

**ANÁLISE PARCIAL *IN SILICO* DA ESTRUTURA DA REGIÃO 5'  
FLANQUEADORA DO GENE *ASH* EXPRESSO EM BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO**

**MILENA SILVA PORTO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE – PB  
MARÇO DE 2013**

**ANÁLISE PARCIAL *IN SILICO* DA ESTRUTURA DA REGIÃO 5'  
FLANQUEADORA DO GENE *ASH* EXPRESSO EM BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO**

**MILENA SILVA PORTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liziane Maria de Lima**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Cavalcanti dos Santos**

**CAMPINA GRANDE – PB  
MARÇO DE 2013**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

P853a

Porto, Milena Silva.

Análise parcial *in silico* da estrutura da região 5' flanqueadora do gene *ASH* expresso em botão floral de algodoeiro. [manuscrito] / Milena Silva Porto. – 2013.

61 f. : il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa”

“Coorientadora: Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa”

1. *Gossypium hirsutum*. 2. Elementos *cis* regulatórios. 3. Promotor tecido específico. I. Título.

21. ed. CDD 581.3

**ANÁLISE PARCIAL *IN SILICO* DA ESTRUTURA DA REGIÃO 5'  
FLANQUEADORA DO GENE *ASH* EXPRESSO EM BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO**

**MILENA SILVA PORTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

**Aprovada em 20 de Março de 2013**

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Ana Heloneida de Araújo Moraes (D. Sc., Biologia Molecular) – UFRN, examinadora externa

---

Prof<sup>º</sup>. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (Ph.D., Biologia Molecular) – UEPB, examinador interno

---

Prof<sup>ª</sup>. Roseane Cavalcanti dos Santos (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão (Coorientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão (Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele não teria saúde e força para seguir meu caminho, que sempre me deu coragem e perseverança para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais e irmãos que me deram todo o apoio e força em meus estudos, para que nunca desistisse dos meus sonhos.

À minha orientadora Liziane Maria de Lima, que me recebeu com muito carinho na sua equipe e que me orgulho muito em fazer parte, por seus conselhos, ensinamentos e “brincas”, por sua confiança e paciência. Serei sempre grata por tudo!

À minha coorientadora Roseane Cavalcanti pela coorientação e pelo seu carinho para comigo.

Ao meu noivo e companheiro de laboratório Vandrê Guevara Lyra Batista que sempre esteve ao meu lado, pelo seu apoio, força, conselhos nas horas que mais precisei. Pelos seus ensinamentos, pois muito aprendi com ele. Por fazer parte da minha vida!

À minha amiga e companheira de laboratório Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro, que sempre esteve do meu lado na bancada, por seus ensinamentos, amizade, por nunca ter negado ajuda quando mais precisei, pela força nessa minha jornada. Nunca esquecerei a sua amizade!!

À Patrícia de Lima Martins, minha amiga de mestrado e de laboratório, pelas conversas, conselhos, desabafos, pelas horas felizes e tristes. Levarei sua amizade para toda vida!

Às minhas amigas de laboratório e de toda vida Geisenilma Maria Gonçalves da Rocha, Evelive Araújo, Gessica Laize, Valeska Silva, Aline Oliveira, pelos bons momentos que passamos e ajudas. Adoro vocês!!!

Aos técnicos de laboratório Antônio Arroxelas e Fábria Suelly, pela ajuda e convívio diário.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente a Taíza Soares, Gerckson Maciel.

À Universidade Estadual da Paraíba, pela formação de mestre.

À Embrapa Algodão, pelo suporte financeiro da pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciências Agrárias da UEPB pela contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Objetivo Geral.....	14
1.2. Objetivos Específicos.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Aspectos gerais da cultura do algodão.....	15
2.2. Biologia floral do algodoeiro.....	16
2.3. Genes expressos em botão floral.....	18
2.4. Regulação da transcrição em eucariontes.....	21
2.5. Promotores em eucariontes.....	22
2.6. Tipos de promotores que regulam a expressão gênica.....	25
2.6.1. Promotores constitutivos.....	25
2.6.2. Promotores específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Análise de expressão do gene <i>ASH</i> por PCR em tempo real.....	29
3.1.1. Material vegetal utilizado para análise de expressão gênica.....	29
3.1.2. Extração de RNA.....	29
3.1.3. Síntese de cDNA.....	30
3.1.4. Desenho do oligonucleotídeos.....	30
3.1.5. Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	30
3.2. Isolamento da região promotora do gene <i>ASH</i> .....	31

3.2.1. Extração de DNA genômico.....	31
3.2.2. Construção das bibliotecas de Genome Walker (GW).....	32
3.2.3. Desenho dos oligonucleotídeos para gene específico (GSP).....	33
3.2.4. Isolamento das regiões promotoras via Genome Walker.....	33
3.2.5. PCR primária.....	35
3.2.6. PCR secundária.....	35
3.2.7. Purificação dos fragmentos de PCR em gel de agarose.....	35
3.2.8. Ligação dos fragmentos de PCR ao vetor de transformação de bactérias.....	36
3.2.9. Preparo de células eletrocompetentes.....	36
3.2.10. Transformação de células competentes por eletroporação.....	37
3.2.11. Minipreparação do DNA plasmidial e sequenciamento.....	37
3.2.12. Análise da sequência promotora de ASH.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1. PCR em tempo real.....	39
4.2. Isolamento das regiões promotoras.....	40
4.3. Análises <i>in silico</i> das sequências isoladas.....	42
5. CONCLUSÕES.....	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Genes relacionados ao botão floral de <i>G. hirsutum</i> e <i>A. thaliana</i> .	20
<b>Tabela 2.</b> Outros elementos <i>cis</i> encontrados no promotor do gene <i>ASH</i> pelos três bancos de dados.	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes estádios de desenvolvimento da flor do algodoeiro. (A) Botão floral; 17  
(B) Flor um dia após a antese; (C) Flor dois dias após a antese. Fonte: Oliveira et al. (2007).
- Figura 2. Secção longitudinal da flor do algodoeiro (Fonte: Adaptado de Oliveira Neto, 18  
2005).
- Figura 3.** Estrutura comum de um gene de eucarioto e regiões do controle da transcrição. 23  
Fonte: Adaptado de Klug et al. (2006).
- Figura 4.** Esquema da ativação do início da transcrição em eucariotos pelo recrutamento da 24  
maquinaria de transcrição. Fonte: Watson, et al. (2008).
- Figura 5.** Esquema da técnica de *Genome Walker* (adaptada de Clontech Inc., 1999). As 34  
extremidades em preto dos fragmentos de DNA representam os adaptadores; AP1 e AP2 –  
oligonucleotídeos adaptadores; GSP1 e GSP2 – oligonucleotídeos gene-específicos.
- Figura 6.** Análise da expressão relativa do gene *ASH* em quatro fases de desenvolvimento, 40  
por meio de qRT-PCR. Botão 1: botão floral de 2-4 mm; Botão 2: botão floral de 6-8 mm;  
Botão 3: botão floral de 14-16 mm; Botão 4: botão floral de 18-20 mm.
- Figura 7.** Produtos de amplificação obtidos para o gene *ASH* de botão floral após a PCR 41  
primária do *genome Walker*. DL1 a 4 são bibliotecas genômicas produzidas pela clivagem  
das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* respectivamente, C(-): controles negativos, onde  
substituiu o DNA por água, C(+): controles positivos, o primeiro utilizando o DNA  
fornecido no kit (control human genomic DNA) e o segundo consistindo de uma biblioteca  
também fornecida no kit.
- Figura 8.** Produtos de amplificação obtidos para o gene *ASH* de botão floral após a PCR 41  
secundária do *genome Walker*. DL1-4 são bibliotecas genômicas produzidas pela clivagem  
das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* respectivamente, C(-): controles negativos, onde

substituiu o DNA por água, C(+): controles positivos, o primeiro utilizando o DNA fornecido no kit (control human genomic DNA) e o segundo consistindo de uma biblioteca também fornecida no kit.

**Figura 9.** Alinhamento das duas sequências promotoras do gene *ASH* proveniente das bibliotecas DL3 e DL4, utilizando-se do programa CLUSTALW, no qual o mesmo agrupa as sequências semelhantes. Pares de bases em destaque são as diferenças encontradas pelo alinhamento. 42

**Figura 10.** Análise computacional da sequência promotora do gene *ASH*, de 509 pb, proveniente do alinhamento, com auxílio do banco de dados do PlantCARE e PLACE. As sequências destacadas em preto, verde e azul representam a localização dos elementos *cis* conservados, laranja e marrom são os elementos *cis* específicos de órgão floral, e o em vermelho é o sítio de início da transcrição (TSS). 44

**Figura 11.** Análise dos elementos *cis* gerado pelo PlantPAN, mostrando a localização dos mesmos na sequência do promotor do gene *ASH*. Os elementos sublinhados são aqueles considerados como frequentes, GATABOX, e que atuam em órgãos florais AP1 e AGAMOUS; as setas indicam sua localização na sequência regulatória. 45

## RESUMO

PORTO, Milena Silva. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Março, 2013.  
**Análise parcial *in silico* da estrutura da região 5' flanqueadora do gene *ASH* expresso em botão floral de algodoeiro.** Orientadora: Liziane Maria de Lima; Coorientadora: Roseane Cavalcanti dos Santos.

