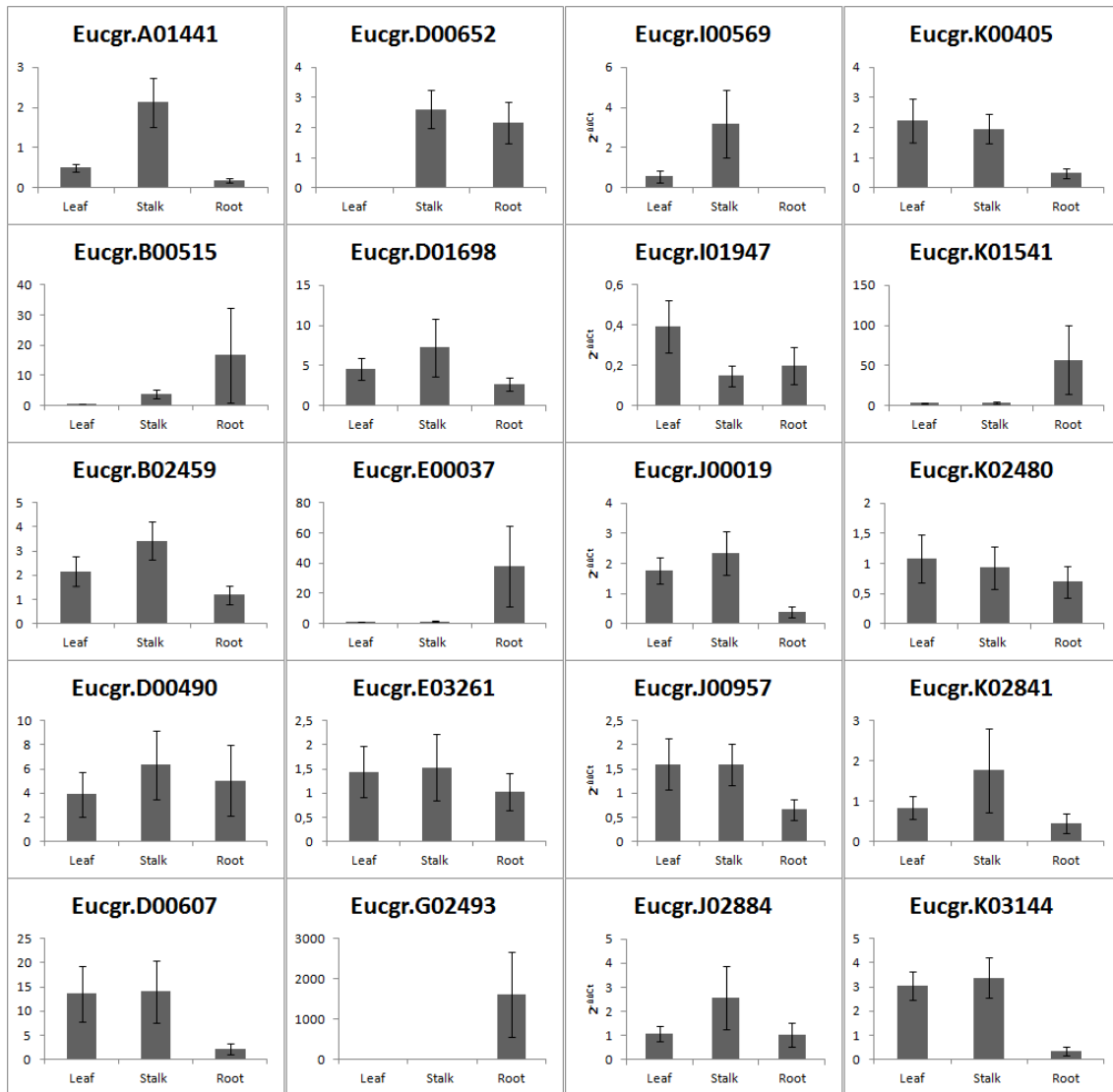


Figure S3

Relative expression profiles for ninety-days-old *E. grandis* plants treated with KIN 10 μM . The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ values. The x-axis represents different organs. Error bars represent standard errors for the biological triplicates.

