



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

**Prospecção de genes regulatórios e estruturais expressos
em botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**

MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO

Recife – PE
2011

MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO

**Prospecção de genes regulatórios e estruturais expressos
em botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

Comitê de orientação:

Orientador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho (DEPA-UFRPE)

Co-orientadora: Dr^a Liziane Maria de Lima (Embrapa Algodão)

Recife – PE
2011

FICHA DE AVALIAÇÃO

MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO

Prospecção de genes regulatórios e estruturais expressos em botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia -
Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Melhoramento
Genético de Plantas

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 18/02/2011

Orientador:

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
Departamento de Agronomia - UFRPE

Examinadores:

Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos
Pesquisadora da Embrapa Algodão

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Departamento de Biologia - UFRPE

Prof^a. Dra. Luiza Suely Sêmem Martins
Departamento de Biologia - UFRPE

Recife – PE
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

Houve tempos em que precisei chorar, e vocês me consolaram. Houve tempos em que sorri, e vocês sorriram comigo. Houve tempos em que briguei, questionei e vocês me apoiaram. Houve tempos em que sonhei, lutei, acreditei e vivi intensamente muitas emoções. E vocês, com o amor verdadeiro estiveram ao meu lado, enfrentando todos os obstáculos, acreditando em mim e em meus ideais. Dedico essa minha conquista à vocês, meus pais amados, Maria das Graças Nóbrega e José Washington Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

As Instituições Fomentadoras: Universidade Federal Rural de Pernambuco (formação de Mestre), Capes (concessão da bolsa), Embrapa e Monsanto (suporte financeiro da pesquisa).

Ao Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho, pela orientação, apoio e confiança.

À minha amiga e co-orientadora Dra. Liziane Maria de Lima, um exemplo de mulher para mim! Sem sua dedicação, paciência, companheirismo. Serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim.

À Dra. Roseane Cavalcanti por acreditar sempre em mim. Por estar presente em todos os momentos, pela adoção, carinho e pelas orientações enriquecedoras.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas da UFRPE pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional.

Ao meu irmão Wellber Renné, pela organização que você faz em minha vida! Você é meu guia e amigo. Obrigada por tudo! Amo você muito.

A minha “mãedrinha” Tia Côca pela presença constante e valiosos conselhos e pelas frases de otimismo e motivação que sempre chegavam nas horas que mais necessitava.

À minha cunhada, amiga e irmã Bruna Rocha, pelo grande carinho demonstrado a cada dia. Sei que posso contar com você sempre.

Ao meu amigo Vandrê Guevara, pela jornada diária no laboratório, obrigada por nunca me negar ajuda, pelos desabafos e frases de otimismo como: “Vai dá tudo certo”! Levarei sua amizade por toda minha vida.

À minha amiga Kathyúscia Torquato pela grande amizade conquistada desde o tempo da graduação e que permanecerá sempre em nossos corações.

À Uiara Cavalcante, minha amiga e irmã. Obrigada por todos os momentos vividos, não importava qual situação estamos vivendo se de tristeza ou alegria, de agonia ou alívio, enfim foram todos importantes porque estávamos juntas. Obrigada por todos os ensinamentos e agradeço também pelas inúmeras discussões que tivemos, afinal se não fossem por elas nossa amizade hoje não seria tão verdadeira. Você é muito importante pra mim!

À Tatiana Silva pela amizade durante todos esses anos.

À minha amiga Carliane Rebeca pelas longas conversas... sempre acompanhadas de muitas risadas. Obrigada pela grandzade. Você faz parte da minha história.

À Pollyne Borborema, esse anjo que Deus colocou em meu caminho! Você apareceu em minha vida com seu jeito especial e sua amizade verdadeira! Agradeço todos os dias ter você em minha vida me ensinando a viver sempre de forma mais divertida, sempre enxergando o lado bom das coisas. Tenho muito orgulho de ser sua amiga!

Ao amigo Marlon pela amizade Leal conquistada em tão pouco tempo. Obrigada pelas acolhidas, conselhos e incentivos dados a todo o momento.

À Seu Chico pelos ensinamentos diários, e ao carinho demonstrado a cada dia.

Agradeço a Fábria Suelly pelos conselhos de mãe. Obrigada pela grande amizade construída e fortalecida a cada dia.

À Família Arroxelas (Antônio, Karen e Alice), a mais nova família a qual já faço parte! Obrigada por sempre estarem dispostos a escutarem meus desabafos, agradeço todos os conselhos oferecidos e os que ainda estão por vir. Admiro demais vocês!

À Joabson Borges pelo seu sorriso contagiante de todos os dias, pelo apoio oferecido a cada obstáculo encontrado, pelos momentos de descontração, enfim, pela grande amizade durante todos esses anos de convivência.

Aos meus companheiros de jornada: Paulo Geovane, Fábio Araújo, Saulo. Obrigada “amiiigos” pelas acolhidas sempre animadíssimas em Recife, vocês são parte integrante desta conquista.

As amigas que conquistei em minha passagem por Recife: Georgia, Silvany, kaline, Gemima, Amanda. Levarei sempre comigo aqueles momentos maravilhosos no “Jambalaia” que nos divertíamos mesmo sem fazer nada.

À Dra. Natália (CENARGEN) pelos sequenciamentos e valiosas contribuições neste trabalho.

Aos novos amigos que conquistei na Embrapa Algodão: Geise, Camila, Thiago, Digiane, Monalisa, Nilene...

SUMÁRIO

	Págs
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	xiv
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. RESIVÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1 Aspectos gerais sobre a cultura do algodão <i>Gossypium hirsutum</i> L.	2
1.2. Biologia floral do algodoeiro	3
1.3. Estudo da expressão gênica	4
1.3.1. Genômica Funcional.....	4
1.3.2. Transcriptômica.....	5
1.3.3. Proteômica.....	6
1.4. Bibliotecas de cDNA.....	7
1.4.1. Genes envolvidos no desenvolvimento do botão floral.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO II – Genes expressos em botão floral isolados a partir de uma biblioteca subtrativa de <i>Gossypium hirsutum</i>	17
Resumo	18
Abstract	18
Introdução	19
Material e Métodos	21
Material Vegetal	21
Extração de RNA total e construção da biblioteca de cDNA.....	21

Clonagem e sequenciamento.....	22
Clusterização e análise in silico das sequências.....	22
Estudo da expressão de genes por RT-PCR semiquantitativa.....	23
Resultados e Discussão.....	24
Conclusões.....	30
Agradecimentos.....	31
Referências	32

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. A) Secção longitudinal da flor do algodoeiro (Fonte: Adaptado de OLIVEIRA NETO, 2005); B) Fruto do algodoeiro (capulho) (Fonte: Adaptado do PORTAL AGRONOTÍCIAS, 2009)4

Figura 2. Etapas da construção de um biblioteca de cDNA. 1- Extração de RNA mensageiro; 2 – Síntese reversa utilizando RT-PCR; 3 – Síntese de cDNA dupla fita; 4 – Clonagem dos cDNAs (Fonte: Adaptado do PORTAL DA CIÊNCIA, 2008)..... 7

CAPÍTULO II

Figura 1. Frequência das 18 categorias funcionais identificadas a partir do banco de dados de proteínas funcionais (KOG - *Eukaryotic Orthologous Groups*). (A) Modificação e processamento de RNA; (B) Estrutura e dinâmica da cromatina; (C) Produção de energia e conversão; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular, compartimentalização de cromossomos; (F) Transporte de nucleotídeo e metabolismo; (G) Transporte de carboidrato e metabolismo; (I) Transporte de lipídeo e metabolismo; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (O) Modificação pós-traducional, proteínas chaperonas; (R) Predição de função geral; (S) Função desconhecida; (T) Mecanismo de tradução de sinal; (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (Y) Estrutura nuclear; (Z) Citoesqueleto 24

Figura 2. RT-PCR semiquantitativa das ESTs geradas pela biblioteca subtrativa de algodão (*Gossypium hirsutum*): (A) *ANTFIB010* (401 pb); (B) *ASH* (271 pb); (C) *OVU* (405 pb); (D) *FIB010* (304 pb); (E) *FIBEARLY* (268 pb); (F) *GLUCANASE* (532 pb); (G) *ACTINA* (400 pb) – controle constitutivo. Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100pb 30

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Genes relacionados ao botão floral de <i>Gossypium hirsutum</i> (algodoeiro) e <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Principais eventos biológicos relacionados ao estágio de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro	36
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores específicos dos genes para estudos de RT-PCR semiquantitativa	36
Tabela 3. Genes identificados a partir da biblioteca de cDNA de botão floral de algodoeiro	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLASTX	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
CottonDB	<i>Cotton Genome Database</i>
dpa	Dias pós antese
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
IN	Índice de Novidade
In silico	Análise computacional
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IS	Índice de Sucesso
KOG	<i>Eukaryotic Orthologous Groups</i>
LD-PCR	<i>Long Distance PCR</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pb	Pares de bases
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de PCR
SISGEN	Sistema Genômico
TGICL	<i>Instituto de Genomic Research</i>
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
TAIR	<i>Arabidopsis Information Resource</i>

RESUMO

A cultura do algodão está presente em vários setores, desde o agrícola até o industrial, gerando cerca de 70% de toda mão-de-obra em nível de produção primária. Isso coloca o algodão como uma das principais *commodities* internacionais. O Brasil vem se destacando no âmbito da produção, sendo atualmente o quinto maior produtor mundial e o quarto exportador. Apesar disso, o manejo da lavoura é muito elevado sendo os principais custos destinados com maquinários e controle de pragas e doenças. Com o advento das práticas atuais da biotecnologia moderna, estratégias biológicas visando o controle de pragas e doenças vêm sendo utilizadas, dentre elas o uso de plantas geneticamente modificadas expressando genes que a defendem desses males. Tais genes, frequentemente regulados por promotores de expressão constitutiva oferecem proteção em toda a planta, embora os níveis sejam diferenciados no aspecto tissular. Nesse caso, o uso de promotores tecido-específico para guiar a sequência codante possibilita ação mais direta de proteção e menor gasto de energia da planta para promover a proteína alvo. A lavoura do algodoeiro é vulnerável a várias pragas que incidem nas estruturas reprodutivas, especialmente lepidópteros e coleópteros. Com a finalidade de conhecer genes expressos nos botões florais, a fim de, posteriormente, utilizá-los na área de transgenia, uma biblioteca subtrativa de cDNA de botão floral construída. Foram geradas 768 sequências, tendo sido formado 168 agrupamentos com 126 singlets e 42 contigs. As análises *in silico* foram realizadas contra o banco de dados do algodão (CottonDB) e o banco de *Arabidopsis thaliana* (TAIR) e muitos genes foram identificados. A partir dessas análises foram selecionados seis genes relacionados ao desenvolvimento de óvulos, fibras, tubo polínico e pistilo (*ANTIFIB010*, *ASH*, *OVU*, *FIB010*, *FIBEARLY* e *GLUCANASE*) para estudos de RT-PCR semiquantitativo. Os resultados mostraram que os genes selecionados são expressos nos tecidos estudados (botão, haste, folha e raiz), no entanto pôde-se observar um maior nível de expressão nos botões florais.