A expressão gênica é regulada por sequências regulatórias (5' UTR e 3' UTR), que determinam o nível de expressão. A análise estrutural de promotores, baseada em fatores de transcrição e elementos regulatórios *cis*, é uma das mais importantes descobertas e permite predizer sobre o perfil e a localização da expressão de genes na planta. Assim, objetiva-se com este trabalho isolar e analisar a estrutura *in silico* da região 5' flanqueadora do gene *ASH* em botão floral de algodoeiro. Esse gene foi selecionado a partir de uma biblioteca subtrativa de botão floral de algodoeiro. Amostras de tecidos de botões florais foram coletados e utilizadas para a extração de RNA total e síntese de cDNA, posteriormente foi realizado a análise da expressão gênica por qRT-PCR. Para o isolamento da região 5' flanqueadora utilizou-se a técnica de PCR *Walker*; os fragmentos obtidos foram ligados em pGEM<sup>®</sup>-T Easy e depois transformada em *E. coli*, cepa XL1-Blue. Uma minipreparação plasmidial foi realizada nos clones após a transformação; para verificar a presença dos fragmentos clonados uma digestão com *EcoRI* foi feita. Os insertos foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF. A sequência promotora isolada e sequenciada foi analisada no PlantCARE, PLACE e Plant-PAN para a busca de elementos *cis* regulatórios. Os resultados das análises de expressão gênica mostraram, por meio de ensaio de qRT-PCR, que o gene *ASH*

apresentou expressão em botão floral. Com o uso da técnica de PCR Walker foi isolado uma sequência promotora com 509 pb. Os resultados obtidos nas análises *in silico* revelaram a presença de elementos *cis* regulatórios comumente encontrados em regiões promotoras de plantas, como o TATA-box, CAAT-box e GATA-box e outros elementos *cis* regulatórios. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações sobre um provável promotor de botão floral de algodoeiro.

**Palavras-chave:** *Gossypium hirsutum*, elementos *cis* regulatórios, promotor tecido específico.

## ABSTRACT

PORTO, Milena Silva. State University of Paraíba / Embrapa Cotton, March, 2013. ***In silico*** analysis of the partial structure of the 5' region flanking the gene for *ASH* expressed bud cotton. Advisor: Liziane Maria de Lima; Co Advisor: Roseane Cavalcanti dos Santos.

Gene expression is regulated by regulatory sequences (5' UTR and 3' UTR), which determine the expression level. Structural analysis of promoters, based on transcription factors and *cis* regulatory elements, is one of the most important findings and allows prediction of the profile and location of gene expression in plants. Thus, the objective of this work was to isolate and analyze the structure in silico of the 5' flanking gene *ASH* floral cotton bud. This gene was selected from a subtractive library of the cotton bud. Tissue samples of flower buds were collected and used for extraction of total RNA and cDNA synthesis, was subsequently performed the analysis of gene expression by qRT-PCR. For the isolation of the 5' flanking used the PCR technique Walker; obtained fragments were ligated into pGEM®-T Easy and then transformed into *E. coli* strain XL1-Blue. A plasmid miniprep was performed on clones after processing, to verify the presence of the cloned fragments one *EcoRI* digestion was made. The inserts were sequenced at the Sequencing Platform Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia-DF. The promoter sequence was isolated and sequenced analyzed in PlantCARE, PLACE and Plant-PAN for seeking regulatory *cis* elements. The analysis results showed gene expression by means of qRT-PCR assay, which showed the *ASH* gene expression in floral bud. With the use of PCR Walker was isolated a promoter sequence with 509 bp. The results obtained in the in silico analysis revealed the presence of *cis* regulatory elements

commonly found in promoter regions of plants, such as TATA-box, CAAT-box and GATA-box and other cis regulatory elements. The results of this study provide information about a probable promoter cotton bud.

**Keywords:** *Gossypium hirsutum*, cis regulatory elements, tissue-specific promoter.

## 1. INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas tem sido uma importante ferramenta para a biotecnologia, pois permite a introdução de um ou poucos genes, muitas vezes encontrados em espécies distantes, o que não é possível pelo melhoramento convencional. A expressão de uma proteína heteróloga em plantas transgênicas depende da transcrição do gene introduzido e para isso, além da identificação de genes, que é de extrema importância, promotores são essenciais (RANCE et al., 2002).

A expressão gênica é regulada por sequências regulatórias (5' UTR e 3' UTR), que determinam o nível de expressão, ou seja, a quantidade de proteínas disponível nos tecidos. A diferenciação tecidual está diretamente relacionada com a atividade de diferentes promotores. A ativação e/ou repressão dessas 5' UTR é que determina a atividade gênica e, conseqüentemente, o perfil proteico (FREITAS, 2007).

A análise estrutural de promotores, baseada em fatores de transcrição e elementos regulatórios *cis*, é uma das mais importantes descobertas e permite prever sobre o perfil e a localização da expressão de genes na planta e animais (SHELENKOV e KOROTKOV, 2009; SNOW et al., 2010). Alguns elementos funcionais têm sido identificados por estarem envolvidos no início da transcrição precisa e regulada: TATA Box, GATA2, motif iniciador, Elemento Promotor *Downstream*, Elemento Reconhecedor TFIIA, TFIIB e TFIIC, dentre outros (SNOW et al., 2010).

A maioria dos trabalhos publicados sobre transformação genética de plantas utilizaram o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S) (ODELL et al., 1985),



que possibilita que a característica de interesse seja expressa em todos os tecidos da planta e em qualquer fase de desenvolvimento do vegetal. Nas estruturas reprodutivas, o nível de expressão é baixo. Apesar dos grandes avanços obtidos com o emprego dos promotores constitutivos, os padrões de expressão dos transgenes são variados e baixos em alguns casos, não havendo garantia de expressão no tecido desejado (GREEN et al., 2002; NEUTEBOOM et al., 2002; HSU et al., 2005; WROBLEWSKI et al., 2005). Para atender a tal situação, a adoção de promotores tecidos específicos seria mais efetiva, pois direcionaria a expressão dos genes sob seu comando (CHEN e RAJEWSKY, 2007).

Vários estudos envolvendo genes que se expressam na fase reprodutiva do algodoeiro têm sido identificados e suas funções elucidadas, nos quais são identificados a partir da construção de bibliotecas de ESTs. Dentre eles está o gene *ASH*, objeto de estudo deste trabalho, que está envolvido no desenvolvimento de óvulos e antera (GRINI et al., 2009).

A identificação e o conhecimento da funcionalidade dos promotores órgãos específicos contribuem para expandir os estudos sobre mecanismos moleculares envolvidos no processo de expressão gênica e de diferenciação tecidual. Conseqüentemente, possibilitaria o aprimoramento dos processos biotecnológicos, uma vez que a disponibilidade de tais promotores facilita a obtenção de construções focalizada na expressão direta de genes em tecidos onde esses promotores estejam ativos (SASSAKI, 2008).

### **1.1. Objetivo geral**

Isolar e analisar *in silico* a estrutura da região 5' flanqueadora do gene *ASH* expresso em botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), com potencial para expressar proteínas heterólogas em tecidos florais.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Identificar o nível de expressão do gene *ASH* em botão floral de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento;
- Isolar a região promotora do gene *ASH*;
- Caracterizar *in silico* a sequência promotora isolada quanto à localização dos elementos *cis* regulatórios.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais sobre a cultura do algodão

O homem utiliza a fibra de algodão há séculos, pois os primeiros fragmentos de tecido datam mais de sete mil anos. Há fortes indícios de que populações ancestrais do Vale do Nilo, no Egito, e do Peru eram bastante familiarizadas com o cultivo e uso do algodão. A primeira fiação foi inaugurada em 1641 em Manchester, na Inglaterra, data que marcou o começo da indústria de algodão na Europa e da Revolução Industrial que deu início as grandes transformações produzidas pela expansão do capitalismo. O algodão, em sua espécie arbórea (*G. hirsutum* L.r. marie galante), já era conhecido por moradores locais quando os portugueses chegaram às terras que hoje formam o Brasil. No entanto, só por volta de 1750 que sua exploração como cultura comercial iniciou-se no Maranhão. Em 1845, depois da grande seca e da morte de quase todo rebanho bovino da região Nordeste, o cultivo do algodão espalhou-se pelo semiárido, passando a ser destaque na economia regional com a crise do açúcar a partir da década de 1880. Em 1905, o algodão era o cultivo mais importante da economia local (BUAINAIN e BATALHA, 2007).

No sistema de classificação botânica, o gênero *Gossypium* é composto por 52 espécies descritas, dentre as quais, apenas quatro produzem fibra comercial: *G. herbaceum* L., que já foi muito importante no passado, *G. arboreum* L. que é cultivado na Índia e comercialmente muito importante, *G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L. que contribuem com cerca de 8% e 90%, respectivamente, da fibra produzida mundialmente; as demais espécies são selvagens e não possuem valor econômico (CARVALHO, 2008).

A cultura do algodão é a principal fonte de matéria-prima das indústrias têxteis e a segunda fonte de óleo vegetal no Brasil. Segundo a FAO (2012), os principais produtores são a China, Índia, Estados Unidos, Paquistão, Uzbequistão e o Brasil. Atualmente a região centro-oeste é a responsável pela maior parte da produção brasileira de algodão, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor brasileiro, com participação de 50% na produção nacional (IBGE, 2011).

A fibra, seu principal produto, possui mais de 400 aplicações industriais dentre as quais se destacam a confecção de fios para tecelagem, algodão hidrófilo para curativos, confecção de feltro de cobertores, estofamentos, obtenção de celulose, dentre outros; e as sementes, que constituem uma das principais matérias-primas para a indústria de óleo, fornecem inúmeros coprodutos como a torta e farelo, ricos em proteína de boa qualidade e bastante utilizados no preparo de rações (BUAINAIN e BATALHA, 2007).

A cotonicultura se destaca por sua importância econômica e social, ocupando mão de obra rural e gerando renda no processo produtivo, comercial e financeiro. Com isso, o algodão se coloca como uma das principais culturas nacionais, elevando o País para o quinto maior produtor e o quarto maior exportador. No Brasil, a área plantada na safra 2012/2013 deve ocupar 1.002,6 mil hectares, de acordo com o relatório de dezembro de 2012 da Companhia Nacional de Abastecimento. As exportações brasileiras foram recordes, totalizando 942,1 mil toneladas embarcadas de Janeiro a Novembro de 2012 (CONAB, 2013).