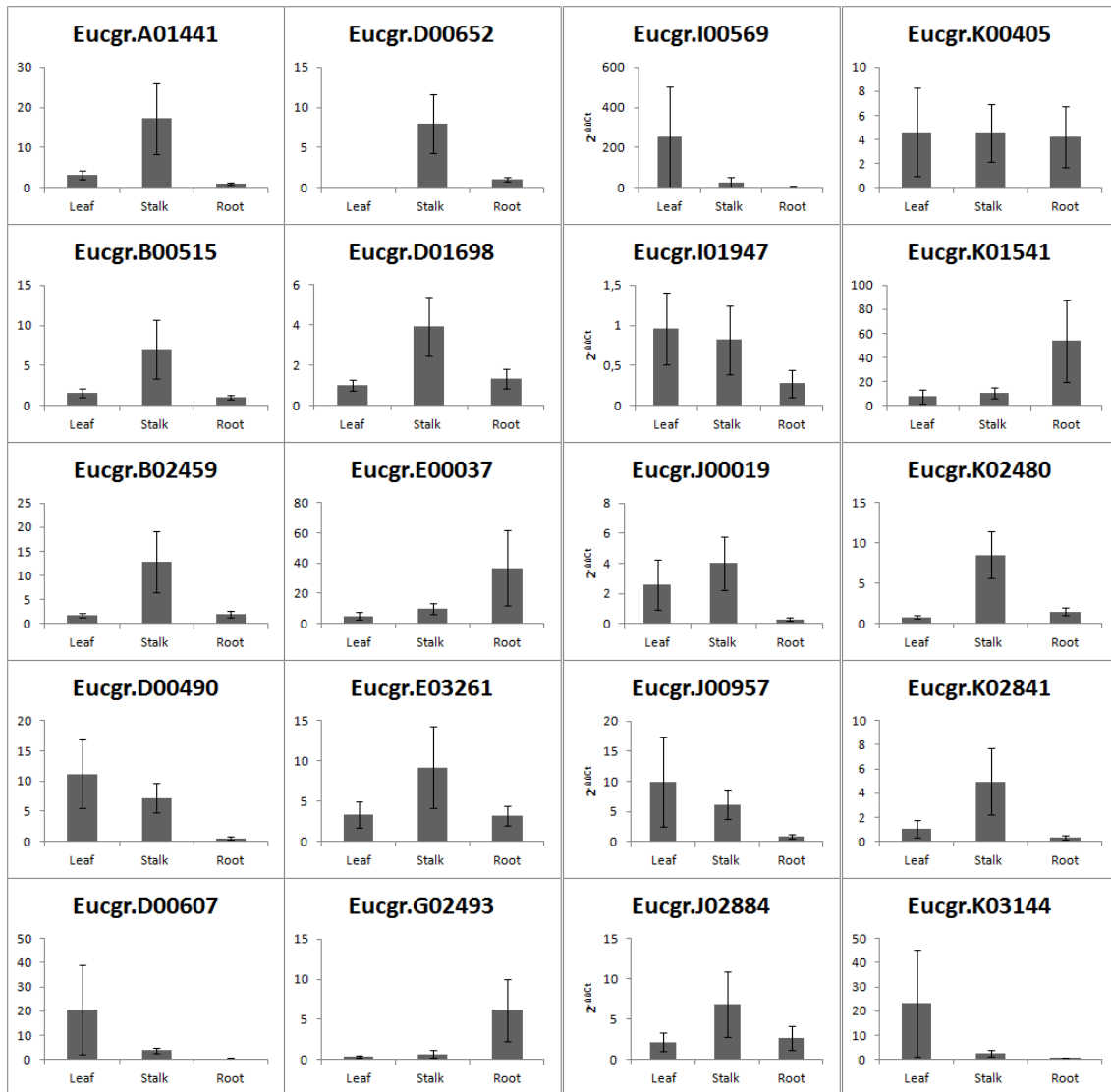


Figure S4

Relative expression profiles for ninety-days-old *E. grandis* plants treated with NaCl 200 mM. The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents different organs. Error bars represent standard errors for the biological triplicates.