Palavras-chave: Algodão, prospecção de genes, transcriptoma, RT-PCR

ABSTRACT

The cotton crop is present in several sectors, from agriculture to the industry, generating about 70% of employment to level of primary production, putting the cotton as a major international commodities. The Brazil has been increasing in terms of production, currently the fifth largest world producer and exporter quarter. Despite this, the management of the crop is very high and the main costs for machinery and to control pests and diseases. With the advent of the current practices of modern biotechnology, biological strategies for the control of pests and diseases have been used, including the use of plants genetically modified to contain genes that defend these evils. These genes, often regulated by constitutive expression promoters provide protection throughout the plant, although the levels are different in appearance tissue. In this case, the use of tissue-specific promoters to drive the sequence codante allows more direct action to protect and lowest power plant to promote target protein. The cotton crop is vulnerable to various pests that affect the reproductive structures, especially lepidopters and coleopters. With a view to ascertaining genes expressed in flower buds to subsequently use them in the area of transgenics, a subtractive cDNA library from flower buds built. We generated 768 sequences, having been formed 168 clusters with 126 contigs and 42 singlets. The in silico analysis were performed against the database of cotton (CottonDB) and Bank of *Arabidopsis thaliana* (TAIR) and many genes have been identified. From this analysis we selected six genes related to the development of eggs, fibers, pollen tube and pistil (*ANTIFIB010*, *ASH*, *OVU*, *FIB010*, *FIBEARLY* and *GLUCANASE*) to studies of semiquantitative RT-PCR. The results showed that the selected genes are expressed in all tissues studied (button, stem, leaf and root), however we could observe a higher level of expression in flower buds.

Key words: Cotton, genes prospect, transcriptome, RT-PCR

INTRODUÇÃO GERAL

O algodoeiro é uma fibrosa de alto valor no mercado mundial devido à qualidade de sua fibra e aos derivados comerciais que a planta produz como a torta e farelo para suplementação animal e o óleo para fins comestível e biodiesel (ARAÚJO et al., 2003). A cultura de algodão tem-se destacado por sua importância econômica e social, gerando cerca de 70% de toda mão-de-obra em nível de produção primária, fato que a coloca como umas das principais *commodities* internacionais. O Brasil vêm se destacando no âmbito da produção, sendo atualmente o quinto maior produtor mundial e o quarto exportador (BOLETIM ANUAL DO MERCADO DE GRÃOS, 2010; CONAB, 2011).

Devido a esta grande importância no setor econômico, o algodão é sempre alvo dos programas de melhoramento, seja pelo método convencional ou pelas técnicas da engenharia genética. Os primeiros trabalhos envolvendo esta cultura visavam cultivares mais precoces e de ciclo determinado, mais tarde os esforços foram direcionados para obtenção de uma cultivar que apresentasse uma maior produtividade associado a uma boa qualidade de fibras. No entanto, um dos maiores desafios das pesquisas é a obtenção de uma cultivar geneticamente modificada resistente às pragas e doenças.

A despeito disso, o manejo da cultura do algodoeiro é muito elevado, sendo os principais custos, cerca de 40%, destinados com maquinários e controle de pragas e doenças, o que torna constantemente necessária a busca por novas tecnologias. A transformação genética pode contribuir substancialmente para o melhoramento do algodoeiro, permitindo a introdução de genes que contribuam para o aumento da produtividade e estabilidade da produção, além de resistência a fatores bióticos e abióticos (GATEHOUSE e GATEHOUSE, 2000).

Tais genes, frequentemente regulados por promotores de expressão constitutiva (CaMV35S - Vírus do Mosaico da Couve-flor; EF1 α - Fator de Elongação Ribossômica) oferecem proteção em toda a planta, embora os níveis de expressão sejam diferenciados no aspecto tissular (ZHANG et al., 2004). Em algodão, por exemplo, a expressão é alta em folhas, porém em botão floral o nível de expressão é baixo. Por isso, há necessidade de isolar promotores que se expressem nas partes aéreas do algodoeiro, principalmente nos botões florais e maçãs, órgãos da planta que são atacados pelas pragas. Com isso, uso de promotores tecido-específico para guiar a sequência codante

possibilitará ação mais direta de proteção e menor gasto de energia da planta para promover a proteína alvo.

Com a tecnologia genômica tem-se gerado muitas informações e criado bancos de dados de sequências de DNA e/ou cDNA (GenBank, dbEST, Gene, UniGene, CottonDB, TAIR, PubMed), as quais constituem ferramentas importantes na busca rápida e na seleção de genes potenciais de importância agronômica (AVARENGA et al., 2007). Neste contexto, uma biblioteca subtrativa de cDNA foi construída, a fim de prospectar genes regulatórios e estruturais no botão floral do algodoeiro para posterior identificação das sequências regulatórias *upstream* tecido específica visando seu uso nos trabalhos de transgenia para resistência a pragas.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 Aspectos gerais sobre a cultura do algodão *Gossypium hirsutum* L.

O algodoeiro, pertencente à família Malvaceae, teve sua primeira evidência de uso há 3000 anos a.C., através de escavações arqueológicas nas ruínas de Mohenjo-Daro, no Paquistão, onde se encontrou vestígios de tela e cordão de algodão. No entanto, seu cultivo iniciou-se 1500 anos a.C. na Índia para fabricação de tecidos (PASSOS, 1977). No século IV a.C., os chineses já utilizavam a fibra do algodão para tecer panos, prática esta que também se estabeleceu na Europa. Na América, o algodão já era utilizado pelos índios, os quais tinham técnicas de colheita, fiação, tintura e tecelagem. Apenas, no final do século XVIII e início do século XIX, a cultura do algodão, do tipo arbóreo, se estabeleceu no Brasil, principalmente na região Nordeste. A variedade herbácea foi introduzida em 1860, pelos ingleses (CORRÊA, 2003).

A família Malvaceae é constituída por cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies. No Brasil, há ocorrência de aproximadamente 80 gêneros e 400 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005), um dos principais gêneros é o *Gossypium*, formado por cerca de 50 espécies classificadas (PENNA, 1999; BALLAMINUT, 2010). Neste gênero, as espécies que se destacam mundialmente, quanto ao seu cultivo, são *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. Dentre estas, a espécie *G. hirsutum* é a de maior valor comercial por produzir 90% das fibras comercializadas no mundo (CRAVEN et al., 1994; BORÉM, 2003).

Além da fibra, o algodoeiro produz vários subprodutos, tais como linter, óleo para fins comestível e biodiesel, torta e farelo, para suplementação animal, entre outros. A cultura do algodão está presente em vários setores da economia, desde o agrícola até o industrial, gerando cerca de 70% de toda mão-de-obra em nível de produção primária. Isso coloca o algodão como uma das principais culturas nacionais, colocando o País como o quinto maior produtor e o quarto maior exportador. Em 2011, o Brasil alcança uma das maiores áreas cultivadas com algodão nos últimos 10 anos (1.304,7 mil ha), crescimento de 56,1% de área plantada em comparação a safra anterior. A produtividade média do algodão em caroço deverá alcançar 3.825 kg/ha (acrécimo de 5,3%) e 1.950,2

mil toneladas de pluma (acrécimo de 63,3%). A região Nordeste, que contribui com 33,0% na área plantada do País obteve importantes crescimentos, destacando os estados da Bahia (48,6%), Piauí (162,8%) e Maranhão (55,6%) (BOLETIM ANUAL DO MERCADO DE GRÃOS, 2010; CONAB, 2011).

1.5. **Biologia floral do algodoeiro**

A planta do algodoeiro é de natureza intermediária, podendo as taxas de alogamia e autogamia variar dependendo da velocidade dos ventos e insetos melíferos nos campos de produção.

A principal via de propagação é por sementes. A floração varia em função do ciclo da cultura, contudo, em plantas precoces, inicia-se entre 45-50 dias, perdurando durante todo ciclo. A eficiência dessas flores gira em função dos primeiros 50-60 dias após o início da floração. A partir daí, ela decresce devido ao gasto fisiológico da planta para produzir os capulhos (PENNA, 1999).

O aparelho reprodutor do algodoeiro, cuja estrutura é hermafrodita, simétrica e com polinização do tipo entomófila, propicia tanto a autofecundação quanto a polinização cruzada. As flores do algodoeiro são completas, pois apresentam os quatro verticilos florais. São isoladas, pedunculares, actinomórficas e são protegidas por três brácteas (PASSOS, 1982). A cor varia de branco a creme, tornando-se violácea após o processo de fecundação. Cada ramo frutífero produz, em média, seis a oito botões que depois se transformam em flores (PENNA, 1999).

Na Figura 1A pode ser observado o corte de uma flor do algodoeiro herbáceo, destacando-se além dos verticilos de proteção, o androceu, que possui cerca de dez fileiras de estames, com colunas estaminais envolvendo o estilete até a altura do estigma. Cada filete possui uma antera de coloração creme e se encontra alinhado em cinco fileiras duplas longitudinais. As anteras apresentam um lóculo com deiscência longitudinal e são mesofixas. O ovário é súpero, com três a cinco carpelos e três a cinco lóculos, com óvulos de placentação marginal-central e cada lóculo apresenta de oito a dez óvulos. O grão de pólen contém o núcleo vegetativo e o núcleo reprodutivo, os quais têm diâmetro de 199 μm , enquanto os óvulos são um pouco maiores e estão no interior do ovário, variando de 24 a 50 óvulos por flor (PENNA, 1999; SOUZA e LORENZI, 2005).

As fibras do algodão são células únicas de tricoma que se desenvolvem a partir da diferenciação da epiderme celular do tegumento do óvulo, dando origem ao fruto (SONG e ALLEN, 1997).

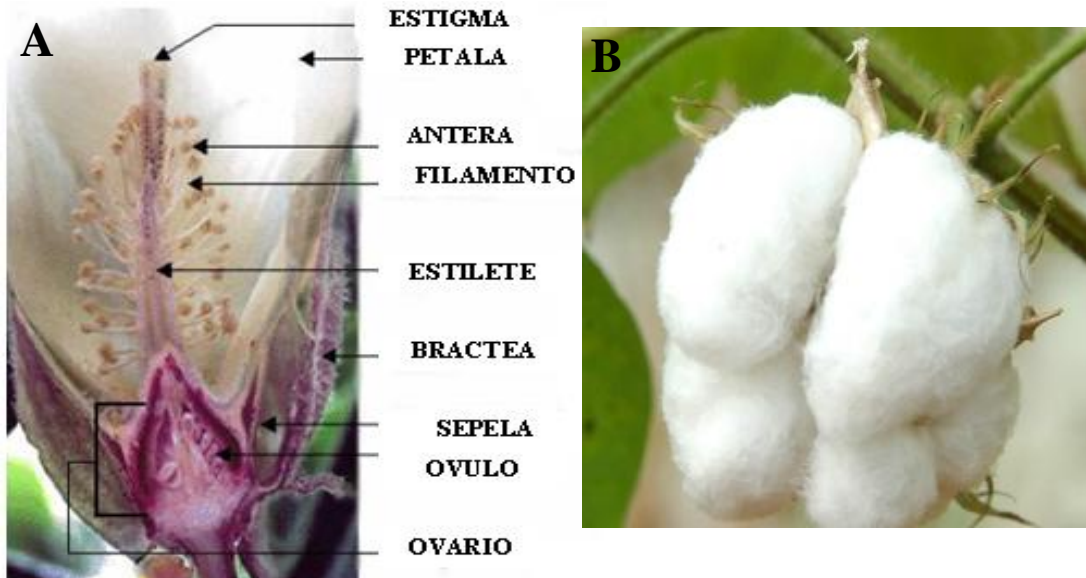


Figura 1 - A) Secção longitudinal da flor do algodoeiro (Fonte: Adaptado de OLIVEIRA NETO, 2005); B) Fruto do algodoeiro (capulho) (Fonte: Adaptado do PORTAL AGRONOTÍCIAS, 2009).