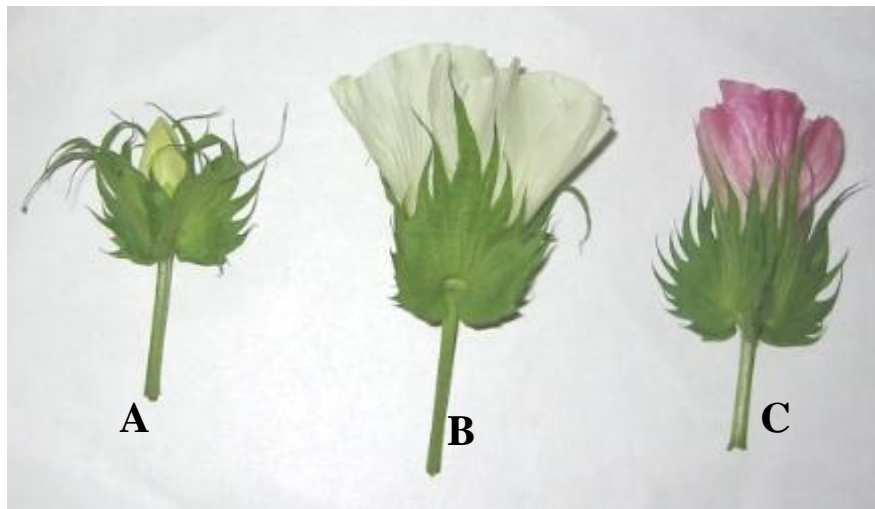
## **2.2. Biologia floral do algodoeiro**

A planta do algodoeiro possui fecundação do tipo intermediária, ou seja, a autogamia é mais frequente, no entanto, a alogamia também é observada a uma taxa que varia de 5% a 20%. Na presença de polinizadores a fecundação cruzada pode ser significativa e alcançar taxas superiores a 20% (OLIVEIRA et al., 2007).

As flores são andróginas, ou seja, possui tanto estruturas reprodutivas masculinas quanto femininas, são completas, pois apresentam os quatro verticilos florais, são isoladas, pedunculares, actinomórficas e são protegidas por três brácteas (PASSOS, 1982). O botão floral começa a se desenvolver entre 30-35 dias após a germinação, momento a partir do qual este se diferencia morfológicamente do gomo vegetativo. Nos botões florais, o vértice vegetativo, primitivamente convexo, sofre em determinado momento uma depressão no seu ápice e se torna

côncavo; é a partir daí que se inicia o desenvolvimento do botão floral. Após cerca de 40 dias da iniciação do botão floral, a flor madura está pronta para a antese. Altas temperaturas resultarão na antecipação da abertura floral e baixas temperaturas atrasarão o horário de abertura (OLIVEIRA et al., 2007).

A floração varia em função do ciclo da cultura. Segundo Medeiros et al. (2009) a emergência da primeira flor ocorre entre 47 e 63 dias. Quanto à cor, varia de branco a creme; quando fecundada, desenvolve uma coloração roxa (Figura 1) e no terceiro dia, as pétalas caem (PASSOS, 1982). Após o processo de fecundação, o ovário se transforma em fruto, ocorrendo um desenvolvimento e crescimento da maçã e, posteriormente, ocorre a formação do capulho (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008). As sementes possuem línter, que são fibras curtas, com menos de 12 mm, em geral de 3 a 9 mm, que existem na superfície da semente, formadas de celulose quase pura, com 14% a 25% de óleo, o equivalente a 30-35% de massa. O teor de proteínas varia de 40% a 55% (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

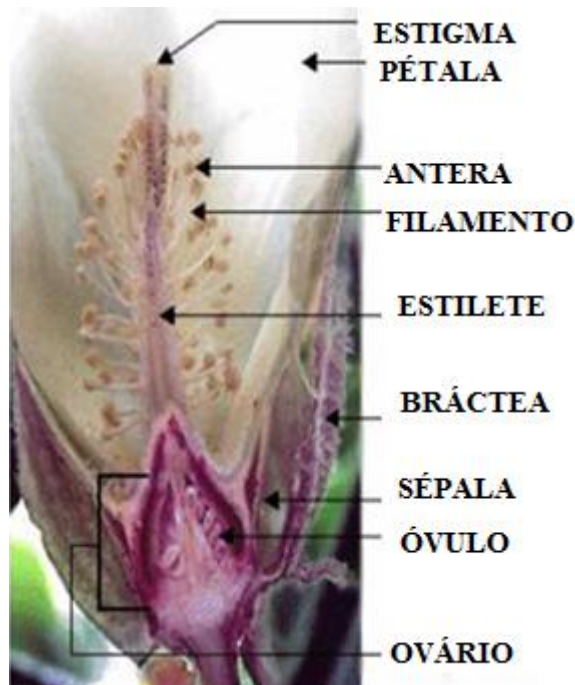


**Figura 1:** Diferentes estádios de desenvolvimento da flor do algodoeiro. (A) Botão floral; (B) Flor um dia após a antese; (C) Flor dois dias após a antese. Fonte: Oliveira et al. (2007).

Na Figura 2 pode-se observar o corte de uma flor do algodoeiro herbáceo, destacando-se além dos verticilos de proteção, o androceu, com cerca de dez fileiras de estames, colunas estaminais envolvendo o estilete até a altura do estigma. Cada filete tem uma antera de coloração creme e se encontra alinhado em cinco fileiras duplas longitudinais. As anteras possuem 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  $\mu\text{m}$ , 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 2:** Secção longitudinal da flor do algodoeiro (Fonte: Adaptado de Oliveira Neto, 2005).

### 2.3. Genes expressos em botão floral

Há várias classes de genes associados às estruturas florais e a diferenciação dos tecidos, tanto para a formação da fibra como para cada processo biológico do botão floral. Pesquisas envolvendo a identificação e caracterização de vários genes associados a órgãos reprodutivos vem possibilitando consideráveis descobertas de suas ações sobre o desenvolvimento

meristemático e identidade dos órgãos florais. Esses estudos partiram principalmente de análises de mutantes em *Arabidopsis thaliana* (GEORGIADY et al., 2002), que já possui seu genoma sequenciado, servindo assim como referencial para identificação de genes expressos na fase reprodutiva de diversas culturas, comparando-os a sequências já disponíveis em banco de dados (AGI, 2000).

Assim, o desenvolvimento das flores passou a ser compreendido como um processo que envolve várias 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).

A exemplo de *A. thaliana*, o gênero *Gossypium* possui bancos de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) oriundos do sequenciamento em larga escala de diversas bibliotecas de cDNA, construídas a partir de diferentes tecidos e estádios fisiológicos da planta. Vários genes já foram investigados e tiveram a sua função elucidada em tanto em *Arabidopsis* como em *Gossypium* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Genes relacionados ao botão floral de *G. hirsutum* e *A. thaliana*.

Gene	Função	Espécie	Processo Biológico	Fonte
<i>ARF6</i>	Ligante proteico	<i>A. thaliana</i>	Desenvolvimento da flor e óvulo	Naqpal et al. (2005)
<i>ATFYPP3</i>	Atividade Kinase	<i>A. thaliana</i>	Regulação negativa do desenvolvimento da flor	Kim et al. (2002)
<i>ATRAB</i>	Ligação GTP	<i>A. thaliana</i>	Crescimento do tubo polínico	Joshua et al. (2004)
<i>SEUSS</i>	Ligante proteico	<i>A. thaliana</i>	Regulação do desenvolvimento da flor	Vaniyambadi et al. (2006)
<i>BOP2</i>	Ligante proteico	<i>A. thaliana/ G. hirsutum</i>	Morfogênese da flor e abscisão do órgão floral	Mckim et al. (2008)/ CottonDB
<i>CDKC2</i>	Kinase	<i>A. thaliana/ G. hirsutum</i>	Desenvolvimento da flor, carpelo e folha	Cui et al. (2007)/ CottonDB
<i>HEN1</i>	RNA metiltransferase	<i>A. thaliana/ G. hirsutum</i>	Regulação do desenvolvimento da flor, formação da pétala	Suzuki et al. (2002)/ CottonDB
<i>ROXY1</i>	Intermedia a troca de tiol-disulfite	<i>A. thaliana/ G. hirsutum</i>	Desenvolvimento da antera e pétala	Xing et al. (2005)/ CottonDB
<i>ATX1</i>	Ligante proteico	<i>A. thaliana</i>	Especificação da identidade do órgão floral	Venegas et al. (2003)
<i>GhEX1</i>	Ligante proteico	<i>G. hirsutum</i>	Alongamento da fibra	Orford et al. (1998)
<i>GhTUB1</i>	Ligante proteico	<i>G. hirsutum</i>	Alongamento da fibra	Li et al. (2002)
<i>SRS</i>	Aminoacilação de tRNA	<i>A. thaliana</i>	Desenvolvimento do óvulo	Berg et al. (2005)
<i>TOPIALPHA</i>	Ligante proteico	<i>A. thaliana/ G. hirsutum</i>	Morfogênese da flor	Takahashi et al. (2002)/ CottonDB
<i>OVA1</i>	Ligante de ATP	<i>A. thaliana</i>	Desenvolvimento do óvulo	Berg et al. (2005)

Cotton Genome Database: CottonDB: &lt;cottondb.org/&gt;

Genes da classe *ASH*, objeto de estudo deste trabalho, são necessários para a correta expressão de outros genes essenciais para a determinação da identidade dos órgãos florais em *A. thaliana*, especialmente os envolvidos no desenvolvimento das anteras e grãos de pólen. *ASHH2* foi o primeiro gene em *Arabidopsis*, da classe *ASH1*, a ser atribuída uma função biológica, isto é, controla a época de floração (GRINI et al., 2009). Esse estudo demonstra a importância dessa classe de genes e abre perspectivas de se isolar sequências regulatórias específicas de botão floral com larga aplicação na biotecnologia voltada para agricultura.

#### **2.4. Regulação da transcrição em eucariontes**

A regulação da expressão gênica refere-se ao mecanismo que controla a síntese de um transcrito gênico e de seu produto proteico. Em eucariotos, essa regulação pode acontecer nas várias etapas de decodificação da informação contida na sequência nucleotídica de DNA para sintetizar uma proteína (ALBERTS et al., 2002). Existem diversos mecanismos e fatores que regulam a expressão gênica, entre os quais é possível destacar: metilação do DNA, condensação da cromatina, “splicing” alternativo de RNA, iniciação transcricional, estabilidade do RNA mensageiro, controles traducionais, várias formas de modificações pós-traducionais, tráfego intracelular, degradação de proteína (LEWIN, 2001) e a ação de microRNAs (CHEN e RAJEWSKY, 2007).