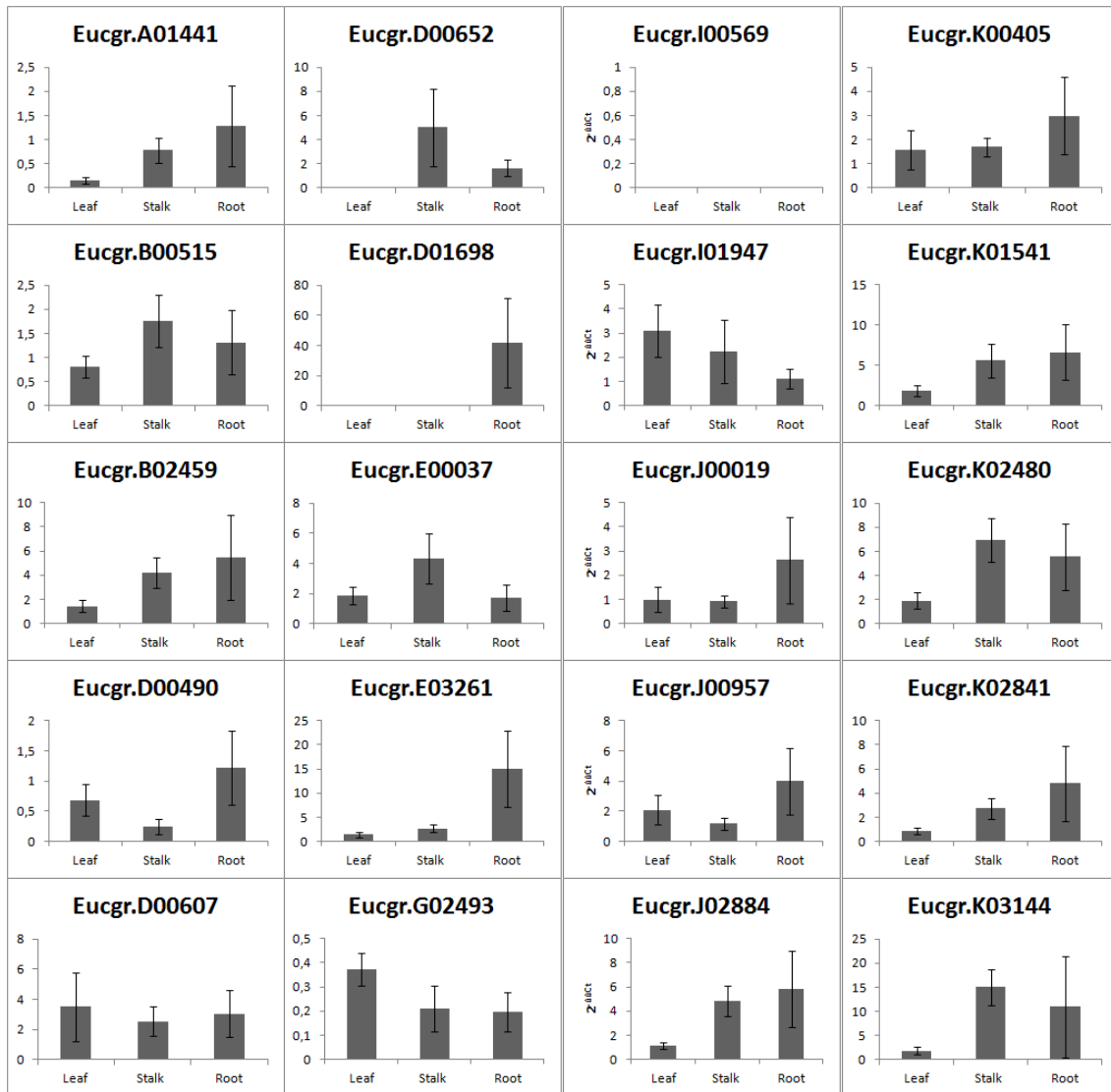


Figure S5

Relative expression profiles for ninety-days-old *E. grandis* plants treated with drought for six days. The y-axis represents the relative expression levels in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. The x-axis represents different organs. Error bars represent standard errors for the biological triplicates.

Discussão

Análises Filogenéticas

Com o objetivo de caracterizar e inferir possíveis funções aos genes *Dof* de *E. grandis*, as 26 sequências proteicas *Dof* obtidas do Phytozome foram filogeneticamente comparadas às sequências das proteínas *Dof* de *P. trichocarpa* (uma arbórea, mais próxima ao *E. grandis* do que as outras espécies com genes *Dof* descritos) e *A. thaliana* (a espécie com a família *Dof* melhor descrita até o momento), por meio de alinhamento de sequências completas e construção de árvores filogenéticas. Motivos conservados também foram identificados e utilizados para complementar os resultados obtidos com as árvores. Finalmente, cada gene *Dof* de *E. grandis* foi localizado no seu respectivo cromossomo, e parálogos putativos foram conectados por linhas.

Como era esperado, o alinhamento das sequências proteicas completas de *E. grandis* gerou resultados com baixa identidade, contendo vários espaçadores entre os resíduos de aminoácidos. Apenas o domínio *Dof* exibiu alta identidade entre as diferentes sequências, incluindo o par de resíduos de cisteína necessários para a formação do motivo semelhante a “dedo-de-zinco” (Figura 1).

Resultados similares foram obtidos com o alinhamento das 102 sequências proteicas *Dof* de *E. grandis*, *A. thaliana* e *P. trichocarpa*. Esses resultados são consistentes com a alta variabilidade dos domínios não-*Dof* dessas proteínas, contrastada pelo altamente conservado domínio *Dof* (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004).