1.6. Estudo da expressão gênica

O processo pelo qual um gene é traduzido em uma cadeia polipeptídica é denominado de expressão gênica. É através deste estudo que são compreendidas a função dos genes em níveis proteômicos (conjunto completo das proteínas) e/ou transcriptômicos (conjunto completo de genes expressos sob certas condições) (BINNECK, 2004).

1.3.1. Genômica Funcional

As ciências conhecidas como ômicas, surgem como ferramentas moleculares que auxiliam na análise dos produtos gênicos. A primeira ômica surgida foi a genômica que tem como objetivo compreender como os genes e a informação genética está

organizada no DNA e como essa organização determina a sua função (BINNECK, 2004; ROBERTSON, 2005). Em seguida, surgiram outras ômicas: transcriptômica, proteômica, metabolômica, fisiômica, regulômica, peptidômica, epigenômica, taxigenômica, entre outras.

A interação das informações obtidas por essas ômicas são o objetivo principal da Biologia de Sistemas, também conhecida como Genômica Funcional, onde o principal objetivo é a elucidação detalhada da função dos genes envolvidos nos processos de diferenciação e desenvolvimento das plantas ou nos processos envolvidos nas respostas das plantas às alterações do ambiente, seja um fator biótico ou abiótico (MEYERS et al., 2004; ROCHFORT, 2005; PASSOS et al., 2008).

Com os recentes avanços da genômica funcional é possível identificar a expressão espacial e temporal dos genes em um organismo, tecido ou célula com o auxílio de diferentes técnicas. Dentre as técnicas destacam-se: i) a construção de bibliotecas de ESTs, que permite identificar quais RNAs mensageiros (RNAm) estão sendo expressos num organismo, em um determinado momento (MEYERS et al., 2004); ii) a técnica de hibridização *in situ*, que permite avaliar a distribuição espacial de um transcrito a partir da hibridização de uma sonda de ácido nucléico marcada (SCHAFFER et al., 2000); iii) técnica de PCR em tempo real, que caracteriza-se por ser um método rápido e sensível para quantificar o nível de transcritos, representando mais especificidade para a análise de expressão gênica em plantas (GACHON et al., 2004).

1.3.2. Transcriptômica

Ao se estudar o perfil transcriptômico de um determinado organismo obtém-se um conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, ribossômicos e transportadores) e, conseqüentemente, se adquire informações sobre a expressão dos genes. Algumas vezes se observa que a quantidade de proteína expressa não é proporcional à quantidade de RNAm. Isto ocorre devido aos mecanismos pós-traducionais, o que muitas vezes geram dúvidas quanto à funcionalidade de um determinado gene no metabolismo celular (REIS et al., 2007). A fim de se entender este tipo de mecanismo, foi incluído no conceito de transcriptômica os microRNAs, os quais fazem parte uma classe de pequenos RNAs (aproximadamente de 20 a 22 nucleotídeos) que impedem a formação das proteínas (PASSOS et al., 2008).

A análise transcriptômica torna-se possível devido às várias técnicas que podem ser empregadas, como: i) sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), que consiste de uma pequena porção de um gene (200-500 nucleotídeos), a qual fornece, de maneira rápida, a identificação de novos genes, a obtenção de dados sobre regulação e expressão gênica, bem como auxilia na construção de mapas genômicos (RICHMOND e SOMERVILLE, 2000; MEYERS et al., 2004); ii) métodos de análise em grande escala SAGE (*Serial analysis of gene expression*), que baseia-se na contagem em alta escala de regiões específicas (*tags*) constituídas por 9-10 pb, obtidas de uma população de transcritos (MEYERS et al., 2004); iii) *Differential display* (DDRT-PCR), que é uma estratégia de apresentação diferencial por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, consistindo na síntese de cDNA em subconjuntos utilizando oligo-dT diferentes (LIANG e PARDEE, 1992); iv) SSH (*Supression subtrative hybridization*), que permite a comparação de duas populações de DNA e o isolamento de genes diferencialmente expressos (DIACHENKO et al., 1996; REBRIKOV et al., 2000); v) microarranjos de DNA, que busca medir os níveis de expressão de transcritos em larga escala, ou seja, permite análise conjunta de um grande número de sequências (até 50.000 transcritos) além de possibilitar a integração de grandes conjuntos de dados oriundos de diversos experimentos (MEYERS et al., 2004; ZACHARIAH e DHANASEKARAN, 2004) e vi) *Northern blot*, que é um método padrão para detecção e quantificação dos níveis de RNAm e umas das formas mais simples de determinar o momento em que os genes estão sendo expressos (MEYERS et al., 2004).

1.3.3. Proteômica

Estudos envolvendo proteômica possibilitam analisar as proteínas que estão envolvidas nas diferentes rotas metabólicas, quantificarem os níveis de expressão, bem como compreender interações entre proteínas (REIS et al., 2007; PANDEY e MANN, 2002; WESTERMEIER e NAVEN, 2002).

Para tais estudos são utilizadas várias técnicas, destacando-se a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa. A primeira consiste em separar as proteínas sob a influência de um campo elétrico, onde ocorrem duas etapas de separação, baseado nas diferenças de ponto isoeletrico e massa molecular das proteínas (YATES, 1998). A segunda leva em consideração os movimento dos íons no campo elétrico classificando

de acordo com relação massa-carga das proteínas, que ao final obtém-se um espectro de massas (PANDEY et al., 2002; TYERS e MANN, 2003; REIS et al., 2007).

1.4. Bibliotecas de cDNA

Refere-se a um conjunto de sequências expressas de um tecido ou órgão, a qual está submetida a uma determinada condição do ambiente. O objetivo de se construir uma biblioteca de cDNA é gerar ESTs que mostrem genes expressos. Estas sequências são geradas a partir de um pool de RNAm pela ação da enzima transcriptase reversa. Em seguida os cDNA são clonados em um vetor de clonagem que pode ser plasmídeos, fagos ou cosmídeos (Figura 2) (MUNROE et al., 1995). Com uma biblioteca de cDNA pode-se avaliar a localização espacial e temporal dos genes em estudos (CORDEIRO, 2003).

As vantagens oferecidas ao se trabalhar com as bibliotecas de cDNA são: i) identificação de genes diferencialmente expressos; ii) ausência de introns nas sequências clonadas, o que facilita a identificação e a caracterização dos genes; iii) os cDNAs são mais fáceis de serem manipulados por serem relativamente pequenos; iv) podem ser inseridos por completo num único vetor (WATSON, 1997; ALBERTS, 2002; MALONE et al., 2006).

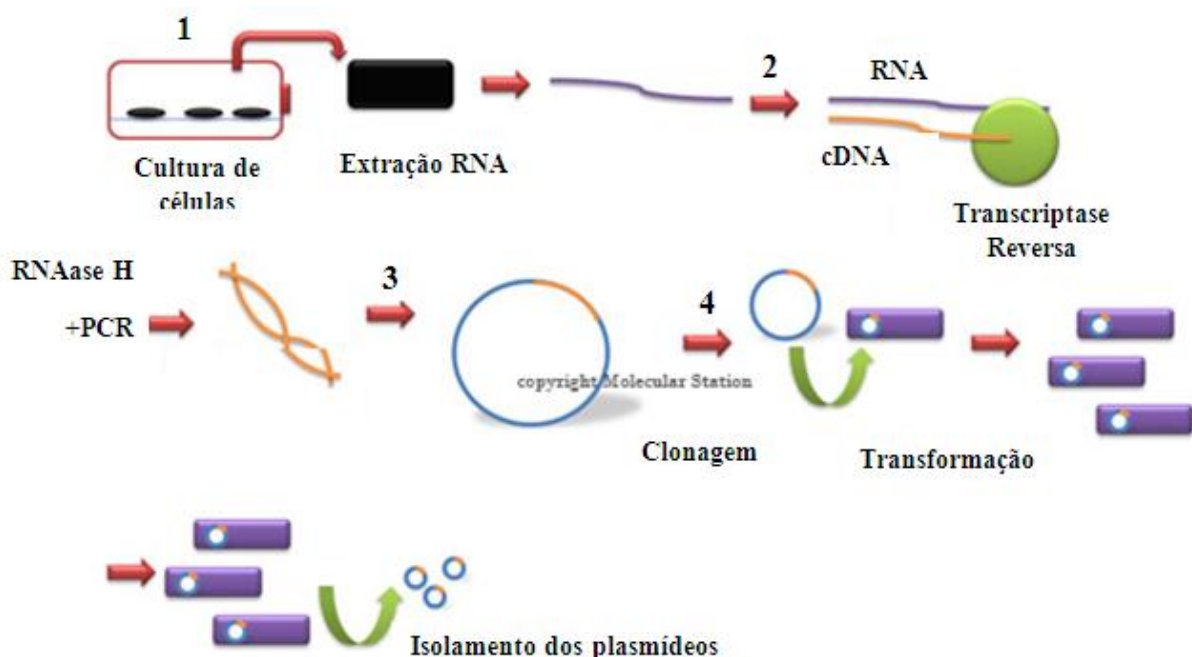


Figura 2. Etapas da construção de um biblioteca de cDNA. 1- Extração de RNA mensageiro; 2 – Síntese reversa utilizando RT-PCR; 3 – Síntese de cDNA dupla fita; 4 – Clonagem dos cDNAs (Fonte: Adaptado do PORTAL DA CIÊNCIA, 2008)

Na maioria dos casos os protocolos se baseiam nas seguintes etapas: i) extração de RNA de dois tratamentos; ii) síntese de cDNA; iii) seleção dos transcritos diferenciais, a partir de uma subtração *in vitro*. Assim, apenas são clonados e sequenciados os cDNA diferencialmente expressos, diminuindo o tempo e custo em relação à subtração *in silico*, que é sua principal vantagem (SARGENT e DAVID, 1983; SAMBROOK et al., 1989; TIMBERLAKE, 2000; ZIMMERMANN et al., 2001).

Para a cultura do algodão existem muitas pesquisas publicadas com o isolamento e caracterização de genes diferencialmente expressos geradas a partir de bibliotecas de cDNA. Coutinho et al. (2005) isolaram alguns clones de cDNA de fibras de algodão, os quais compreendem um grupo de enzimas de grande importância nos processos de biosíntese e remodelagem de polímeros de carboidratos da parede celular. Barbosa et al. (2009), visando estudar os mecanismos envolvidos na resistência de dois genótipos de algodão ao nematóide *Meloidogyne incognita*, construíram bibliotecas de ESTs de raiz. Tais estudos identificaram genes relacionados ao sinal de defesa e reconhecimento do patógeno.

Utilizando essas ferramentas torna-se possível comparar padrões de expressão gênica entre diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento, estudar as respostas celulares a diferentes condições fisiológicas e exposições ao ambiente, descobrir relações funcionais entre genes e proteína, e identificar genes de interesse para melhoramento genético.