Em eucariontes, a RNA polimerase II é a enzima responsável pela transcrição de genes codificadores de proteínas. Há também nestas células a RNA polimerase I, que sintetiza o precursor do rRNA, e a RNA polimerase III, que transcreve genes que codificam tRNAs, rRNAs 5S e outras moléculas de pequenos RNAs (LODISH et al., 2000). Existem ainda a RNA polimerase IV e V, presentes em plantas, que também participam da síntese de micro RNAs envolvidos no silenciamento gênico (HAAG e PIKAARD, 2011).

Para que a transcrição ocorra é preciso que uma proteína de ativação gênica se acople ao DNA e reúna um complexo que possa remodelar a cromatina, tornando a região acessível às enzimas de modificação de histonas, a modificação destas permitirá a ligação de outras proteínas ativadoras, na qual as proteínas adicionais reunirão os fatores gerais de transcrição (TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH, TFIIA e TFIID) e a RNA polimerase para o promotor, constituindo o chamado complexo de pré-iniciação, que será rearranjado logo após a ligação de outras proteínas de ativação dando início à transcrição (KORNBERG, 2007). Assim, na regulação da transcrição

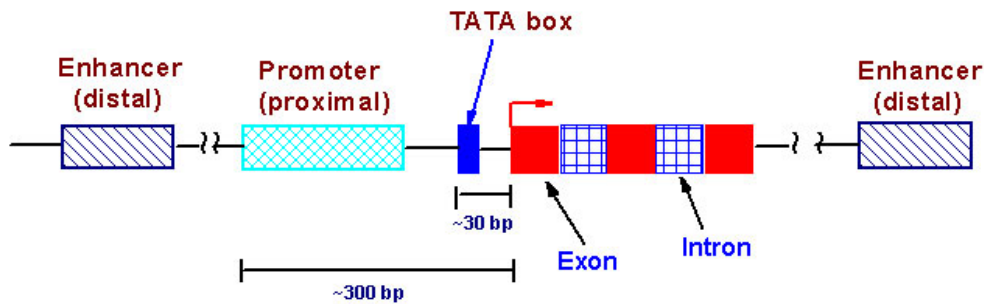


gênica existe a participação de dois elementos regulatórios, elementos *trans*, que são proteínas com domínios capazes de reconhecer sequências específicas de DNA e se ligarem a elas, ele também influencia diversos passos do início da transcrição, desde a remodelagem da cromatina até a ligação do complexo de pré-iniciação do promotor elementos *cis*, que são sequências reconhecidas pelas proteínas regulatórias (ALBERTS et al., 2002). Assim, todo gene com impacto fenotípico é flanqueado por elementos regulatórios, que junto com a expressão e a atividade de proteínas codificadas em outros loci, modula o tempo, o nível, as condições ambientais e as células ou os tecidos onde a expressão ocorre (WRAY et al., 2003).

## 2.5. Promotores em eucariontes

O promotor é o processador central da regulação de um gene, compreende a região 5' da sequência transcrita localizado à montante (*upstream* ou extremidade 5') do sítio de início da transcrição do gene (TSS), uma vez que contém os sítios de ligação para os complexos proteicos das RNA polimerases responsáveis pela transcrição gênica (PÉRIER et al., 1998; GRIFFITHS et al., 2000).

Estruturalmente, o promotor pode ser dividido em duas regiões: uma proximal e outra distal (Figura 3). O promotor proximal compreende a região adjacente ao TSS que abrange, aproximadamente, do nucleotídeo -250 ao +250 (BUTLER e KADONAGA, 2002). Na região proximal a sequência contínua de DNA mínima necessária para dirigir corretamente o início da transcrição de um gene pela maquinaria de transcrição é chamada de promotor principal ou *core promoter*, que inclui o sítio TSS com nucleotídeos -35 a +35 desse sítio (BUTLER e KADONAGA, 2002). Contém elementos *cis* regulatórios, como o TATA-box, uma sequência conservada (T/A)A(A/T) que se localiza a aproximadamente 25-30 pares de bases (pb) do TSS, e outros elementos, localizados a aproximadamente 100 (CCAAT-box) e 200 pb (GC-box) acima do TSS (GRIFFITHS et al., 2000), além de outros elementos conservados como o iniciador (Inr), o elemento de reconhecimento ao TFIIB (BRE) e o elemento do promotor posterior (DPE), mas, nem sempre há conservação dessas regiões, uma vez que não existem elementos universais no *core promoter* (BUTLER e KADONAGA, 2002).



**Figura 3:** Estrutura comum de um gene de eucarioto e regiões do controle da transcrição. Fonte: Adaptado de Klug et al. (2006).

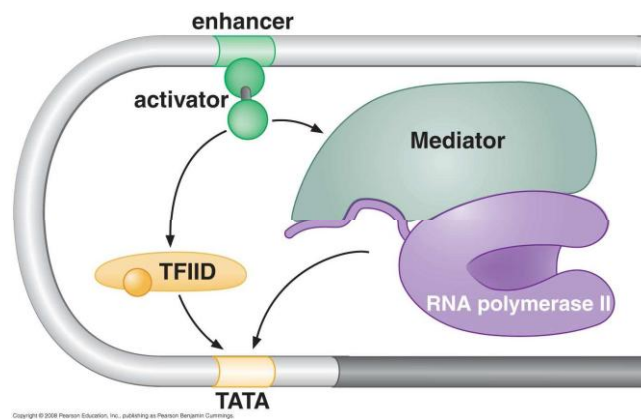
O primeiro elemento *cis* identificado em eucariontes foi o TATA-box (SEURINCK 1990; BREATHNATCH e CHAMBON, 1981) que está quase sempre circundado por sequências ricas em G e C, único elemento que apresenta uma localização relativamente fixa em relação ao TSS (LEWIN, 2001). A sequência consenso possui aproximadamente 8 pb constituída inteiramente de A e T, onde a posição e orientação das mesmas podem ser variáveis. Esse elemento se assemelha à região -10 (Pribnow box) encontrada nos promotores de procariontes (PRIBNOW, 1975), mas acredita-se que não sejam homólogos (BUTLER e KADONAGA, 2002).

Em promotores com TATA-box, os fatores envolvidos na transcrição (transcription factor – TFs) são formados por proteínas, que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a RNA polimerase e o DNA, e se juntam no complexo de pré-iniciação da transcrição (preinitiation complex – PIC), na seguinte sequência: TFIID, TFIIB, RNA polimerase II-complexo TFIIF, TFIIE e depois TFIIH. O TFIID se liga ao *core promotor*; TFIIB se liga ao complexo TFIID/TFIIA e recruta a RNA-polimerase II para o promotor; TFIIF se liga fortemente à RNA-polimerase II, TFIIE e TFIIH se ligam ao complexo polimerase/promotor. O TATA Box é reconhecido pela proteína ligante de TATA (TBP – TATA box-binding protein), subunidade do fator de transcrição TFIID, enquanto TFIIB é um polipeptídeo único que interage com TBP bem como com o DNA a montante do TATA-box. Assim, parece que esses dois fatores têm uma importante função no reconhecimento dos elementos do *core promotor* (BUTLER e KADONAGA, 2002).

O GC-box também é um elemento *cis* regulatório comum; ocorrem frequentemente múltiplas cópias nas duas orientações no qual pode aumentar a atividade do promotor. Ele está, geralmente, localizado a -90 do TSS e possui a sequência GGGCGG (LEWIN, 2001).

CAAT-box é outro elemento *cis* frequente, comumente ele está localizado próximo a -80, podendo variar consideravelmente a partir do TSS e funciona nas duas orientações (LEWIN, 2001).

A parte distal dos promotores é formada por elementos que se localizam a uma distância que variam dos elementos considerados como parte do *core promoter*, que têm como função regular a expressão espaço-temporal de um gene, ou seja, as proteínas adequadas que atuam nesses elementos devem estar combinadas para que o gene seja expresso somente quando e onde necessário; são as regiões acentuadoras (*enhancers*) (Figura 4) e repressoras (*silencers*) (FESSELE et al., 2002; RIETHOVEN, 2010; KOLOVOS et al., 2012).



**Figura 4:** Esquema da ativação do início da transcrição em eucariotos pelo recrutamento da maquinaria de transcrição. Fonte: Watson, et al. (2008).

A posição dos *enhancers* não necessita ser fixa em relação ao promotor podendo assim funcionar nas duas orientações (LEWIN, 2001). Possuem aproximadamente 100-200 pb, podem estar localizados a centenas ou a milhares de pb do sítio de início de transcrição, sendo tanto a montante ou a jusante, ou em íntrons (LODISH et al., 2000). A região acentuadora precisa ser estudada junto com o seu *core promoter* para verificar sua especificidade; além disso, para determinar sua função na transcrição a presença de cada elemento num *core promoter* deve ser examinada separadamente, e em conjunto (BUTLER e KADONAGA, 2002).

As regiões repressoras (*silencers*) impedem a expressão do gene durante a diferenciação e a progressão através do ciclo celular (LI e ARNOSTI, 2011). Essas regiões reprimem a atividade do promotor a partir de uma distância, independente da posição (FRENKEL et al., 1993).

## 2.6. Tipos de promotores que regulam a expressão gênica

De acordo com a atividade, os promotores são classificados em: promotores constitutivos, aqueles que promovem a expressão gênica durante todo o ciclo de vida da planta, bem como em todos os tecidos e estádios de desenvolvimento, com intensidade transcricional baixa e uniforme em determinados órgãos; e, em promotores específicos, possuem os elementos que determinam a intensidade que acontece a transcrição, segundo o tecido, condição fisiológica, estádio, fatores abióticos e bióticos e dirigidos por fatores de transcrição específicos (FICKETT e HATZIGEORGIU, 1997; HOCHHEIMER e TJIAN, 2003).