A primeira árvore filogenética construída com as 26 sequências proteicas *Dof* de *E. grandis* permitiu a identificação de 10 pares de genes parálogos (identificados com numerais romanos na Figura 2A). Genes parálogos são provavelmente resultado de duplicação gênica, e normalmente apresentam funções diferentes dentro de um mesmo organismo (LIJAVETZKY *et al.*; 2003). Motivos identificados com o software MEME Suit estão apresentados completos

na Tabela 1 e representados graficamente na figura 2B. Os motivos identificados são em sua maioria pequenos, mas corroboram a localização dos genes parálogos putativos. O par X de genes parálogos apresentou 12 motivos em comum além do domínio Dof; o par V exibiu nove; o par VI apresentou seis; o par III exibiu quatro; os pares I, II, IV e VII apresentaram três; o par IX exibiu dois; o par VIII não exibiu motivos em comum além do domínio Dof. Novamente, as proteínas Dof apresentaram pouca similaridade estrutural fora do domínio Dof. Esses dados, porém, aliados aos valores de probabilidade posterior encontrados nos nós das árvores filogenéticas (Figura 2A) apoiam a classificação desses genes como parálogos putativos. Finalmente, todos os pares de parálogos apresentaram genes em diferentes cromossomos, como observado na Figura 3, sugerindo que eventos de duplicação de segmentos seguidos de translocação contribuíram para a expansão dos genes *Dof* em *E. grandis* (CAI *et al.*, 2013).

A segunda árvore filogenética, construída com as 102 sequências de proteínas Dof de *E. grandis*, *A. thaliana* e *P. trichocarpa*, permitiu a identificação de 13 grandes clados de genes ortólogos, apresentados com cores diferentes e numerados com algarismos romanos na Figura 4. Como pode ser observado, o maior agrupamento (II) continha 15 genes das três espécies. Genes ortólogos provavelmente possuem uma ancestralidade em comum, tendo mantido estrutura e função ao longo da diferenciação dos organismos cujo genoma os contém (LIJAVETZKY *et al.*, 2003).

Levando isso em consideração, genes *Dof* de *E. grandis* que foram agrupados próximos (não mais do que dois nós de distância) aos genes *Dof* de *A. thaliana* foram novamente classificados em nove pequenos grupos de ortólogos (identificados com numerais romanos na Figura 4). Novamente, motivos conservados localizados com o software MEME Suit (Figura 5 e Tabela 3) corroboraram a localização dos genes na árvore: o Grupo II apresentou 11 motivos em comum além do domínio Dof; o Grupo IX exibiu oito motivos; o grupo VII apresentou sete motivos; o grupo VI exibiu seis motivos; o grupo V apresentou cinco motivos; o grupo VIII exibiu quatro motivos; os grupos I e III apresentaram três motivos; o grupo IV exibiu dois motivos. Reforçando a classificação dos pares

de parálogos putativos, seis dos 10 pares observados na primeira árvore foram localizados próximos na segunda análise: o par III (Eucgr.A01258 e Eucgr.K03144) estava no agrupamento IX. O par IV (Eucgr.J00957 e Eucgr.B02459) estava no agrupamento VIII; o par VII (Eucgr.H01971 e Eucgr.F00039) estava no agrupamento X; o par VIII (Eucgr.J02884 e Eucgr.F03105) estava no agrupamento X. Curiosamente, o par VI (Eucgr. A01441 e Eucgr.K00405) estava separado, com o gene Eucgr.K00405 não incluído em qualquer agrupamento (Figura 4).