1.4.1. Genes envolvidos no desenvolvimento do botão floral

Estudos envolvendo a identificação e caracterização de muitos genes associados ao botão floral vem possibilitando consideráveis descobertas de suas ações sobre o desenvolvimento meristemático e identidade dos órgãos florais. Tais estudos partiram principalmente de análises de mutantes em *Arabidopsis thaliana* (GEORGIADY, et al., 2002). Com isso o desenvolvimento das flores passou a ser compreendido como um processo que envolve múltiplas etapas, incluindo a indução e transição para um meristema apical reprodutivo, por meio da verificação dos sinais exógenos e endógenos;

o estabelecimento de identidade dos órgãos, seguido pela identificação das estruturas florais (ZIK et al., 2003). Dentre os fatores externos conhecidos até o momento e que influenciam esse processo, estão fotoperíodo, qualidade de luz (composição do espectro), vernalização (exposição a longos períodos de frio), temperatura ambiental, quantidade de água e nutrientes. Quanto aos fatores endógenos participantes dessa regulação, podem-se citar fatores hormonais, metabólitos, o estado nutricional, dentre outros (LEVY e DEAN, 1998; MOURADOV et al., 2002; WILLMANN e POETHIG, 2005).

O algodoeiro é uma das espécies vegetais, juntamente com *A. thaliana*, para a qual existem bancos de dados de ESTs oriundos do sequenciamento em larga escala de diversas bibliotecas de cDNA, sintetizadas a partir de diferentes tecidos e estádios fisiológicos da planta. Na Tabela 1 encontram-se alguns dos genes que codificam proteínas relacionadas com o botão floral em *A. thaliana* e *G. hirsutum*.

Vários genes têm sido identificados a partir da construção de bibliotecas de ESTs de algodoeiro, cuja expressão está restrita a bibliotecas de flores ou óvulos, como os genes da *pectina metilesterase*, que está envolvida nos processos de modificação de parede celular durante o desenvolvimento do pólen e o gene da *mio-inositol oxigenase* que está envolvida na síntese de precursores de matrix extracelular em flores (ARTICO et al., 2008).

Batista et al. (2009), por meio de análise *in silico*, verificaram a existência de várias ESTs potencialmente envolvidas em funções importantes dentro de processos bioquímicos, morfológicos e estruturais do botão floral do algodoeiro, tais como: regulação positiva do desenvolvimento da flor, regulação negativa do desenvolvimento da flor, morfogênese da flor e do fruto, detecção e transporte de íons na célula e regulação da fase vegetativa.

Outros estudos mostraram que os genes *MADS-box* estão envolvidos em vários aspectos da diferenciação dos tecidos vegetais e são essenciais para o desenvolvimento floral do algodoeiro, controlando diversos processos. Esses genes controlam o crescimento generativo e determina o meristema do botão floral, alguns deles estão presentes também em pólen. Durante o desenvolvimento floral, genes *MADS-box* (*AGAMOUS*; *APETALA1*; *APETALA3*; *PISTILATTA*; *SEPALLATA3*; *SEPALLATA4*) são essenciais tanto para a identidade como para os eventos tardios do desenvolvimento dos quatro verticilos florais (NARDELI et al., 2008; LIMA et al., 2009).

Tabela 1. Genes relacionados ao botão floral de *Gossypium hirsutum* (algodoeiro) e *Arabidopsis thaliana*

Gene	Função	Espécie	Processo Biológico	Fonte
<i>BOP2</i>	Ligante protéico	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Morfogênese da flor e abscisão do órgão floral	MCKIM et al., 2008
<i>CDKC2</i>	Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Desenvolvimento da flor, carpelo e folha	CUI et al., 2007
<i>HEN1</i>	RNA metiltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Regulação do desenvolvimento da flor, formação da pétala	SUZUKI et al., 2002
<i>ROXY1</i>	Intermedia a troca de tiol-disulfite	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Desenvolvimento da antera e pétala	XING et al., 2005
<i>ATX1</i>	Ligante protéico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Especificação da identidade do órgão floral	VENEGAS et al., 2003
<i>GhEX1</i>	Ligante protéico	<i>Gossypium hirsutum</i>	Alongamento da fibra	ORFORD, et al., 1998
<i>GhTUB1</i>	Ligante protéico	<i>Gossypium hirsutum</i>	Alongamento da fibra	LI, et al., 2002
<i>SRS</i>	Aminoacilação de tRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desenvolvimento do óvulo	BERG, et al., 2005
<i>TOPIALP HA</i>	Ligante protéico	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Morfogênese da flor	TAKAHASHI, et al., 2002
<i>OVA1</i>	Ligante de ATP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desenvolvimento do óvulo	BERG, et al., 2005

O presente trabalho teve por objetivo prospectar genes regulatórios e estruturais no botão floral do algodoeiro para posterior identificação das sequências regulatórias *upstream* tecido específica visando seu uso nos trabalhos de transgenia para resistência a pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York, 1116p,2002.

ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; ALVES-FERREIRA, M. Desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle do bicudo-do-algodoeiro: Identificação de gene expressos exclusivamente em tecidos florais para clonagem e caracterização preliminar de promotores específicos de flor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54º, 2008, Salvador. **Simpósio Brasileiro de Genética**. Disponível em < <http://www.sbg.org.br> - ISBN 978-85-89109-06-2 >. Acesso em: 15 Dez.2008.

BALLAMINUT, C. Disponível em http://www.algodao.agr.br/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=132. Acesso em: 25 de Ago.2010.

BARBOSA, A. E. A. D.; FRAGOSO, R. R.; SOUZA, D. S. L.;FREIRE, E.; OLIVEIRA NETO, O. B.; VIANA, A. A. B.; TOGAWA, R. C.; GUIMARAES,L. M.; MARTINS, N. F.; CIA, E.; FERNANDEZ, D.; LIMA, L. M.; SILVA, M. C. M.;ROCHA,T. L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne* incógnita. **Plant Science** v. 177, p. 492–497, 2009.

BATISTA, V. G. L.; FRAGOSO, M. F.; BRITO, G. G.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M. Identificação e análise in silico de genes do botão floral do algodoeiro. In: VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR. p. 197 - 201, 2009.

BERG, M.; ROGERS, R.; MURALLA, R.; MEINKE, D. Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 866 – 878, 2005.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n.32, p. 28-37, 2004.

BOLETIM ANUAL DO MERCADO DE GRAOS: ALGODAO – BAMGA – Safra 2009/2010. **DesenBahia**, 2010, 12p.

BORÉM, A.; SANTOS, F.R. A biotecnologia. In: COSTA, N.M.B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição**. São Paulo: Nobel, 2003, 214p.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – Safra 2010/2011**, quinto levantamento – Fevereiro/2011. Brasília: Conab, 2011.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética**: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003, 43 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 86).

CORRÊA, S. T.; COUTO, E. P. **A História do algodão no Brasil e seu desenvolvimento no Estado do Mato Grosso, o atual maior produtor do país.** Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/humanas2003/a_historia.pdf>. Acesso em: 10 Jun. 2008.

COUTINHO, T. C.; LUCENA, W. A.; SCORTECCI, K.C.; VIDAL; M. S. Construção de biblioteca de cDNA de fibras de algodão e análise in silico de um dos clones isolado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005a. CD-ROM

CRAVEN, L.A; STEWART, M.C.D; BROWN, A. H. D.; GRACE, J.P. The Australian wild species of *Gossypium*. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD COTTON RESEARCH CONFERENCE, 1. 1994, Brisbane, Australia. **Challenging the future.** p. 278 – 281, 1994.

CUI, X.; FAN, B.; SCHOLZ, J.; CHEN, Z. Roles of *Arabidopsis* Cyclin-Dependent Kinase C Complexes in Cauliflower Mosaic Virus Infection, Plant Growth, and Development. **Plant Cell.** v. 19, p. 1388-1402, 2007.

DIACHENKO, L.; LAU, Y.F., CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOGADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, D. Repressão Subtrativa Híbrida. **Proc. Natl. Academic Science**, 1996.

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

GEORGIADY, M. S.; WHITKUS, R. W.; LORD, E. M. Genetic analysis of traits distinguishing outcrossing and Self-Pollinating forms of currant tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Mill Genetics.** v.161, p.333-344, 2002.

LEVY, Y. Y.; DEAN, C. The transition to flowering. **The Plant Cell**, v.10, p.1973-1989, 1998.

LI, X. B.; CAI, L.; CHENG, N. H.; LIU, J. W. Molecular characterization of the cotton *GhTUB1* gene that is preferentially expressed in fiber. **Plant Physiology**, v. 130, p. 666-674, 2002.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIMA, L. M.; PINHEIRO, M. P. N.; BATISTA, V. G. L.; SOUZA; C. C. F.; SANTOS, R. C. **Análise in silico do gene MADS isolado a partir de botão floral de algodoeiro.** In: VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR. p. 197 - 201, 2009.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINNECK, E.; PESKE, S. T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p.7-13, 2006.

MCKIM, S. M.; STENVIK, G. E.; BUTENKO, M. A.; KRISTIANSEN, W.; CHO, S. K.; HEPWORTH, S. R.; ALLEN, R. B.; HAUGHN, G. W. The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. **Development**, v. 135, p. 1537-1543, 2008.

MEYERS, B.C.; GALBRAITH, D.W.; NELSON, T.; AGRAWA, V. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. **Plant Physiology**. n. 135, p. 637 – 652, 2004.

MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. **The Plant Cell**, v.14, p.111-130, 2002.

MUNROE, D. J.; LOEBBERT, R.; BRIC, E. et al. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 6, p. 2209 – 2213, 1995.

NARDELI, S.M.; ARTICO, S.; ALVES-FERREIRA, M. Identificação dos Possíveis Genes Ortólogos a Genes MADS-box em *Gossypium hirsutum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54º, 2008, Salvador. **Simpósio Brasileiro de Genética**. Disponível em < <http://www.sbg.org.br> - ISBN 978-85-89109-06-2 >. Acesso em: 15 Dez. 2008.

OLIVEIRA NETO, O. B.; EVANGELISTA, I. B. R.; OLIVEIRA R. S.; VIANA, A. A. B.; PAES N. S.; GROSSI DE SÁ, M. F. Transformação de plantas de algodoeiro via tubo polínico visando o controle de pragas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005a. CD-ROM.

ORFORD, S. J.; TIMMIS, J. N. Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibres. **Elsevier Science B.V.** v. 1398, n. 3, p. 342-346, 1998.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846. 2002.

PASSOS, G.A.S.; NGUYEN C.; JORDAN, B. Projeto Transcriptoma, Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 34-37, 2008.

PASSOS, S.M.G. **Algodão**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1977. 424p.

PENNA, J.C.V. Hibridação em Algodão. In: BOREM, A. (Ed.). **Hibridação Artificial de Plantas**. Viçosa: UFV. p.63-81, 1999.

PORTAL AGRONOTÍCIAS. **Algodão adensado ganha espaço em Mato Grosso**. Disponível em <http://www.portaldagronegocio.com.br/conteudo.php?id=31377>. Acesso em: 20 de Ago.2010

PORTAL DA CIÊNCIA. Diagrama das bibliotecas do cDNA de como gerá-los. Disponível em <http://www.molecularstation.com/pt/dna/cdna-library/>. Acesso em: Set.2010

REBRIKOV, D. V.; BRITANOVA, O. V.; GURSKAYA, N. G.; LUKYANOV, K. A.; TARABYKIN, V. S.; LUKYANOV, S. A. Mirror seleção orientação (MOS) - um método para a eliminação de falsos positivos clones de bibliotecas geradas por hibridização subtrativa por supressão. **Nucleic Acid Research**.v. 28, 2000.