### 2.6.1. Promotores constitutivos

Sob a regulação de promotores constitutivos, transgenes são ativos na maioria das células durante todo seu desenvolvimento, embora o nível de expressão dependa do tipo celular (TWYMAN et al., 2003). Dentre os mais utilizados se destacam o promotor 35S do Vírus do Mosaíco da Couve Flor – CaMV35S, que é ativo na maioria dos tecidos e fases de desenvolvimento dos vegetais (ODELL et al., 1985). Outro fator que contribui para a ampla utilização desse promotor é a caracterização detalhada dos subdomínios que o compõem. Assim é possível a manipulação destes para modular sua atividade temporal e espacial (BENFEY e CHUA, 1990; KAY et al., 1987). Os promotores dos genes que codificam a nopalina sintase (NOS) e octopina sintase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* (KONCZ et al., 1983), o promotor do gene que codifica a poliubiquitina (Ubi-1) de milho (CHRISTENSEN et al., 1992), o promotor do gene que codifica a actina (Act-1) de arroz (MCELROY et al., 1990), o promotor MtHP isolado do legume *Medicago truncatula* (XIAO et al., 2005) e o promotor do gene histona de milho H2B (RASCO et al., 2003), são exemplos de promotores constitutivos já estudados.

A maioria dos trabalhos publicados sobre transformação genética de plantas bem como diversos produtos transgênicos já liberados, utilizaram o promotor constitutivo CaMV35S tais como: a soja (*Glycine max*) (Monsanto), a canola (Monsanto), milho (*Zea mays*) (Aventis), algodão (*G. hirsutum*) (Monsanto) resistentes ao herbicida glifosato; algodão Bt (*G. hirsutum*) e batata Bt (*Solanum tuberosum*) (Monsanto) resistentes a lagartas; tomate (*Solanum*

*lycopersicum*) resistente ao transporte e melhoria no sabor (DNA Plant Technology) (BORÉM, 2005), entre outros.

No entanto, genes regulados por promotores constitutivos apresentam intensidade transcricional diferenciada no aspecto tissular, não havendo garantia de expressão no tecido desejado (GREEN et al., 2002; NEUTEBOOM et al., 2002; HSU et al., 2005; WROBLEWSKI et al., 2005).

### 2.6.2. Promotores específicos

O controle necessário da expressão do transgene através de promotores órgão/tecido específicos traz, entre outras vantagens, o aumento da biossegurança (DANIELL, 2002), uma vez que, as plantas expressando uma proteína heteróloga a expressão é dirigida por um promotor específico, a proteína irá ser expressa apenas nos tecidos de interesse. Tem sido proposto que as novas gerações de plantas transgênicas deverão utilizar tais promotores, pois permitem o direcionamento da expressão dos genes de interesse (CHEN e RAJEWSKY, 2007).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para identificar novos promotores com potencial para a expressão em tecidos ou órgãos específicos em culturas de espécies vegetais:

Milho (*Z. mays*) - Chen et al. (2010) isolaram e caracterizaram o promotor do gene da subunidade menor da AGPase (*ADP-glucose pyrophosphorylase*) de endosperma de milho, o qual foi capaz de regular a expressão de maneira específica em sementes de tabaco, órgão interessante para utilização como biofábrica.

Arroz (*Oryza sativa* L ssp.) - Ye et al. (2012) isolaram e caracterizaram o promotor PDX1, expresso apenas em tecidos verdes. Com esse estudo os autores caracterizaram dois novos elementos cis-reguladores, o GSE1 e o GSE2.

Mimosa (*Leucaena leucocephala*) - Prashant et al. (2012) isolaram dois promotores, o LICCR e o LICAD, onde por meio de ensaios histoquímicos com GUS indicaram expressão em tecidos vasculares de folhas, estames e raízes.

Soja (*Glycine max*) - Waclawovsky et al. (2006) isolou o promotor *GmSBP2* (*sucrose binding protein*) ao qual foi capaz de dirigir a expressão tecido vascular específico de genes repórteres em plantas transgênicas de tabaco, podendo ser utilizado como ferramenta molecular para direcionar a expressão heteróloga em tecidos específicos. Grossi et al. (2010) isolaram o promotor específico de raiz UceS8.3, que poderá utilizado nos trabalhos de transgenia que

envolvem o controle de algumas pragas, como nematoides (*M. incognita*). Santana (2012) isolou os promotores PSulfT0,5, PCit0,8, PCit1,9 específicos de raiz e folhas, que poderão ser explorados para a expressão de transgenes em plantas, e PCit0,4 específico de folha, que futuramente poderá ser utilizado para o mesmo fim. Preiszner et al. (2001) e Komatsu et al. (2011) descreveram que os promotores específicos de raiz: *Agh* e *Agh2* (álcool desidrogenase) são induzíveis por estresse como anoxia e alagamento, respectivamente.

Café (*Coffea arabica*) - Brandalise (2007) isolou e caracterizou dois promotores, um de folha, ativado em situações de estresse biótico e abiótico e outro em raiz, ativado somente em resposta ao ataque de nematoides.

Cana-de-açúcar (*Saccharum L.*) - Hoshino (2007) isolou e caracterizou o promotor específico de raiz, o SCCCRT1004A07, que codifica uma proteína transportadora de lipídios.

Eucalipto (*Eucalyptus grandis*) - Sasaki (2008) isolou e caracterizou o promotor EGRT2, com expressão específica em raiz, que possui relação com o transporte e translocação de Potássio; Costa (2011) caracterizou o promotor EGJFLV3247C08.g, que apresenta expressão específica em feixes vasculares de folhas e raízes, e mostrou ser responsivo a baixas concentrações de potássio.

Álamo (*Liriodendron tulipifera*) - Ko et al. (2012) identificaram o promotor DX por meio de ensaio GUS, sendo expresso em células de xilema e no crescimento de sementes jovens.

Algodão (*G. hirsutum*) - Li et al. (2005) utilizaram o promotor GhACT1 para evidenciar que o gene GhACT1 está envolvido no alongamento da fibra do algodão, sendo este de grande relevância para dirigir genes potenciais que melhorem a expressão para a qualidade da fibra. Sunilkumar et al. (2005) conduziram estudos que mostraram o uso de um promotor anti-senso de semente, inibindo a expressão da atividade da enzima  $\beta$ -12 desaturase resultando na redução da expressão do óleo linoléico e aumento da expressão do óleo oleico. Song et al. (2000) isolaram e caracterizaram os promotores *Gh-sp* e *Gh-rbcS* de sementes e folhas, respectivamente.

Dendê (*Elaeis guineensis*) - Kamaladini et al. (2013) isolaram e identificaram, através de ensaios histoquímicos, que o promotor *MT3-A* que é expresso nos tecidos e órgãos reprodutivos, incluindo a antera, o fruto e sementes.

O conhecimento sobre promotores é de grande relevância, uma vez que é esperado, ao menos em parte, que os padrões similares de expressão de um gene ou grupo de genes sejam em função das semelhanças nas regiões da regulação da transcrição (OHLER e NIEMANN, 2001).

Na literatura, vários outros promotores têm sido reportados, a maioria deles utilizados em ensaios *in vitro*, porém, com larga possibilidade de posterior utilização em pesquisas envolvendo transgenia. Assim, apesar dos grandes avanços com o uso de promotores tecido-específico, há uma necessidade de isolar e caracterizar promotores com expressão específica em órgãos reprodutivos de algodoeiro, visto que há poucos estudos relacionados a essas estruturas e que a expressão dos promotores constitutivos, especialmente o 35S, é relativamente baixa nesses órgãos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Análise de expressão do gene *ASH* por PCR em tempo real**

Em 2010, equipe de Biotecnologia da Embrapa Algodão, coordenada pela DS.c. Liziane Maria de Lima, construiu uma biblioteca subtrativa de botão floral de algodoeiro, visando a seleção de genes expressos nesse órgão (PINHEIRO et al., 2013). Dentre os vários genes isolados, o gene *ASH* foi selecionado para ser investigado neste estudo, quanto à expressão temporal em botão floral de algodoeiro, e ter sua sequência reguladora isolada para uso futuro na transgenia do algodoeiro dirigindo genes de interesse agrônomico.

##### **3.1.1. Material vegetal utilizado para análise de expressão gênica**

Tecidos de botão floral de algodoeiro da cultivar 8H do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão – Campina Grande, foram coletados, nos tamanhos variando de 2 a 20 mm de comprimento, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C para extração do RNA.

##### **3.1.2. Extração de RNA**

Para a realização da extração, pesou-se 100 mg de tecido e em seguida foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de um cadinho e pistilo 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 em biofotômetro (260 nm) (Eppendorf BioPhotometer Plus).

### 3.1.3. Síntese de cDNA

Sintetizou-se o cDNA a partir de 1 µg de RNA total de cada amostra extraída, utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen). Inicialmente, 4 µg de RNA foi tratado com DNase I (Kit DNase Amplification Grade- Invitrogen) conforme instruções do fabricante, para eliminação de possíveis contaminações com DNA genômico. Em seguida, 8 µL do RNA, 2 µL do Mix RT Enzyme (SuperScript™ III e RnaseOUT™), 10 µL do Mix 2X RT Reaction Mix (oligo (dT)<sub>20</sub>, random hexamers, MgCl<sub>2</sub> e dNTPs) foram incubados a 50 °C por 30 min para a reação de transcrição reversa (RT). A transcriptase reversa foi inativada a 85 °C por 5 min. Por fim, adicionou-se 2U de RNase H e a reação foi incubada a 37 °C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento de uso.

### 3.1.4. Desenho dos oligonucleotídeos

Com base na sequência do gene *ASH* isolado a partir da biblioteca subtrativa, foram desenhados os oligonucleotídeos senso (5' CAAAGATTGGGTCCCTTGTTGATGTT 3') e o antisenso (5' CGCCAATTGTTACAGACACACCTCTC 3'), utilizando os programas Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e Operon (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>).