Visto que os genes *Dof* de *A. thaliana* são os mais bem descritos atualmente, informações disponíveis sobre eles no banco de dados TAIR foram obtidas e utilizadas na comparação com os genes *Dof* de *E. grandis* que se apresentaram como ortólogos putativos (Tabela 2) como um primeiro passo para inferir funções a esses genes. Essa análise nos permitiu identificar cinco genes de *A. thaliana* que podem apresentar ortólogos no genoma de *E. grandis*. Eucgr.D00490 foi localizado próximo ao gene At1g29160, ou COG1, um fator de transcrição ativado por luz que regula negativamente a sinalização dos fitocromos (PARK *et al.*, 2003). Eucgr.B00515 foi localizado próximo aos genes At3G47500 and At5G62430, ou CDF3 e CDF1, dois fatores de transcrição que participam no florescimento fotoperiódico em *A. thaliana* (LI *et al.*, 2009; NOGUERO *et al.*, 2013). Novos estudos sobre expressão relativa desses genes em órgãos reprodutores de *E. grandis* são necessários para elucidar essa relação. Eucgr.I00569 foi localizado próximo ao gene At5G65590, ou SCAP1, um fator de transcrição que regula elementos-chave da morfogênese e função dos estômatos (NEGI *et al.*, 2013). Corroborando com uma expressão estomatal, o perfil de expressão de Eucgr.I00569 apresentou valores significativamente maiores em folhas e caules, como apresentado na Figura 6. Finalmente, Eucgr.K02841 foi localizado próximo ao gene At5G62940, ou HCA2, um fator de transcrição que regula o desenvolvimento de tecidos vasculares (GUO *et al.*, 2009). Curiosamente, como apresentado na próxima sessão, indivíduos de *E. grandis* tratados com NAA apresentaram um aumento da expressão de Eucgr.K02841 em raízes (Figura 6), que pode estar relacionado a uma resposta de desenvolvimento vascular induzida por auxinas. Todos os grupos são também suportados por altos

valores de probabilidade posterior observados nos nós da árvore filogenética (Figura 4) e por motivos conservados encontrados com o software MEME Suit (Figura 5).

Expressão Relativa dos Genes *Dof* em *E. grandis*

Considerando que perfis de expressão podem prover informações valiosas para a comparação de genes ortólogos, foram realizados ensaios de RT-qPCR com amostras de RNA total extraído de folhas, caules e raízes obtidas de plantas de *E. grandis*, utilizando 26 pares de oligonucleotídeos específicos para os 26 genes *Dof*. Perfis de expressão relativa representando os níveis de mRNA das amostras foram obtidos para 20 dos 26 genes testados (Figuras 6, 7 e Figuras Suplementares).

Como esperado, os perfis apresentaram uma vasta gama de padrões tanto espacialmente (em diferentes órgãos; Figura 6) quanto em resposta a tratamentos hormonais ou estresses (Figura 7 e Figuras Suplementares). Esses resultados são consistentes com trabalhos publicados anteriormente (CAI *et al.*, 2013; MORENO-RISUENO *et al.*, 2007) e com a característica multifuncional das proteínas *Dof* conhecidas, que são expressas em diversos órgãos e tecidos e estão envolvidas com uma ampla variedade de fenômenos específicos de plantas (NOGUERO *et al.*, 2013; YANAGISAWA, 2004).

Na análise espacial, os 20 genes *Dof* de *E. grandis* apresentaram expressão nos três órgãos analisados, com pouca diferença observável nos níveis de expressão relativa calculados (Figura 6). Foi observado que os genes Eucgr.A01441, Eucgr.D00652 e Eucgr.K00405 apresentaram expressão significativamente mais elevada em amostras de caule; Os genes Eucgr.D00490, Eucgr.D00607, Eucgr.D01698, Eucgr.E00037 e Eucgr.K01541 apresentaram expressão significativamente menor em amostras de folhas; Os genes Eucgr.E03261, Eucgr.G02493, Eucgr.I00569, Eucgr.J02884 e Eucgr.K02841 apresentaram expressão significativamente menor em amostras de raízes. Assim

como em trabalhos anteriores (NOGUERO *et al.*, 2013), não foi possível estabelecer relação entre similaridade estrutural das proteínas Dof e sua expressão espacial quando comparamos esses resultados com a árvore filogenética (Figura 4).

Nas amostras tratadas com ABA, NAA, KIN, NaCl e seca, a maioria dos genes *Dof* de *E. grandis* apresentou aumento de expressão nos três órgãos testados, com poucas exceções (Figura 7 e Figuras Suplementares). Foi observado que o gene Eucgr.D00652, que exibiu expressão significativamente menor em folhas na análise espacial, não apresentou variação de expressão em folhas em nenhum dos tratamentos, indicando que esse gene pode estar relacionado a eventos que ocorrem exclusivamente em caules e raízes. Além disso, o gene Eucgr.I00569, que exibiu expressão significativamente menor em raízes na análise espacial, não apresentou variação na expressão em amostras de raiz em plantas tratadas com ABA, NAA, KIN e NaCl, indicando que esse gene pode estar relacionado a eventos que ocorrem exclusivamente em folhas e caules. Infelizmente, não foi possível obter resultados para o gene Eucgr.I00569 com amostras das plantas tratadas com seca. Esses resultados corroboram trabalhos anteriormente publicados que descreveram fatores de transcrição Dof relacionados a fitormônios, incluindo regulação por auxina (PAOLIS *et al.*, 1996; BAUMANN *et al.*, 1999), ácido salicílico e ácido jasmônico (KANG *et al.*, 2003). Fatores Dof também estão relacionados com a síntese de lignina (ROGERS *et al.*; 2005), que é afetada por auxina e giberelina (ALONI *et al.*, 1990), entretanto, mais estudos são necessários para inferir se os genes *Dof* de *E. grandis* estão relacionados a esses fenômenos.