REIS, E. M.; SILVA e SILVA, A. M.; CORRÊA, G. C. Proteômica: uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.2, n.2, p.1-10, 2007.

RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. Chasing the dream: plant EST microarrays. **Curr Opin Plant Biology**. v. 3, n. 108, 16p. 2000

ROBERTSON, D.G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological Sciences**, v. 85, p. 809 – 822, 2005.

ROCHFORD, S. Metabolomics Reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n.12, p. 1813-1820, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARGENT, T. D.; DAVID, I. B. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. **Science**, v.222, p. 135-139, 1983.

SCHAFFER, R.; LANDGRAF, J.; PEREZ-AMADOR, M.; WISMAN, E. Monitoring genome-wide expression in plants. *Curr Opin Biotechnology*, 2000.

SONG, P.; ALLEN, R. D. Identification of a cotton fiber-specific acyl carrier protein cDNA by differential display. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1351, p. 305-312, 1997.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.B. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 640p, 2005.

SUZUKI, M; TAKAHASHI, T; KOMEDA, Y. Formation of Corymb-like Inflorescences Due to Delay in Bolting and Flower Development. **Plant and Cell Physiology**. v. 43, n. 3, p. 298-306, 2002.

TAKAHASHI, T.; MATSUHARA, S.; ABE, M.; KOMEDA, Y. Disruption of a DNA topoisomerase I gene affects morphogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 14, n. 9, p. 2085–2093, 2002.

TIMBERLAKE, W. E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v. 78,p. 497-510, 2000.

TYERS, M., MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, p.193-197, 2003.

VENEGAS, R.; PIEN, S.; SADDER, M.; WITMER, X.; GROSSNIKLAUS, U.; AVRAMOVA, Z. ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, Activates flower homeotic genes. **Elsevier Science B.V.** v. 13, n. 8, p. 627-637,2003.

WATSON, J. D. **O DNA recombinante**. Ouro Preto,470p.1997.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WILLMANN, M. R.; POETHIG, R. S. Time to grow up: the temporal role of smallRNAs in plants. **Plant Biology**, v.8, p.548-552, 2005.

XING,S.; ROSSO, M. G.; ZACHGO, S. ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. **Development**. v. 132, p. 1555-1565,2005.

YATES, J.R. Mass spectrometry and the age of the proteome. **Journal. Mass Spectrom.** v.33, p.1-19, 1998.

ZACHARIAH, G.G.; DHANASEKARAN, N. The Microrevolution: Applications and Impacts of Microarray Technology on Molecular Biology and Medicine. **International Journal of Molecular Medicine**, v.13, p. 483-495, 2004.

ZHANG, C.X.; WANG, W.Q.; JIANG, X.N.; CHEN, X.M. Review on plant gene promoters. **Acta Genetica Cinica**, v. 31, n. 12, p. 1455-1464, 2004.

ZIK, M.; IRISH, V. F. FLOWER DEVELOPMENT: Initiation, differentiation, and diversification. **Cell Development Biology**, v.19, p.119-140, 2003.

ZIMMERMANN, C. R.; ORR, W. C.; LECLERC, R. F.; BARNARD, E. C.; TIMBERLAKE, W. E. Molecular cloning and selection of genes regulated in Aspergillus development. **Cell**, v. 21, p. 709-715, 2001.

CAPÍTULO II

Genes expressos em botão floral isolados a partir de biblioteca subtrativa de *Gossypium hirsutum*

Manuscrito enviado à revista:

Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)

Genes expressos em botão floral isolados a partir de biblioteca subtrativa de *Gossypium hirsutum*

Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro ⁽¹⁾; Péricles de Albuquerque Melo Filho ⁽³⁾; Roseane Cavalcanti dos Santos ⁽¹⁾; Natália Florencio Martins ⁽²⁾; Vandr  Guevara Lyra Batista ⁽¹⁾ e Liziane Maria de Lima ⁽¹⁾

(1) Embrapa Algodão, Caixa Postal 174, CEP 58428-095 Campina Grande, PB, Brazil. E-mail: morgannapollynne@yahoo.com.br, guevara@gmail.com.br, caval@cpa.embrapa.br, liziane@cpa.embrapa.br (2) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB - Parque Estac o Biológica, W5 Norte Final, Brasília-DF 70770-900, Brazil. natalia@cenargen.embrapa.br (3) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dep. de Agronomia, Rua D. Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE. E-mail: pericles@depa.ufrpe.br

Resumo - Com o advento da biotecnologia e a manipula o genética do algodoeiro por transgênese, um novo arsenal de estratégias de protec o contra pragas foi disponibilizado. Uma ferramenta importante para esta estratégia   a prospec o de genes. Neste trabalho construiu-se uma biblioteca subtrativa de cDNA de botão floral de algodoeiro da variedade BRS 8H. Após o sequenciamento foram gerados 768 sequências, compreendendo 168 agrupamentos, sendo 126 singlets e 42 contigs. Para as análises in silico foram utilizados o banco de dados do algodão (Cottondb), como também o de *Arabiposis thaliana* (TAIR) visto que muitos genes identificados em algodão não estão estudados funcionalmente, mas apresentam homologia com genes de outras espécies. Estudos de RT-PCR semiquantitativo mostraram que os seis genes selecionados (*ANTIFIB010*, *ASH*, *OVU*, *FIB010*, *FIBEARLY* e *GLUCANASE*) a partir da biblioteca subtrativa de cDNA são expressos nos diferentes tipos de tecidos estudados, raiz, haste e folha, porém no botão floral apresentam um perfil de expressão mais acentuado. Tais genes estão relacionados ao desenvolvimento grãos de pólen, tubo polínico, óvulos e fibras.

Termos para indexa o – Algodão, prospec o de genes, transcriptoma, RT-PCR

Abstract - With the advent of biotechnology and genetic manipulation of transgenic cotton, a new strategies arsenal for protection against pests became available. An important tool for this strategy is the prospecting genes. We constructed a subtractive cDNA library from flower buds of cotton BRS 8H order select specific genes. After sequencing were generated 768 sequences, comprising 168 clusters, with 42 contigs and 126 singlets. In silico analysis were used the cotton database (Cottondb) as well as of *Arabiposis thaliana* (TAIR) since many genes identified in cotton are not functionally studied, but show homology with genes from other species. Semiquantitative RT-PCR assays were performed with the six selected genes (*ANTIFIB010*, *ASH*, *OVU*, *FIB010*, *FIBEARLY* and *GLUCANASE*) from the subtractive cDNA library are expressed in root, stem and leaf, but the button floral have a more pronounced profile of expression. These genes are related to development of pollen grains, pollen tube, ovules and fibers.

Index terms: Cotton, genes prospect, transcriptome, RT-PCR

Introdução

O algodão tem-se destacado na agricultura brasileira por sua importância econômica e social. Isso coloca o algodão como uma das principais *commodities* nacionais, colocando o País como o quinto maior produtor e o quarto maior exportador. Em 2011, o Brasil alcança uma das maiores áreas cultivadas com algodão nos últimos 10 anos (1.304,7 mil ha), crescimento de 56,1% de área plantada em comparação a safra anterior. A produtividade média do algodão em caroço deverá alcançar 3.825 kg/ha (acréscimo de 5,3%) e 1.950,2 mil toneladas de pluma (acréscimo de 63,3%) (Boletim Anual do Mercado de Grão, 2010; Conab, 2011).

Esta cultura requer altos custos na sua produção, cerca de 40%, são destinados apenas com maquinários e no controle de pragas e doenças. A planta de algodão é susceptível ao ataque de diversas pragas que durante o ciclo da cultura causam prejuízo direto ao volume da safra e conseqüentemente a comercialização as fibra do algodão, o que torna constantemente necessária a busca por novas tecnologias (Tomquelski, 2009).

A transformação genética pode contribuir substancialmente para o melhoramento do algodoeiro, permitindo à introdução de genes que contribuam para o aumento da produtividade e estabilidade da produção, além de resistência a fatores bióticos e abióticos (resistência à praga, tolerância a herbicida, resistência à seca, frio) (Gatehouse & Gatehouse, 2000).

Com o desenvolvimento da tecnologia genômica tem-se gerado muitas informações e criado bancos de dados de sequências de DNA e/ou cDNA, as quais constituem ferramentas importantes na busca rápida e na seleção de genes potenciais de importância agrônômica (Avarenga et al., 2007).

O algodoeiro é uma das espécies vegetais, juntamente com *Arabidopsis thaliana*, para a qual existem bancos de dados de ESTs, sintetizadas a partir de diferentes tecidos

e estádios fisiológicos da planta. O Cotton Genome Database (CottonDB) e *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) são bancos de dados específico do algodão (*Gossypium* spp.) e *A. thaliana* respectivamente, ao qual constituem uma ferramenta importante na busca rápida e na seleção de genes potenciais de importância agronômica.

Para a cultura do algodão vários genes já se encontram caracterizados funcionalmente e depositados no CottonDB. Em muitos desses genes, a expressão está restrita a flores ou óvulos, como os genes da *pectina metilesterase*, envolvido nos processos de modificação de parede celular durante o desenvolvimento do pólen e o gene da *mio-inositol oxigenase* envolvido na síntese de precursores de matriz extracelular em flores (Artico et al., 2008).

Tais genes, frequentemente regulados por promotores de expressão constitutiva (CaMV35S - vírus do mosaico da couve-flor; EF1 α - Fator de Elongação Ribossômica) oferecem proteção em toda a planta, embora os níveis de expressão sejam diferenciados no aspecto tissular (Zhang et al., 2004). Em algodão, por exemplo, a expressão é alta em folhas, porém em botão floral o nível de expressão é baixo. Por isso, há necessidade de isolar promotores que se expressem nas partes aéreas do algodoeiro, principalmente nos botões florais e maçãs, órgãos da planta que são atacados pelas pragas. Com isso, uso de promotores tecido-específico para guiar a sequência codante possibilitará ação mais direta de proteção e menor gasto de energia da planta para promover a proteína alvo.

Neste contexto, uma biblioteca subtrativa de cDNA foi construída, a fim de prospectar genes regulatórios e estruturais no botão floral do algodoeiro para posterior identificação das sequências regulatórias *upstream* tecido específica visando seu uso nos trabalhos de transgenia para resistência a pragas.

Material e Métodos

Material vegetal

Sementes da cultivar precoce CNPA 8H foram cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo natural, na Embrapa Algodão, em Campina Grande - PB, Brasil. Os tecidos utilizados foram: botões florais, folhas, hastes e raízes. Os botões florais foram coletados nos seguintes tamanhos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mm de comprimento, cujos principais eventos fisiológicos encontram-se na Tabela 1. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extração do RNA.

Tabela 1. Principais eventos biológicos relacionados ao estágio de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro

Diâmetro (mm)	Evento
2	Fomação das células-mãe do pólen (PCM) na antera
4	PCMs em prófase e células do tapetum da antera em diferenciação
6-8	Micrósporos unicelulares encontrados nos lóculos
10	Início da degeneração do tapetum
12	Divisões mitóticas no pólen e degeneração do tapeum
14	Grânulos de pólen binucleados
16	Saco embrionário com dois núcleos
18 - 20	Sacos embrionários completos

Fonte: QUINTANILHA et al.(1962)

Extração de RNA total e construção da biblioteca de cDNA

Amostras de 100 mg dos diferentes tecidos foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de um cadinho até a obtenção de um pó fino. O RNA total foi extraído utilizando o Invisorb Spin Plant RNA Mini kit (Invitec), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em

gel de agarose 0.8% e a concentração e pureza por espectrofotometria. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total utilizando o Kit Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, uma biblioteca subtrativa de cDNA foi construída utilizando o kit PCR Select cDNA Subtraction (Clontech) e o vetor pGEMT-Easy (Promega) explorando o sítio múltiplo de clonagem, de acordo com as recomendações do fabricante.