### 3.1.5. Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para garantir uniformidade dos resultados, uma padronização da quantidade de cDNA foi realizada a partir de RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos do gene da *ACTINA* e análise quantitativa por meio de eletroforese em gel de agarose à 0,8%. Após padronizar a amplificação por RT-PCR, obtendo-se um fragmento único de tamanho desejado, o cDNA foi diluído 20 vezes para a utilização na qRT-PCR. Para normalização da reação da qRT-PCR, foram utilizados os

genes constitutivos *ACTINA* e *UBIQUITINA*, seguindo as recomendações do fabricante. Os experimentos de PCR em tempo real foram conduzidos no termociclador da Applied Biosystems 7500. A PCR conteve os seguintes reagentes: Syber Green Rox Plus Master Mix 2X (LGC), 200  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo e 2  $\mu$ L do cDNA (1:20), de todas as amostras nos seus respectivos tamanhos, seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O programa de PCR utilizado foi: 95 °C por quinze minutos para a ativação da enzima Taq Polimerase (hot start), 95 °C por vinte segundos, 55 °C por vinte segundos e 72 °C por vinte segundos, repetidos por 40 ciclos, seguindo as recomendações do fabricante. A curva de desnaturação (“*melting curve*”) foi realizada após um término da amplificação para verificar a presença de produtos inespecíficos ou dímeros formados entre os oligonucleotídeos. O programa foi 95 °C por quinze segundos, 60 °C por quinze segundos, subindo dois graus por minuto até chegar a 95 °C, seguindo as recomendações do fabricante.

Os dados brutos de fluorescência de todas as corridas foram importados para o programa *Real-time PCR Miner* para determinar o ciclo *threshold* (*Ct*) e a eficiência da PCR (ZHAO e FERNALD, 2005). O programa *Miner* é baseado na cinética individual das reações de PCR e determina a eficiência de reação sem a necessidade de uma curva padrão. Utiliza os pontos iniciais e finais da fase exponencial da PCR para estimar a eficiência da reação para cada amostra/gene e em seguida calcula a média e o coeficiente de variação da eficiência para cada gene.

A análise de expressão gênica foi realizada utilizando o programa qBASEPlus que utiliza múltiplos genes de referência para a normalização e considera a eficiência real da PCR para cada gene (HELLEMANS et al., 2007). Os valores de *Ct* das duas duplicatas biológicas juntas e o valor de eficiência de cada gene gerados pelo *Miner* foram importados para o qBASEPlus para determinar a expressão relativa dos genes em estudo. Com base na análise de estabilidade gerado pelo geNorm os melhores genes para cada condição experimental foram indicados no qBASE para a normalização do gene-alvo.

## **3.2. Isolamento da região promotora do gene *ASH***

### **3.2.1. Extração de DNA genômico**

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), método CTAB. Foram coletados discos de folhas da cultivar 8H, aproximadamente 100 mg de tecido e adicionados 700  $\mu$ L do tampão de extração CTAB pré-aquecido, macerado no mini-beadbeater durante 2 min e incubado por 30 min a 65 °C. Adicionou-se em seguida 700  $\mu$ L de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico, 24:1 v/v) seguido de uma centrifugação a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e ao mesmo foi adicionado 700  $\mu$ L de isopropanol gelado, centrifugado a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 x g durante 5 min a 4 °C, logo depois descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol absoluto gelado, centrifugado a 12000 x g durante 5 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado com 100  $\mu$ L água Milli-Q estéril.

Após análise da qualidade do DNA em gel de agarose a 0,8% procedeu-se uma digestão com RNase para eliminar RNAs remanescentes; o mesmo foi tratado com 5  $\mu$ L de RNase (100  $\mu$ g/ml), incubado a 37 °C por 30 min, foi adicionado 700  $\mu$ L de isopropanol gelado (-20°C), centrifugado a 12000 x g durante 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 x g durante 5 min a 4 °C; logo depois descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol absoluto gelado e centrifugado a 12000 x g durante 5 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado com 100  $\mu$ L água Milli-Q estéril. A quantificação, utilizando o DNA Lambda, foi feita em gel de agarose a 0,8% corado com Syber.

### 3.2.2. Construção das bibliotecas de Genome Walker

Para a construção das bibliotecas foram utilizados 25  $\mu$ L de DNA genômico de algodão (100 ng/ $\mu$ L) em quatro tubos separadamente, 8  $\mu$ L de enzima de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* (10 U/ $\mu$ L), sendo uma em cada tubo, 10  $\mu$ L restriction enzyme buffer (10X) e 57  $\mu$ L de água Milli-Q estéril, totalizando 100  $\mu$ L o volume final para cada reação, as quais foram incubadas durante 16 horas a 37 °C. Cada digestão gerou uma biblioteca de amplicons, denominadas DL1, DL2, DL3 e DL4 para *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente.

Uma alíquota da reação de digestão (5  $\mu$ L) foi aplicada em gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade da digestão, sendo o DNA restante purificado via extração com fenol/clorofórmio, sendo adicionado 95  $\mu$ L de fenol e agitado no agitador a baixa velocidade

durante 10 segundos, centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C para separar as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo de 1,5 mL, adicionou-se 95 µL de clorofórmio e agitado no agitador a baixa velocidade durante 10 segundos, centrifugou-se a 14.000 x g por 15 min a 4°C para separar as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL. A cada tubo, adicionou-se 2 volumes (190 µL) de etanol 95% gelado, 1/10 de volume (9,5 µL) de NaOAc 3 M (pH 4,5) e 2 µL de glicogênio (20 µg/µL), agitado no agitador, centrifugado a 14.000 x g durante 15 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet em 100 µL de etanol gelado a 80%, centrifugado a 14.000 x g durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante e deixou secar oprecipitado, em seguida ressuspendeu-se em 20 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1mM, pH 7,5).

Posteriormente, os produtos purificados foram ligados aos adaptadores do kit. Utilizou-se 4 µL de cada digestão purificada, adicionou-se 1,9 µL do Adaptor Genome Walker (25 uM), 1,6 µL de tampão de ligação 10X e 0,5 µL de DNA T4 ligase (6 U/µL). Incubou-se a 16 °C durante a noite. Para interromper as reações, incubou-se a 70° C durante 5 min. Ressuspendeu-se cada reação com 72 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,5), agitado no agitador e armazenado a -20 °C até sua utilização.

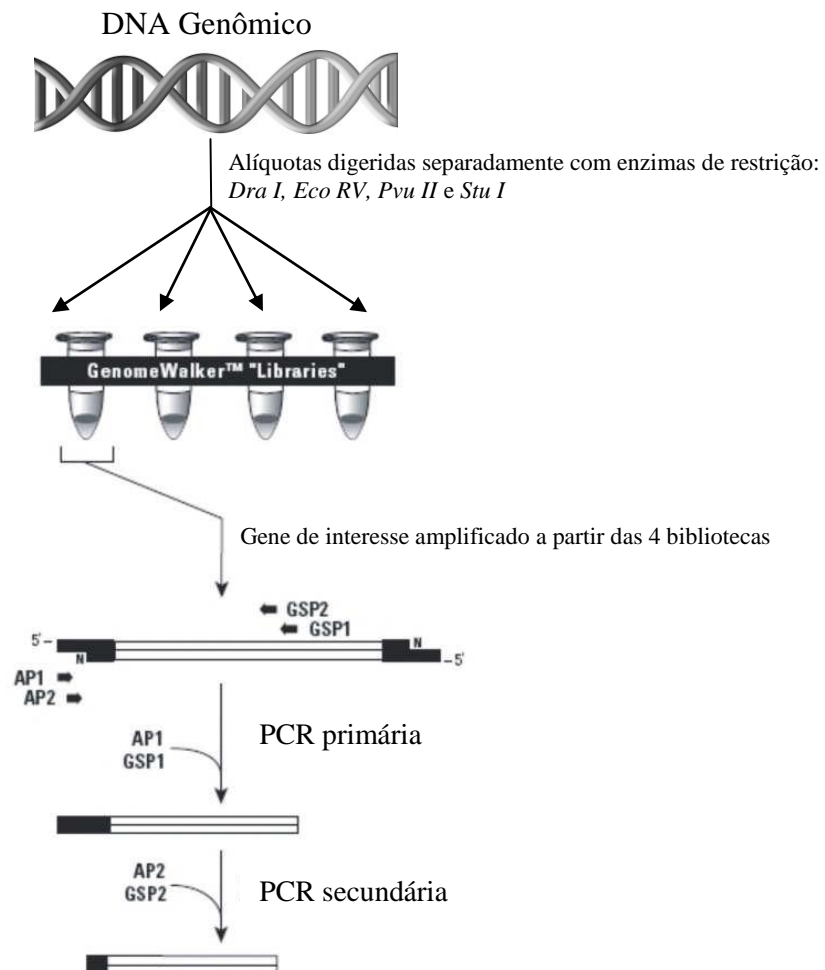
### **3.2.3. Desenho dos oligonucleotídeos para gene específico**

Dois oligonucleotídeos foram desenhados, baseados na sequência do gene *ASH*, utilizando-se dos programas Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e Operon (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>), com o intuito de amplificar produtos a montante da região 5' do gene *ASH*. Os critérios recomendados para os oligonucleotídeos foram: tamanho (mínimo: 26 bases; ótimo: 28 bases; máximo: 30 bases); temperatura de anelamento (mínimo: 66 °C; ótimo: 67 °C; máximo 68 °C) e conteúdo em GC (mínimo: 40%; máximo: 60%) (Genome Walker Universal Kit User Manual, 2007), sendo um oligonucleotídeo mais externo (5' TGAGCTAAGTCTGTGTATGG 3') e outro mais interno (5' GAGAGAGGTGTGTCTGTAAC 3'), denominados de GSP1 e GSP2, respectivamente.

### **3.2.4. Isolamento das regiões promotoras via Genome Walker**

A técnica de Genome Walker (GW, Clontech) descrita por Devic et al. (1997), permite amplificar, por meio de PCR, regiões localizadas à montante de uma sequência conhecida empregando-se oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e à sequência conhecida.