Esses resultados podem ser úteis para futuros ensaios de isolamento e purificação de proteínas Dof de amostras de *E. grandis*, bem como em estudos que objetivam inferir funções para cada membro da família, visto que perfis de expressão relativa proveem pistas para determinar a função de proteínas desconhecidas (CAI *et al.*, 2013).

Conclusão

Esse trabalho apresenta os primeiros passos em direção a uma análise abrangente dos genes da família *Dof* presentes no genoma de *E. grandis*. Os grupos de genes ortólogos identificados entre as espécies *A. thaliana* e *E. grandis* podem ser confirmados e analisados mais profundamente por estudos de proteômica e expressão relativa de outros órgãos e tecidos de *E. grandis*. Os perfis de expressão relativa apresentados podem ser úteis para futuros ensaios de isolamento e purificação de proteínas *Dof* de amostras de *E. grandis*, bem como em estudos que objetivam inferir funções para cada membro da família.

Referências

- ALONI, R.; TOLLIER, M.T.; MONTIES, B. The Role of Auxin and Gibberellin in Controlling Lignin Formation in Primary Phloem Fibers and in Xylem of *Coleus blumei* Stems. *Plant Physiology*, 94: 1743-1747, 1990.
- BAILEY, T.L.; BODEN, M.; BUSKE, F.; FRITH, M.; GRANT, C.E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W.W.; NOBLE, W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37: 202–208, 2009.
- BAUMANN, K.; DE PAOLIS, A.; COSTANTINO, P.; GUALBERTI, G.. The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *The Plant Cell*, 11: 323–334, 1999
- BOKSZCZANIN, K.; PRZYBLA, A.. New Simple and Efficient Method of DNA Isolation from Pear Leaves Rich in Polyphenolic Compounds. *International Journal of Horticultural Science*, 12: 21–24, 2006
- CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T.; YE, J.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Genome-wide Analysis of Plant-specific Dof Transcription Factor Family in Tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55: 552–566, 2013
- COOPER, B.; CLARKE, J.D.; BUDWORTH, P.; KREPS, J.; HUTCHISON, D.; PARK, S.; GUIMIL, S.; DUNN, M.; LUGINBÜHL, P.; ELLERO, C.; STEPHEN, A.; GLAZEBROOK, J. A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 4945–4950, 2003
- CORNEY, H.J.; SASSE, J.M.; ADES, P.K.. Assessment of salt tolerance in eucalypts using chlorophyll fluorescence attributes. *New Forests*, 26: 233–246, 2003
- DÍAZ-RIQUELME, J.; LIJAVETZKY, D.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; CARMONA, M.J.. Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiology*, 149: 354–369, 2009
- EDGAR, R.C.. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797, 2004

FILTZ, T.M; VOGEL, W.K; LEID, M.. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35: 76–85, 2013

FORNARA, F.; PANIGRAHI, K.C.S.; GISSOT, L.; SAUERBRUNN, N.; RÜHL, M.; JARILLO, J.A.; COUPLAND, G.. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell*, 17: 75–86, 2009

GAUDINO, R.J.; PIKAARD, C.S.. Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 6799–6804, 1997

GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R.D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D.S.. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40: 1178–1186, 2012.

GUALBERTI, G.; PAPI, M.; BELLUCCI, L.; RICCI, I.; BOUCHEZ, D.; CAMILLERI, C.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. Mutations in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 14: 1253–1263, 2002.

GUO Y, QIN G, GU H, QU L-J. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 3518–3534, 2009.

JAHNS, M.T. Avaliação da expressão gênica diferencial entre folhas e tecidos vasculares de *Eucalyptus grandis*. Dissertação de Mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

KANG, H-G.; FOLEY, R.C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L.; LIN, C.; SINGH, K.B. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *The Plant Journal*, 35(3): 362-372, 2003.