Clonagem e sequenciamento

A biblioteca foi clonada em *Escherichia coli* linhagem XL1-blue, por eletroporação (Lima, 2005). Em seguida, as células foram recuperadas com meio LB líquido (Luria-Bertani) (peptona de caseína, extrato de levedura e cloreto de sódio, 1:0,5:1 (p/p/p), pH 7,0) por 1 hora sob agitação de 250 rpm e plaqueadas em meio LB sólido (LB líquido + ágar 1,6% contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas overnight a 37°C. Os plasmídeos foram preparados em placas de 96 poços de acordo com o protocolo descrito por Borges Neto et al. (2005). Os insertos de cDNA foram sequenciados usando os oligonucleotídeos iniciadores SP6 e T7 no sequenciador automático (Applied Biosystems model 3700), na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Clusterização e análise in silico das sequências

As sequências geradas foram depositadas no Sistema Genoma (SISGEN) do laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://genoma.embrapa.br>). A análise da qualidade das sequências foi realizada utilizando o programa PHRED (Ewing et al., 1998) e as sequências foram reunidas em clusters usando o programa TGICL do TIGR (Instituto de Genomic Research), ambos

incorporados no SISGEN. O critério de aceitação da sequência no sistema foi de um mínimo de valor no Phred igual a 20 e uma extensão de 150 bases por leitura (Pappas et al., 2008), seguida da anotação automática com o programa BLASTX 2.2.3 (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997).

Estudo da expressão de genes por RT-PCR semiquantativa

Oligonucleotídeos iniciadores dos genes selecionados com seus respectivos tecidos de expressão: OVU (óvulo), FIB010 (fibra), FIBEARLY (fibra jovem), ASH (óvulo, antera e pólen), ANTIB010 (fibra e antera) e GLUCANASE (fibra) foram determinados a partir das ESTs sequenciadas e depositadas no SISGEN. Como controle endógeno foi utilizado o gene da actina (*β -actina*) (Tabela 2). A reação de transcriptase reversa foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total, utilizando o kit IMPROM II (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação de PCR foram utilizados: 2 μ L de cDNA [200 ng]; 2,5 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador forward e reverse [0,2 μ M]; 0,2 μ L de Taq Polimerase [0,04 U/ μ L]; 0,5 μ L de dNTP [0,2 mM]; 1,0 μ L de MgCl₂ [2 mM] e 2,5 μ L de tampão [1X], para um volume final de 25 μ L. As condições das PCRs foram: pré-desnaturação à 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C/1 min, TA por 1 min (TA: temperatura de anelamento) para cada oligonucleotídeo iniciador: FIB010 - 47°C; ASH e ANTIB010 - 52°C; GLUCANASE, OVU - 54°C; FIBEARLY - 55°C; ACTINA - 47°C), extensão à 72°C/2 min, e uma fase final de extensão à 72°C/5 min. Os produtos amplificados (15 μ L) foram misturados com Loading dye (98% formamida; 10mM EDTA; 0,05% xileno cianol) e Sybr Green (LGC) e analisados em gel 0.8% e em seguida fotodocumentados pelo programa Kodak

MI SE (*Molecular Image Software*) . Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100 pb (Invitrogen).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores específicos dos genes para estudos de RT-PCR semiquantitativa

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	TAMANHO (pb)
<i>ANTIFIB010F</i>	5' – GGGGGAGTTGTTCTGAAGAA - 3'	401
<i>ASHF</i>	5' – AGCACTTCAAATCCTGAACCA - 3'	271
<i>OVUF</i>	5' – CCATCCGCAAAGTTTCAACT - 3'	405
<i>FIB010F</i>	5' – GGACCACCATAAGCAGTGG - 3'	304
<i>FIBEARLYF</i>	5' – TTCTTCACTCCGATAGCTCACA - 3'	268
<i>GLUCANASEF</i>	5' – CCGGGGAGCAAAAAGAAGAAG - 3'	532
<i>ACTINF</i>	5' – GATCTGGCATCACACCTTC - 3'	400

Resultados e Discussão

Análises de bibliotecas de cDNA é uma das metodologias mais eficientes para identificar o perfil de expressão de genes em situações biológicas específicas. Após o sequenciamento e montagem, 768 sequências de cDNA foram obtidas, compreendendo 168 agrupamentos, sendo 126 singlets e 42 contigs. A partir da classificação KOG (*Eukaryotic Orthologous Groups*) foi possível agrupar as ESTs em 18 categorias funcionais, destas, cinco categorias foram mais representativas: i) Conversão e produção de energia (5 ESTs/clusters); ii) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (5 ESTs/clusters); iii) Modificação pós-traducional, proteínas chaperonas (9 ESTs/clusters); iv) Predição de função geral (7 ESTs/clusters); v) Proteínas com função desconhecida (4 ESTs/clusters) (Figura 1).

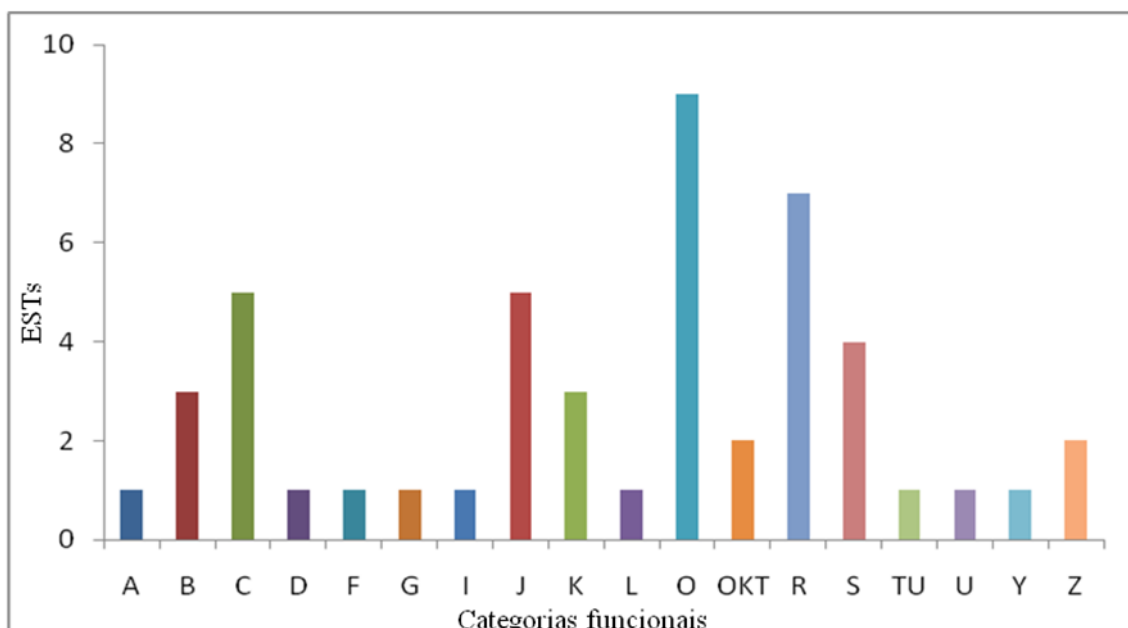


Figura 1. Frequência das 18 categorias funcionais identificadas a partir do banco de dados de proteínas funcionais (KOG - *Eukaryotic Orthologous Groups*). **(A)** Modificação e processamento de RNA; **(B)** Estrutura e dinâmica da cromatina; **(C)** Produção de energia e conversão; **(D)** Controle do ciclo celular, divisão celular, compartimentalização de cromossomos; **(F)** Transporte de nucleotídeo e metabolismo; **(G)** Transporte de carboidrato e metabolismo; **(I)** Transporte de lipídeo e metabolismo; **(J)** Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; **(K)** Transcrição; **(L)** Replicação, recombinação e reparo; **(O)** Modificação pós-traducional, proteínas chaperonas; **(R)** Predição de função geral; **(S)** Função desconhecida; **(T)** Mecanismo de tradução de sinal; **(U)** Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; **(Y)** Estrutura nuclear; **(Z)** Citoesqueleto.

Iqbal et al. (2008) isolaram e caracterizaram genes que atuam no metabolismo secundário, sendo expressos no desenvolvimento das fibras de algodão na fase inicial de 0-5 dias pós antese (dpa). Tais genes são associados à categoria de conversão e produção de energia. Genes com funções associadas à tradução, estrutura ribossomal e biogênese já foram descritos por Taliércio e Boykin (2007), mostrando que os constituintes estruturais dos ribossomos (ribonucleoproteínas), têm um papel importante no desenvolvimento inicial das fibras de algodão, mais especificamente no período de 0-10 dpa. Em relação à categoria modificação pós-traducional, proteínas chaperonas,

Zhao et al. (2009) mostraram que tais proteínas estão envolvidas na fase de alongamentos das fibras de algodão.

A partir dos dados obtidos com a biblioteca subtrativa foi possível determinar o Índice de Sucesso (IS) da biblioteca, em torno de 67%, bem como o Índice de Novidade (IN), com 51%. Resultados similares foram descritos a partir de uma biblioteca subtrativa de cDNA de raízes de cana-de-açúcar, onde se obteve um IS em torno de 63% e o IN de 87% (Takahashi, 2005).

As análises nos bancos de dados do algodão e de *A. thaliana*, mostraram homologia entre alguns contigs (Tabela 3). Os CL2Contig2 e CL28Contig1, para *G. hirsutum*, refere-se a fibra de 0-10 e de 1-3 dpa, respectivamente. No entanto, em *A. thaliana*, as funções destes genes já foram estudadas a partir do perfil transcriptômico de diferentes estádios de desenvolvimento do pólen (Trionnaire et al., 2009), sugerindo que estes genes estão relacionados a mecanismos moleculares que regulam a formação dos grãos de pólen. Outros estudos demonstraram que estes mesmos genes são necessários para o desenvolvimento das células arqueosporais e, conseqüentemente, para o desenvolvimento das células mãe do micrósporo, aos quais fazem parte da cascata central do desenvolvimento floral, induzindo a esporogênese até chegar o processo final da gametogênese (Ito et al., 2004). Tais genes são homólogos aos genes que estão associados à machoesterilidade, ou seja, são fundamentais para o desenvolvimento normal da antera e a sua ausência ou má função inviabiliza a formação de grãos de pólen viáveis, tais como: *TAPETUM DETERMINANTI* (Yang et al., 2003), *ABORTED MICROSPORES* (Sorensen et al., 2003) e *MALE STERILE1* (Wilson et al., 2001).