A primeira fase do procedimento de GW consiste de uma PCR primária empregando oligonucleotídeos mais externos relacionados ao adaptador (AP1) e à sequência do EST validado. Uma alíquota diluída (1:49, v/v) dessa PCR primária foi então usada como molde para a realização da PCR secundária que utiliza oligonucleotídeos mais internos (AP2 e GSP2) à região amplificada (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema da técnica de *Genome Walker* (adaptada de Clontech Inc., 1999). As extremidades em preto dos fragmentos de DNA representam os adaptadores; AP1 e AP2 – oligonucleotídeos adaptadores; GSP1 e GSP2 – oligonucleotídeos gene-específicos.

### 3.2.5. PCR primária

Para a realização da PCR primária, utilizou-se 1 µL de cada biblioteca, digerida com *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, purificadas e ligadas ao adaptador do Kit, 40 µL de água Milli-Q estéril, 5 µL 10X Advantage 2 PCR Buffer, 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL AP1 (10 µM), 1 µL Advantage 2 Polymerase Mix (50X) (Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase Mix, Clontech) e 1 µL GSP1, com volume final de 50 µL. Seguindo as recomendações do kit, foram feitos dois controles negativos substituindo-se o DNA por água, e dois positivos, o primeiro utilizando o DNA fornecido no kit (control human genomic DNA) e o segundo consistindo de uma biblioteca também fornecida no kit. As reações foram incubadas em termociclador com os seguintes parâmetros: 7 ciclos de 94 °C por 25 segundos e 72 °C por 3 min; 37 ciclos de 94 °C por 25 segundos e 67 °C por 3 min; e um ciclo final de 67 °C por 7 min. Uma alíquota de 5 µL da PCR foi analisada em gel agarose a 0,8% corado com Syber.

### 3.2.6. PCR secundária

Para a PCR secundária, foi feita uma diluição dos produtos da PCR primária de 1:49 (v/v) (PCR: água Milli-Q estéril, v/v), incluindo os controles, utilizando-se 1 µL de cada diluição, 40 µL de água Milli-Q estéril, 5 µL 10X Advantage 2 PCR Buffer, 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL AP2 (10 µM), 1 µL Advantage 2 Polymerase Mix (50X) e 1 µL GSP2, totalizando 50 µL. As reações foram incubadas em termociclador com os seguintes parâmetros: 5 ciclos de 94 °C por 25 seg e 72 °C por 3 min; 25 ciclos de 94 °C por 25 seg e 67 °C por 3 min; e um ciclo final de 67 °C por 7 min. Para a análise das reações, 5 µL de cada PCR foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% e corado com Syber.

### 3.2.7. Purificação dos fragmentos de PCR em gel de agarose

Os 45 µL restantes da PCR secundária foram purificados em gel de agarose utilizando o Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit (Invitek). Para este procedimento, os fragmentos foram cortados do gel, colocados em microtubos e pesados, adicionou-se 500 µL de Gel Solubilizer S para aqueles fragmentos com até 150 mg e 1 mL para aqueles maiores que 150 mg. Os fragmentos foram incubados a 50 °C até o gel dissolver por completo; posteriormente

acrescentou-se 250  $\mu$ L do Binding Enhancer para as reações com até 500  $\mu$ L e 500  $\mu$ L para as que possuem 1 mL, misturou-se. Transferiu-se 800  $\mu$ L para o Spin Filter, centrifugou-se a 12 000 x g por 1 min, descartou-se o filtrado, para as amostras com volume maior centrifugou o restante, adicionou-se 500  $\mu$ L de Wash Buffer ao Spin Filter. Centrifugou a 12 000 x g por 30 seg, descartou-se o filtrado e repetiu a lavagem. Para remover o álcool residual da lavagem, centrifugou-se por mais 4 min. Transferiu-se o Spin Filter para um novo tubo e adicionou-se 30  $\mu$ L do Elution Buffer no centro do filtro, incubou-se a temperatura ambiente por 10 min; e centrifugou-se a 12 000 x g por 1 min. Depois de purificados os produtos foram quantificados em biofotômetro (260 nm) (Eppendorf BioPhotometer Plus), para posterior ligação no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).

### **3.2.8. Ligação dos fragmentos de PCR ao vetor de transformação de bactérias**

Para a ligação em pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), adicionou-se 5  $\mu$ L de 2X Rapid Ligation Buffer, 1  $\mu$ L pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (50 ng), 1  $\mu$ L T4 DNA Ligase (3 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de água estéril a 3  $\mu$ L dos produtos de PCR purificados (100 ng). Incubou-se em temperatura ambiente (25 °C) por 1 hora e posteriormente a 4 °C durante a noite. Os produtos ligados em pGEM<sup>®</sup>-T Easy foram utilizados para transformar células eletrocompetentes.

### **3.2.9. Preparo de células eletrocompetentes**

Células competentes de *Escherichia coli* da cepa XL1-Blue foram preparadas para posteriormente serem usadas na transformação bacteriana, utilizando a metodologia de Rader et al. (2000), com adaptações. Inoculou-se uma colônia isolada em 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) contendo tetraciclina a uma concentração final de 30  $\mu$ g/mL, incubou-se a 37 °C sob agitação de 250 x g durante à noite. Inoculou-se 7,5 mL em 250 mL de meio LB em um erlenmeyer de 1 L e incubou-se a 37 °C sob agitação de 250 x g até atingir densidade óptica (OD de 600 nm) igual a 0,7. Após atingir a OD o frasco foi resfriado no gelo por 15 min. Dividiu-se o volume da cultura em cinco tubos tipo falcon com 50 mL cada, centrifugou-se a 5000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram ressuspensos em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado em movimentos leves sobre o gelo, as células ressuspensas foram combinadas dois a dois, ficando um volume final de 50 mL, centrifugou-se a 5000 x g por 20

minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Novamente os precipitados foram ressuspensos em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado em movimentos leves sobre o gelo, as células ressuspensas foram combinadas dois a dois, restando apenas dois tubos. Adicionou-se mais 25 mL de glicerol 10% (v/v) em cada, combinando dois a dois, ficando apenas um tubo. Centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi descartado. Ressuspendeu-se as células no volume residual de glicerol, 1 a 2 mL. Alíquotas de 50 µL foram distribuídas em microtubos congelados em nitrogênio líquido, em seguida, foram estocadas a -80°C até sua utilização.

### **3.2.10. Transformação de células competentes por eletroporação**

Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação foi adicionada a 50 µL de células eletrocompetentes. A mistura foi colocada em cuveta de eletroporação (0,1 cm gap, Brown Cap) e submetida a pulso elétrico (voltagem: 1,80 Kv; capacitância: 25 µF; resistência: 200 Ω) utilizando eletroporador (BioRad). Após o choque, foram adicionados 500 µL de meio LB líquido à cuveta e transferido para um tubo falcon, em seguida incubado a 37 °C por uma hora sob agitação de 250 rpm. Uma alíquota de 150 µL foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (20 mg/mL) e IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (100 mM), como descrito por Sambrook et al. (2001).

### **3.2.11. Minipreparação do DNA plasmidial e sequenciamento**

Cerca de dez colônias brancas foram selecionadas, inoculadas, separadamente em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C sob agitação de 250 x g, durante a noite. Após incubação, as células foram concentradas por centrifugação a 14000 x g durante 1 min, e em seguida realizado minipreparação plasmidial utilizando o kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek), seguindo as recomendações do fabricante.

Uma digestão com *EcoRI* foi realizada para verificar a presença dos fragmentos clonados. Os insertos foram sequenciados usando os oligonucleotídeos iniciadores SP6 e T7 no sequenciador automático Applied Biosystems model 3700, na Plataforma de Sequenciamento da Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF.



### 3.2.12. Análise da sequência promotora do gene *ASH*

O programa ChromasPro (versão 2.4) foi utilizado para analisar a qualidade dos cromatogramas gerados no sequenciador. Para o agrupamento das sequências semelhantes (clusterização), foi utilizado o programa Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) (GIBSON et al., 1996).

A sequência promotora isolada do gene *ASH* foi analisada no PlantCARE (LESCOT et al., 2002), PLACE (*Plant cis-acting regulatory DNA elements* – HIGO et al., 1999) e PlantPAN (CHANG et al., 2008) em busca de elementos cis regulatórios. Cada software determina a localização e função dos elementos *Cis* presentes na região regulatória.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PCR em tempo real

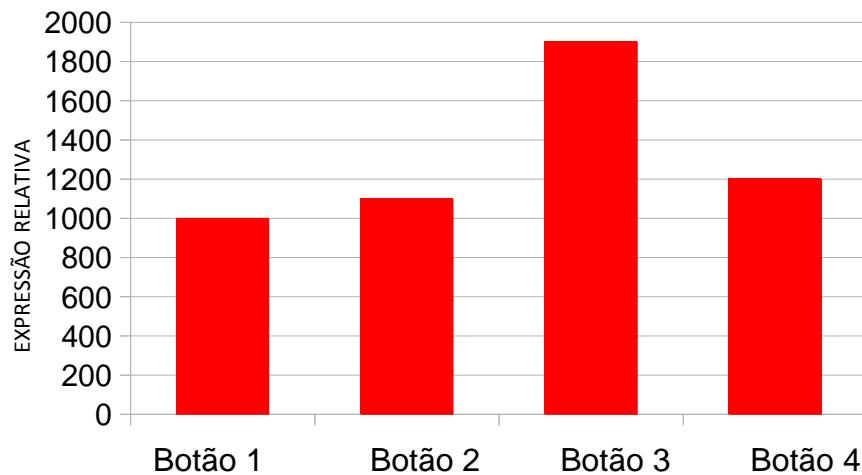
As análises de expressão relativa revelaram que o gene *ASH* foi expresso em todas as fases de desenvolvimento do botão floral, contudo observou-se maior expressão no botão de 14 a 16 mm, com nível de expressão 900, 800 e 700 vezes maior do que nas fases de 2 a 4 mm, 6 a 8 mm e 18 a 20 mm, respectivamente (Figura 6).