KISU, Y.; ONO, T.; SHIMOFURUTANI, N.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant & Cell Physiology*, 39: 1054–1064, 1998.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 623–629. 2007

- KUMAR, R.; TAWARE, R.; GAUR, V.S.; GURU, S.K.; KUMAR, A. Influence of nitrogen on the expression of TaDof1 transcription factor in wheat and its relationship with photo synthetic and ammonium assimilating efficiency. *Molecular Biology Reports*, 36: 2209–20, 2009.
- LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; ATHIKKATTUVALASU, S.K.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved Gene Annotation and New Tools. *Nucleic Acids Research*, 40: 1–9, 2011.
- LI, D.; YANG, C.; LI, X.; GAN, Q.; ZHAO, X.; ZHU, L. Functional characterization of rice OsDof12. *Planta*, 229: 1159–1169, 2009.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology*, 3: 1-11, 2003.
- LIU, Y.; ROOF, S.; YE, Z.; BARRY, C.; VAN TUINEN, A.; VREBALOV, J.; BOWLER, C.; GIOVANNONI, J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9897–9902, 2004.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402–408, 2001.
- MEDEIROS, A. Avaliação da expressão gênica diferencial entre xilemas contrastantes para a qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus* e estudos funcionais preliminares de genes candidatos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2009.
- MOKFIENSKI, A.; COLODETTE, J. Relative importance of wood density and carbohydrate content on pulping yield and product quality. *Ciência Florestal*, 18: 401–413, 2008.
- MØLLER, I.S.; GILLIHAM, M.; JHA, D.; MAYO, G.M.; ROY, S.J.; COATES, J.C.; HASELOFF, J.; TESTER, M. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21: 2163–2178, 2009.
- MORENO-RISUENO, M.A.; MARTÍNEZ, M.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; CARBONERO, P. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277: 379–390, 2007.

NEGI, J.; MORIWAKI, K.; KONISHI, M.; YOKOYAMA, R.; NAKANO, T.; KUSUMI, K.; HASHIMOTO-SUGIMOTO, M.; SCHROEDER, J.I.; NISHITANI, K.; YANAGISAWA, S.; IBA, K. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23: 479–484, 2013.

NOGUERO, M.; ATIF, R.M.; OCHATT, S.; THOMPSON, R.D. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science*, 209: 32–45, 2013.

DE OLIVEIRA, L.A.; BRETON, M.C.; BASTOLLA, F.M.; CAMARGO, S.D.S.; MARGIS, R.; FRAZZON J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. *Plant & Cell Physiology*, 53: 405–422, 2012.

PAINE, J.A.; SHIPTON, C.A.; CHAGGAR, S.; HOWELLS, R.M.; KENNEDY, M.J.; VERNON, G.; WRIGHT, S.Y.; HINCHLIFFE, E.; ADAMS, J.L.; SILVERSTONE, A.L.; DRAKE, R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23: 482–487, 2005.

DE PAOLIS, A.; SABATINI, S.; DE PASCALIS, L.; CONSTANTINO, P.; CAPONE, I. A rolB regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *The Plant Journal*, 10(2): 215-223, 1996.

PAPI, M.; SABATINI, S.; BOUCHEZ, D.; CAMILLERI, C.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes & Development*, 14: 28–33, 2000.

PARK, D.H.; LIM, P.O.; KIM, J.S.; CHO, D.S.; HONG, S.H.; NAM, H.G. The *Arabidopsis* COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *The Plant Journal*, 34: 161–171, 2003.

PEÑA, L.; MARTÍN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, 19: 263–267, 2001.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, P.; RIAÑO-PACHÓN, D.M.; CORRÊA, L.G.G.; RENSING, S.A.; KERSTEN, B.; MUELLER-ROEBER, B. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 38: 822–827, 2009.

ROGERS, L.A.; DUBOS, C.; SURMAN, C.; WILLMENT, J.; CULLIS, I.F.; MANSFIELD, S.D.; CAMPBELL, M.M. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *The New Phytologist*, 168: 123-140, 2005.

- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539–542, 2012.
- RUIZ, O.; HUSSEIN, H.; TERRY, N.; DANIELL, H. Phytoremediation of Organomercurial Compounds via Chloroplast Genetic Engineering. *Plant Physiology*, 132: 1344–1352, 2003.
- SCHWECHHEIMER, C. & BEVAN, M. The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 378–383, 1998.
- SON, O.; CHO, H-Y.; KIM, M-R.; LEE, H.; LEE, M-S.; SONG, E.; PARK, J.H.; NAM, K.H.; CHUN, J-Y.; KIM, H-J.; HONG, S.K.; CHUNG, Y-Y.; HUR, C-G.; CHO, H-T.; CHEON, C-I. Induction of a homeodomain-leucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in Arabidopsis roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326: 203–9, 2005.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–9, 2011.
- TANAKA, M.; TAKAHATA, Y.; NAKAYAMA, H.; NAKATANI, M.; TAHARA, M. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweetpotato plants overexpressing the SRF1 gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor. *Planta*, 230(4): 737-746, 2009.
- UMEMURA, Y.; ISHIDUKA, T.; YAMAMOTO, R.; ESAKA, M. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as Cys2/Cys2 Zn finger domain. *The Plant Journal*, 37: 741–749, 2004.
- VICENTE-CARBAJOSA, J.; MOOSE, S.P.; PARSONS, R.L.; SCHMIDT, R.J. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 7685–7690, 1997.
- VOORRIPS, R.E. Computer Note MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, 93: 77–78, 2002.
- WANG, H-W.; ZHANG, B.; HAO, Y-J.; HUANG, J.; TIAN, A-G.; LIAO, Y.; ZHANG, J-S.; CHEN, S-Y. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and

GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *The Plant Journal*, 52: 716-729, 2007.

YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant & Cell Physiology*, 45: 386–391, 2004.

YANAGISAWA, S. & SCHMIDT, R.J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal*, 17: 209–214, 1999.

YANAGISAWA, S. & SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *The Plant cell*, 10: 75–89, 1998.

LIU, Y.; DING, Y-F.; WANG, Q-S.; LI, G-H.; XU, J-X.; LIU, Z-H.; WANG, S-H. Effect of Plant Growth Regulators on Growth of Rice Tiller Bud and Changes of Endogenous Hormones. *Acta Agronomica Sinica*, 37: 670–676, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. *Biologia Molecular Básica*, 3^a ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 59-148, 2003.

ZOU, J.; LIU, A.; CHEN, X.; ZHOU, X.; GAO, G.; WANG, W.; ZHANG, X. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Journal of Plant Physiology*, 166: 851–861, 2009.

Curriculum Vitae Resumido

Nome Abreviado

D'ALMEIDA, G. S.

Nome

Gabriel Silveira d'Almeida

Local e data de nascimento

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 9 de Novembro de 1986.

Endereço profissional

Av. Bento Gonçalves 9500. Prédio 43431, sala 212. Centro de Biotecnologia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Telefone profissional

(51) 3308-6094

E-mail

gsdalmeida@cbiot.ufrgs.br

Formação

1. Graduação em Biomedicina (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007-2012).
2. Pós-graduação *in stricto sensu* (Mestrado) (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012-2014).

Estágios:

1. Estágio de iniciação científica não remunerado no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do departamento de biofísica da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, sob orientação do Professor Doutor João Antônio Pegas Henriques. Período: Março a Dezembro de 2008. Atividades desenvolvidas: participação no projeto “Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models” do aluno de mestrado Tiago Hoerbe Degrandi.

2. Estágio de iniciação científica no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do centro de biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Doutor Giancarlo Pasquali. Período: Novembro de 2009 a Agosto de 2010. Fonte financiadora: CNPq. Atividades desenvolvidas: Trabalho de conclusão de curso intitulado “Genômica comparativa em *Eucalyptus grandis* relativa à genes codificadores dos fatores de transcrição da família Dof”.

3. Estágio de iniciação científica no *RNA Laboratory*, do departamento de microbiologia da Ohio State University, sob orientação do Professor Doutor Juan D. Alfonzo. Período: Setembro a Dezembro de 2010. Fonte financiadora: CAPES. Atividades desenvolvidas: Extração de DNA e RNA de microorganismos, sequenciamento de DNA e cultura de células.

4. Estágio de iniciação científica no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do centro de biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Doutor Giancarlo Pasquali. Período: Janeiro a Junho de 2011. Fonte financiadora: CNPq. Atividades desenvolvidas: participação no projeto “Expressão de Jaburetox, um peptídeo derivado de urease de *Canavalia ensiformis* em *Nicotiana tabacum*”.

Experiência Profissional

1. Estágio curricular obrigatório em patologia clínica nos laboratórios de Biologia Molecular, Bioquímica, Microbiologia, Hematologia e no setor de coleta e processamento de amostras do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Período: Julho a Dezembro de 2011.

Artigos Completos Publicados

DEGRANDI, T. H.; DE OLIVEIRA, I.M.; D'ALMEIDA, G.S.; GARCIA, C.R.; VILLELA, I.V.; GUECHEVA, T.N.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis*, 25(3): 257–69, 2010.

Resumos e Trabalhos Apresentados em Congressos

D'ALMEIDA, G.S.; BRETON, M.C.; CAMARGO, S.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Phylogenetic comparative and expression analysis of genes encoding dof transcription factors from *Eucalyptus grandis*. *BMC Proceedings*, 5: 2011.