O contig CL13Contig1 foi identificado para *G. hirsutum*, como sendo um gene relacionado a óvulos e fibras. Em *A. thaliana*, este gene participa do processo

metabólico da beta galactosidase, enzima relacionada ao metabolismo de carboidratos da parede celular vegetal e a expansão celular (Oliveira Júnior, 2004) (Tabela 3). De acordo com Pauly et al. (2001) esta enzima exerce, de alguma forma, sinalização sobre os eventos bioquímicos que ocorrem na parede celular durante o desenvolvimento vegetal. Gantulga et al. (2008) isolaram e caracterizaram os genes *At1g45130* e *At3g52840* em *A.thaliana* que codificam as isoenzimas beta-galactosidase Gal-5 e Gal-2, pertencentes à família Glicosil Hidrolase 35 (GH 35), envolvidas na modificação de polissacarídeos da parede celular, expressos principalmente em folhas, caule e flores.

O CL24Contig1 refere-se a fibra de 0-10 dpa para *G. hirsutum*, entretanto em *A. thaliana* este gene já teve sua função estudada, tendo sido identificado como um Fator de Despolimerização da Actina (ADFs), proteínas de ligação que regulam a dinâmica da actina nas células (Cheung et al., 2002) (Tabela 3). Actina é uma proteína, que compreende uma rede dinâmica de polímeros presentes em todas as células eucarióticas, conhecido como o citoesqueleto de actina, ao qual é modulada por uma grande quantidade de proteínas que estão associadas a funções moleculares, tais como: deposição de celulose para permitir crescimento da parede celular primária e crescimento do tubo polínico (Cheung et al., 2010). Chen et al. colaboradores (2002), estudando plantas de tabaco in vitro, demonstrou que estas proteínas são fundamentais para o crescimento de tubo polínico e pistilo.

O contig CL23Contig1 em *G. hirsutum* está relacionado a uma biblioteca de óvulos de algodão, enquanto que em *A. thaliana* o gene caracteriza-se por ser um inibidor de *Pectinesterase* (Tabela 3). Esta enzima pertence ao grupo das pectinases, atuando na degradação de moléculas de pectina. A pectina é um dos principais constituintes da parede celular vegetal, ao qual está associada a várias funções biológicas importantes como determinar a forma e as taxas de crescimento celular

(Jiang et al., 2005; Uenojo & Pastore, 2007). Estudos da expressão da pectinesterase em *A. thaliana* mostraram que essa enzima pode influenciar vários processos fisiológicos, tais como, extensão da parede celular durante a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico (Jiang et al., 2005). Ao investigar conteúdos pécnicos em grãos de pólen de mutantes em *Eucalyptus grandis* e *A. thaliana*, Lopes (2008) mostrou que a redução dos compostos pécnicos inviabiliza os grãos de pólen, e que o gene *UER1*, que codifica uma enzima bifuncional (3,5-epimerase e 4- ceto redutase), é requerido para o desenvolvimento normal dos grãos de pólen.

O CL1Contig2 refere-se a fibras no banco de dados do algodão, no entanto em *A. thaliana* este gene desempenha o papel de desintoxicação ao processo catabólico metilglioxal (Tabela 3), através do sistema glyoxalase mediado pelas enzimas glyoxalase I (GLY1) e II (GLY2), e controla a diferenciação e proliferação celular (MUSTAFIZ et al., 2010). Quan et al. (2010), estudando plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e arroz (*Oryza sativa*), verificaram que a via glyoxalase também atua sob estresses abióticos, especificamente aumentando a tolerância à salinidade.

Embora muitos genes tenham sido estudados quanto a sua funcionalidade, existem outros cuja função não foi ainda definida, como por exemplo, os contigs: CL19Contig1 relacionado a óvulos imaturos de -3 a 3 dias pós antese, com ou sem fibra; CL7Contig1 relacionado a fibra; CL3Contig1 e CL3Contig2 relacionado a fibra e óvulo (Tabela 3).

Tabela 3. Genes identificados a partir da biblioteca de cDNA de botão floral de algodoeiro.

Contig	Nº de Reads	Anotação	Organismo Homólogo	E-value
CL2Contig2	12	Fibra de 0-10 dpa	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0
		Maturação do pólen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-15

CL1Contig2	8	Fibra de 7-10 dpa	<i>Gossypium hirsutum</i>	e-148
		Processo catabólico metilglioxal de D-lactato	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-13
CL7Contig1	4	Biblioteca de fibra	<i>Gossypium hirsutum</i>	5e-34
		Proteína desconhecida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	e-47
CL13Contig1	3	Óvulo e Fibra	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0
		Processo metabólico carboidrato (<i>beta galactosidase</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-07
CL24Contig1	2	Fibra de 0-10 dpa	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0
		Fator de despolimerização de actina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-61
CL231	2	Biblioteca de Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0
		Inibidor da <i>Pectinesterase</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e-41
CL19Contig1	2	Óvulos imaturos de -3 a 3 dpa, com ou sem fibra	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0
		Proteína desconhecida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-13
CL3Contig1	2	Fibra e óvulo	<i>Gossypium hirsutum</i>	4e-156
		Proteína desconhecida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6e-9
CL3Contig2	2	Fibra e óvulo	<i>Gossypium hirsutum</i>	e-158
		Proteína desconhecida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6e-9
CL28Contig1	2	Fibra 1-3 dpa	<i>Gossypium hirsutum</i>	6e-99
		Maturação do pólen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	e-68

A partir dos resultados obtidos pela RT-PCR semiquantitativa foi possível observar a expressão gênica do *ANTIFIB1010* de maneira mais expressiva no botão floral, em relação à haste e folha, amplificando na altura esperada de 401 pb (Figura 2A). Este gene corresponde ao período de iniciação do desenvolvimento da fibra e uma das fases de alongamento (0-10 dpa) (Lee, 2007). Este gene tem homologia com genes da classe TUB (*β-tubulina*). Estudos realizados nas culturas do arroz (*O. sativa*) (Yoshikawa et al., 2003), milho (*Zea mays*) (Villemur et al., 1994), e *A. thaliana* (LIU et al., 1994), mostraram que a classe desses genes desempenha um papel importante na morfologia das células das plantas bem como no seu desenvolvimento vegetativo.

Para o gene *ASH*, foi observado um perfil de transcrição em todos os tecidos analisados, porém uma maior expressão foi observada em botão floral e folha, no entanto a banda específica do gene amplificou na altura esperada de 271 pb apenas no botão floral (Figura 2B). Estudos em *A. thaliana* sugerem que as proteínas pertencentes à classe *ASH* têm propriedades essenciais para determinação da identidade dos órgãos florais, desenvolvimento das anteras e grãos de pólen (Grini et al., 2009).

Para o gene referente a óvulos (*OVU*), os resultados semiquantitativos revelaram um perfil de expressão para todos os tecidos avaliados, no entanto, em botão floral e raiz foi mais expressivo, porém em botão o gene amplificou na altura esperada de 405 pb (Figura 2C). Este gene, em *A. thaliana* está relacionado ao desenvolvimento de óvulos. Sieber et al. (2004) identificaram que o gene *PHABULOSA* (PHB), pertencente à classe de gene homeobox, atua no desenvolvimento inicial dos óvulos. Estudos semelhantes foram realizados com *Petunia hybrida* (Cheng et al., 2000) e *A. thaliana* (Nain et al., 2008) mostrando que os genes *FBP7* e *AGL11*, respectivamente, pertencem a classe dos MADs e estão envolvidos no desenvolvimento dos óvulos.

Os genes *FIB010* e *FIBEARLY* estão envolvidos no início do desenvolvimento das fibras de algodão, do qual participam uma série de proteínas. Os estudos de RT-PCR revelaram um perfil de expressão diferenciada para os dois genes, ou seja, para o gene *FIB010* a expressão ocorreu em botão floral e raiz (Figura 2D). Para o gene *FIBEARLY* a expressão foi mais significativa no botão floral, porém nos demais tecidos também observou-se a sua expressão só que de maneira menos acentuada (Figura 2E), no entanto para os dois genes estudados a amplificação foi na altura esperada apenas em botão floral com 304 pb e 268 pb, respectivamente. As fibras de algodão são células únicas de tricoma que se desenvolvem a partir da diferenciação da epiderme celular do tegumento do óvulo (Song & Allen, 1997). Wang et al. (2004) mostraram que o gene *GaMYB2*, pertencente a classe dos fatores de transcrição MYB é um importante regulador no desenvolvimento dos tricomas em algodão, sendo predominantemente expresso no início do desenvolvimento das fibras. Coutinho et al. (2005) ao analisar o perfil de expressão gênica a partir de uma biblioteca de fibras de algodão identificaram proteínas que estão envolvidas diretamente no desenvolvimento da fibra, como: glicosiltransferase, arabinogalactana (AGP) e a proteína transferidora de lipídeo (LTP), estas atuam na biosíntese da parede celular (Qin et al., 2007). Outros estudos em algodão revelam ainda que a profilina esteja presente na fase de alongamento das fibras (Ji et al., 2003).

Os estudos semiquantitativos para o gene da *GLUCANASE* mostraram que para os tecidos de botão floral, haste e folha o perfil foi semelhante, porém em botão floral foi observado maior expressão, amplificando na altura esperada de 532 pb (Figura 2F). Estudos realizados em algodão mostraram que as β -glucanases possuem várias atividades, das quais algumas são necessárias para a síntese de celulose (β -1,3-glucanase; β -1,4-glucanase) que atuam no desenvolvimento da fibra (Shu et al., 2008), e

outras (exo- β -glucanases) se tornam importantes por contribuir para a regulação da germinação de pólen e crescimento do tubo polínico.

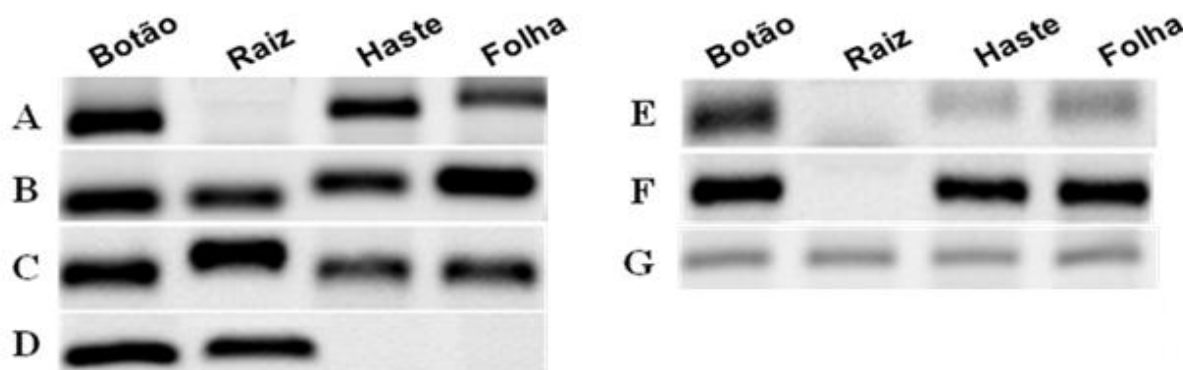


Figura 2. RT-PCR semiquantitativa das ESTs geradas pela biblioteca subtrativa de algodão (*Gossypium hirsutum*): (A) *ANTFIB010* (401 pb); (B) *ASH* (271 pb); (C) *OVU* (405 pb); (D) *FIB010* (304 pb); (E) *FIBEARLY* (268 pb); (F) *GLUCANASE* (532 pb); (G) *ACTINA* (400 pb) – controle constitutivo. Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100pb.

Conclusões

1. Os genes expressos em botão floral, detectados neste trabalho, podem estar envolvidos no desenvolvimento das fibras, nas fases de iniciação e alongamento, óvulos, grãos de pólen e tubo polínico.
2. Este estudo fornece dados sobre vários genes promissores (*ANTFIB010*, *ASH*, *OVU*, *FIB010*, *FIBEARLY*, *GLUCANASE*) que podem ser utilizados na identificação das sequências regulatórias *upstream* tecido específica auxiliando os programas de melhoramento genético do algodão.

Agradecimentos

As Instituições fomentadoras: Capes, Monsanto e Embrapa Algodão

Referências

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, p. 403-410, 1997.

ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; ALVES-FERREIRA, M. Desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle do bicudo-do-algodoeiro: Identificação de gene expressos exclusivamente em tecidos florais para clonagem e caracterização preliminar de promotores específicos de flor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54º, 2008, Salvador. **Simpósio Brasileiro de Genética**. Disponível em < <http://www.sbg.org.br> - ISBN 978-85-89109-06-2 >. Acesso em: 15 Dez.2008.

AVARENGA, S. M., **Caracterização de sequências expressas relacionadas com a resistência a doenças**. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa –MG, 2007.

BOLETIM ANUAL DO MERCADO DE GRAOS: ALGODAO – BAMGA – Safra 2009/2010. **DesenBahia**, 2010, 12p.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – Safra 2010/2011**, quinto levantamento – Fevereiro/2011. Brasília: Conab, 2011.

CHEN, C. Y.; WONG, E. I.; VIDALI, L.; ESTAVILLO, A.; HEPLER, P. K.; WU, H.M.; CHEUNG, A. Y. The Regulation of Actin Organization by Actin-Depolymerizing Factor in Elongating Pollen Tubes. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2175–2190, 2002.

CHENG, X. F.; WITTICH, P.E.; KIEFT, H. ANGENET, G.; XU, H.X.; VAN LAMMEREN, A.A.M. Temporal and spatial expression of MADS box genes, FBP7 and FBP11, during initiation and early development of ovules in wild type and mutant *Petunia* hybrid. **Plant Biology**, v. 2, p. 693, 2000.

CHEUNG, A. Y.; CHEN, C.; GLAVEN, R. H.; GRAAF, B.; VIDALI, L.; HEPLER, P.; WU, H. M. Rab2 GTPase regulates membrane trafficking between endoplasmic reticulum and Golgi and is important to pollen tube growth. **Plant Cell**, v. 14, 945–962, 2002.

CHEUNG, A. Y.; BOAVIDA, L. C.; AGGARWAL, M.; WU, H. FEIJÓ, J. A. The pollen tube journey in the pistil and imaging the *in vivo* process by two-photon microscopy. **Journal Expression Botanic**, v.61, p. 1907-1915, 2010.

COUTINHO, T. C.; LUCENA, W. A.; SCORTECCI, K.C.; VIDAL; M. S. Construção de biblioteca de cDNA de fibras de algodão e análise *in silico* de um dos clones isolado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador. **Algodão, uma**

fibra natural Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005a. CD-ROM

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

GANTULGA, D.; TURAN, Y.; BEVAN D.R.; ESEN, A. The Arabidopsis At1g45130 and At3g52840 genes encode beta-galactosidases with activity toward cell wall polysaccharides. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1661-70, 2008.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Genetic engineering of plants for insect resistance. In: RECHCIGL, J. E., RECHCIGL, N. A. (Ed.). **Biological and biotechnological control of insects pests**. Washington: Lewis Publishers D.C., 2000.

GRINI, P. E.; THORSTENSEN, T.; ALM, V.; BARRENA, G. V.; WINDJU, S. S.; JORSTAD, T. S.; WILSON, Z. A.; AALEN, R. B. The *ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2)* Histone H3 methyltransferase is required for ovule and anther development in Arabidopsis. **Plos One**, v. 4, n. 11, p. 1-15, 2009.

IQBAL, S.; BASHIR, A.; MASOOMA, H. N.; ALVES, M.; MALIK, K. A. Identification of differentially expressed genes in developing cotton fibers (*Gossypium hirsutum* L.) through differential display. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol 11, n. 4, 10p, 2008.

ITO, T.; WELLMER, F.; YU, H.; DAS, P.; ITO, N.; ALVES-FERREIRA, M.; RIECHMANN, J.L.; MEYEROWITZ, E.M. The Arabidopsis homeotic selector protein AGAMOUS controls a gene essential for microsporogenesis. **Nature** v. 460, p. 356-360, 2004.

JI, S.J.; LU, Y.C.; FENG, J.X.; WEI, G.; LI, J.; SHI, Y.H.; FU, Q.; LIU, D.; LUO, J.C.; ZHU, Y.X. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 31, p. 2534-43, 2003.

JIANG, L.; YANG, S.L.; XIE, L.F.; PUAH, C. S.; ZHANG, X.Q.; YANG, W.C.; SUNDARESAN, V.; YE, D. VANGUARD1 Encodes a Pectin Methyltransferase That Enhances Pollen Tube Growth in the Arabidopsis Style and Transmitting Tract. **The Plant Cell**, vol. 17, p. 584-596, 2005.

LEE, J.J.; WOODWARD, A.W.; CHEN, Z.J. Gene expression changes and events in early development of cotton fiber. **Annals of Botany**, v. 100, p.1391-1401, 2007.

LIMA, L.M. **Caracterização molecular e imunológica de anticorpos desenvolvidos contra proteínas de nematóides de galhas de raiz**. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

LIU, B.; JOSHI, H.C.; WILSON, T.J.; SILFLOW, C.D.; PALEVITZ, B.A.; SNUSTAD, D.P. γ -tubulin in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.6, 303p, 1994.

LOPES, F.J.F. **Caracterização funcional de uma Xiloglucano Galactosiltransferase de *Eucalyptus grandis* e uma Ramnose sintase de *Arabidopsis thaliana*: Efeitos sobre a estrutura e composição da parede celular primária.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa – MG, 2008.

MONTOLIU, L.; RIGAU, J.; PUIGDOMÈNECH, P. A set of α -tubulin genes preferentially expressed in root tissue of *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, v.14, p.1-15, 1990.

MUSTAFIZ, A.; SAHOO, K. K.; PAREEK, S.L.S.; SOPORY, S.K. Metabolic Engineering of Glyoxalase pathway for enhancing stress tolerance in plants. **Plant Stress Tolerance: Methods in Molecular Biology**, vol. 639, part. 1, p. 95-118, 2010.

NAIN, V.; VERNA, A.; KUMAR, N.; SHARMA, P.; RAMESH, S.; KUMAR, P. A. Cloning of an ovule specific promoter from *Arabidopsis thaliana* and expression of β -glucuronidase. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 207-211, 2008.

NETO BORGES, C.R.; OLIVEIRA, M.; LABUTO, L.B.D.; CASTRO, A.S.; SOUSA, Z.A.R.; ROCHA, S.M. A Plataforma de genômica funcional utilizada como suporte em programas de inovação biotecnológica. **Comunicado Técnico**, Brasília, DF, n. 121, 14p, 2005.

OLIVEIRA JÚNIOR, F.C. Carboidratos de parede celular e efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento celular de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. cultivada em suspensão. Tese (Doutorado), **Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências, São Paulo, 2004.**

PAPPAS, G.J.JR.; MIRANDA, R.P.; MARTINS N.F.; TOGAWA R.C.; COSTA, M.M.C. SisGen: A CORBA Based Data Management Program for DNA Sequencing Projects **Lecture Notes in Computer Science**, v. 5109, p. 116-123, 2008.

PAULY, M.; QIN, Q.; GREENE, H.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. **Planta**, v.212, p. 842-850, 2001.

QIN, Y.M.; PUJOL, F.M.; HU, C.Y.; FENG, J.X.; KASTANIOTIS, A.J.; HILTUNEN, J.K. Genetic and biochemical studies in yeast reveal that the cotton fibre-specific GhCER6 gene functions in fatty acid elongation. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.473 – 481, 2007.

QUINTANILHA, A.; D'ÊÇA, L.S.; CABRAL, A. **Desenvolvimento do botão floral do algodoeiro em função do tempo.** Instituto do Algodão de Moçambique. Coimbra, 1962. p. 189 – 217.

QUAN, S.; SWITZENBERG R.; REUMANN, S.; HU, J. In vivo subcellular targeting analysis validates a novel peroxisome targeting signal type 2 and the peroxisomal localization of two proteins with putative functions in defense in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, p. 151-153, 2010.

SHU, H.M.; WANG, Y.H.; ZHANG, W.J.; ZHOU, Z.G. Activity Changes of Enzymes Associated with Fiber Development and Relationship with Fiber Specific Strength in Two Cotton Cultivars. **Acta Agronomica Sinica**, v. 34, n. 3, p. 437-446, 2008.

SIEBER, P.; GHEYSELINCK J.; GROSS-HARDT, R.; LAUX, T.; GROSSNIKLAUS, U.; SCHNEITZ, K. Pattern formation during early ovule development in Arabidopsis thaliana. **Developmental Biology**, v. 273, p.321–334, 2004.

SONG, P.; ALLEN, R. D. Identification of a cotton fiber-specific acyl carrier protein cDNA by differential display. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1351, p. 305-312, 1997.

SORENSEN, A.M.; KRÖBER, S.; UNTE, U.K.; HUIJSER, P.; DEKKER, K.; SAEDLER, H. N. The Arabidopsis *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. **The Plant Journal**, v. 33, p. 413-423, 2003.

TAKAHASHI, D. **Análise se sequências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Gomus clarum***. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

TALIERCIO, E. W; BOYKIN, D. Analysis of gene expression in cotton fiber initials. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 22, 2007.

TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência de pragas e custo de produção em algodoeiro geneticamente modificado (Bt) e convencional**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2009.

TRIONNAIRE, G. L.; DOWNTON, R. G.; HAFIDH, S.; SCHMID, R.; DICKINSON, H.; TWELL, D. MicroRNA profiling of *Arabidopsis thaliana* mature pollen. **Plant Molecular**, v.1, p. 1-13, 2009.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 388-394, 2007.

VILLEMUR, R.; HAAS, N.A.; JOYCE, C.M.; SNUSTAD, D.P.; SILFLOW, C.D. Characterization of four genes β -tubulin new and their expression during male flower development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 24, p.295-315, 1994,

WANG, S.; WEIWANG, J.; YU, N.; LI, C.H.; LUO, B.; GOU, J.Y.; JIANWANG, L.; CHEN, X.Y. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2323–2334, 2004.

WILSON, Z.A.; MORROLL, S.M.; DAWSON, J.; SWARUP, R.; GHE, P.J. The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1 (MS1)* gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. **Plant Journal**, v. 28, p. 27-39, 2001.

YANG, S.L.; XIE, L.F.; MAO, H.Z.; PUAH, C.S.; YANG, W.C.; JIANG, L.; SUNDARESAN, V.; YE, D. *TAPETUM DETERMINANT 1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. **The Plant Cell**, v. 15, p. 2792-2804, 2003.

YOSHIKAWA, M.; YANG, G.; KAWAGUCHI, K., S. Expression and analysis of β -tubulin genes in rice. **Plant Cell**, v.44, p.1202-1207, 2003.

ZHAO, P. M.; HAN, L. B.; WANG, J.; YAO, Y.; WANG, H. Y.; DU, X. M.; MING LUO, Y.; XIA, G.X. Proteomic Identification of Differentially Expressed Proteins in the *Ligon lintless* Mutant of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal Proteome Research**, v.9, p. 1076-1087, 2009.