De acordo com Quintanilha (1962), na fase em que o botão floral encontra-se com 14 a 16 mm, apresenta elevada atividade celular incluindo redução da parede, como também se observa saco embrionário completo, surgimento e degeneração das antípodas.

Estudos em *A. thaliana* sugerem que as proteínas da classe *ASH* têm propriedades essenciais para determinação da identidade dos órgãos florais, desenvolvimento das anteras, estames e grãos de pólen (THORSTENSEN et al., 2008; GRINI et al., 2009).

A identificação de genes relacionados ao botão floral de algodoeiro é de grande importância, visto que existem diversos processos envolvidos, como por exemplo, a pigmentação da flor e fibra (KOES et al., 2005; XIAO et al., 2007), qualidade da fibra, especificamente a deposição de celulose (LEE et al., 2007) entre outros. Outro aspecto relevante está relacionado ao controle de doenças e pragas, onde existem diversas pragas que atacam as estruturas reprodutivas causando danos e, conseqüentemente, uma diminuição na produtividade. Uma das principais pragas que atacam essas estruturas é o bicudo do algodoeiro, este inseto perfura os botões florais, para se alimentar ou colocar seus ovos, desde o surgimento dos primeiros botões até o aparecimento das maçãs (GONDIM et al., 1999). Com a identificação do gene *ASH*

expresso em todas as fases de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro, o mesmo pode ser utilizado na identificação de suas sequências regulatórias *upstream* tecido específica, auxiliando assim, os programas de melhoramento genético do algodão.

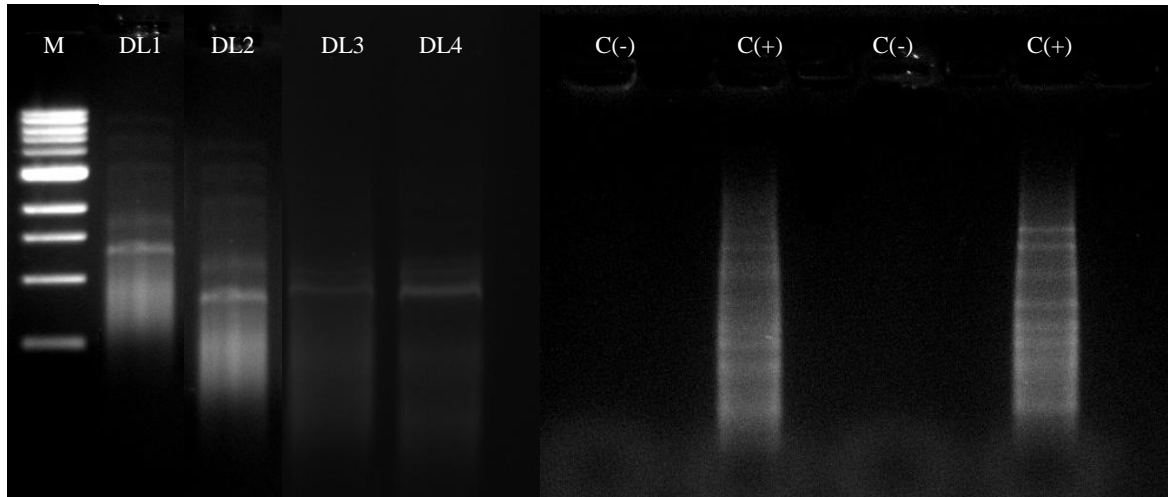


**Figura 6:** Análise da expressão relativa do gene *ASH* em quatro fases de desenvolvimento, por meio de qRT-PCR. Botão 1: botão floral de 2-4 mm; Botão 2: botão floral de 6-8 mm; Botão 3: botão floral de 14-16 mm; Botão 4: botão floral de 18-20 mm.

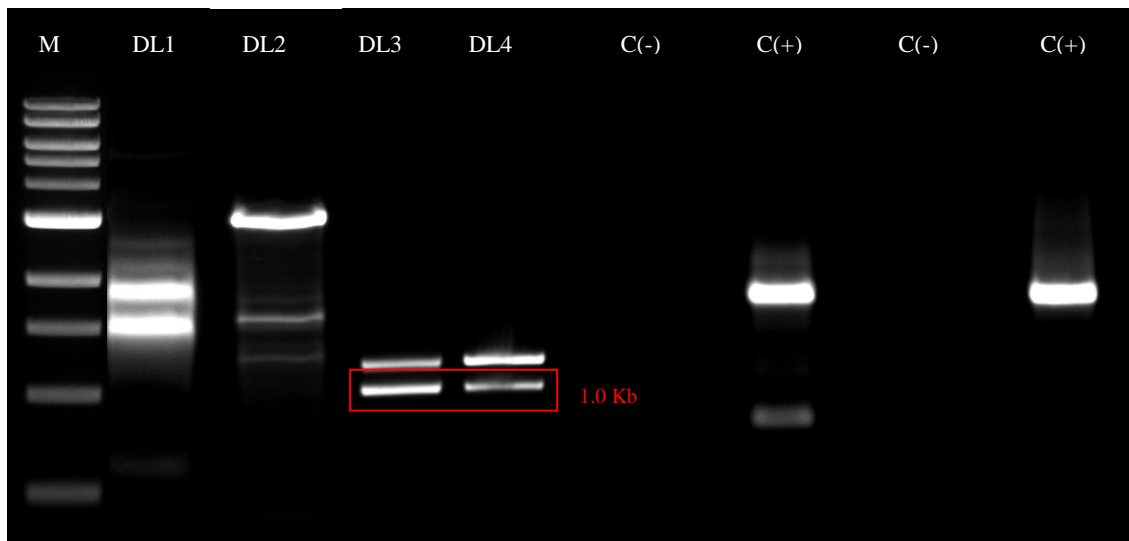
#### 4.2. Isolamento das regiões promotoras

Utilizando a técnica de GW para o isolamento da região promotora do gene *ASH* foram gerados vários fragmentos a partir da PCR primária, uma vez que os oligonucleotídeos utilizados foram empregados na região mais externa da sequência do gene (Figura 7).

A PCR secundária consiste de uma PCR NESTED, pois usa uma alíquota da PCR primária como molde e oligonucleotídeos mais internos à região amplificada. As bibliotecas DL1, DL2, DL3 e DL4 geraram fragmentos de 1.5 e 1.8 Kb, 1.2 e 1.5 Kb, 1.0 e 1.3 Kb, 1.0 e 1.3 Kb, respectivamente (Figura 8). Todos os fragmentos foram clonados e enviados para sequenciamento, mas apenas as bibliotecas DL3 e DL4, marcados na figura 8, foram recebidos a tempo para análises das sequências aqui apresentadas.



**Figura 7:** Produtos de amplificação obtidos para o gene *ASH* de botão floral após a PCR primária do *genome Walker*. DL1 a 4 são bibliotecas genômicas produzidas pela clivagem das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* respectivamente, C(-): controles negativos, onde substituíu o DNA por água, C(+): controles positivos, o primeiro utilizando o DNA fornecido no kit (control human genomic DNA) e o segundo consistindo de uma biblioteca também fornecida no kit.



**Figura 8:** Produtos de amplificação obtidos para o gene *ASH* de botão floral após a PCR secundária do *genome Walker*. DL1-4 são bibliotecas genômicas produzidas pela clivagem das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* respectivamente, C(-): controles negativos, onde substituíu o DNA por água, C(+): controles positivos, o primeiro utilizando o DNA fornecido no kit (control human genomic DNA) e o segundo consistindo de uma biblioteca também fornecida no kit. O destaque em vermelho são os fragmentos isolados a partir das duas bibliotecas e enviados para sequenciamento.

### 4.3. Análises *in silico* das sequências isoladas

Após sequenciamento foi realizado o alinhamento de duas sequências provenientes da DL3 e DL4, com 1 kb e 0,97 Kb, respectivamente. A sequência consenso de 509 pb está apresentada na Figura 9. Observa-se a diferença de 2 bases, em função disso, a sequência 1 foi escolhida para efetuar-se as buscas dos prováveis elementos *cis* regulatórios.

```

1      CGAACCTTGATGAGTCTATTTTCATATGGAAGAAGCGAAACGACCATATGAGCCGTATTT
2      CGAACCTTGATGAGTCTATTTTCATATGGAAGAAGCGAAACGACCATATGAGCCGTATTT
*****
1      TATGAGATGTTAAGTTTTTCATGAAACAGGGCCAGAACAGTTAGTGGATCCCTGTTCTG
2      TATGAGATGTTAAGTTTTTCATGAAACAGGGCCAGAACAGTTAGTGGATCCCTGTTCTG
*****
1      ACTTTGGAAATTTACCATAAATTAACCAAAAATGATTAGAAGTAATGCTTTATATGTA
2      ACTTTGGAAATTTACCATAAATTAACCAAAAATAATTAGAAGTAATGCTTTATATGTA
*****
1      GATTCCTTTTGGAGTCTAGTTTCATTAGAAACAAACGGCATATGTATTGAAGCCCTGTAC
2      GATTCCTTTTGGAGTCTAGTTTCATTAGAAACAAACGGCATATGTATTGAAGCCCTGTAC
*****
1      AGGGAGATATCTAAGTCGTAATGCATGAAGTTCAGAGTAGTCGAACCCTGAAATAGGGGA
2      AGGGAGATATCTAAGTCGTAATGCATGAAGTTCAGAGTAGTCGAACCCTGAAATAGGGGA
*****
1      GACTTTAACTAATAAACTGTAATAATTGGCCCGACCAAAAATCTAGAAAAAATCTGTA
2      GACTTTAACTAATAAACTGTAATAATTGGCCCGACCAAAAATCTAGAAAAAATCTGTA
*****
1      GATGGATATATGAGTCTAGTTTCAGGGAAAATTTTTGAGTCTGGAACCGATATATGA
2      GATGGATATATGAGTCTAGTTTCAGGGAAAATTTTTGAGTCTGGAACCGATATATGA
*****
1      TTTTACCAGCCCGGCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGTAATCACTAGTGAATTCGCG
2      TTTTACCAGCCCGGCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGTAATCACTAGTGAATTCGCG
*****
1      GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG
2      GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG
*****

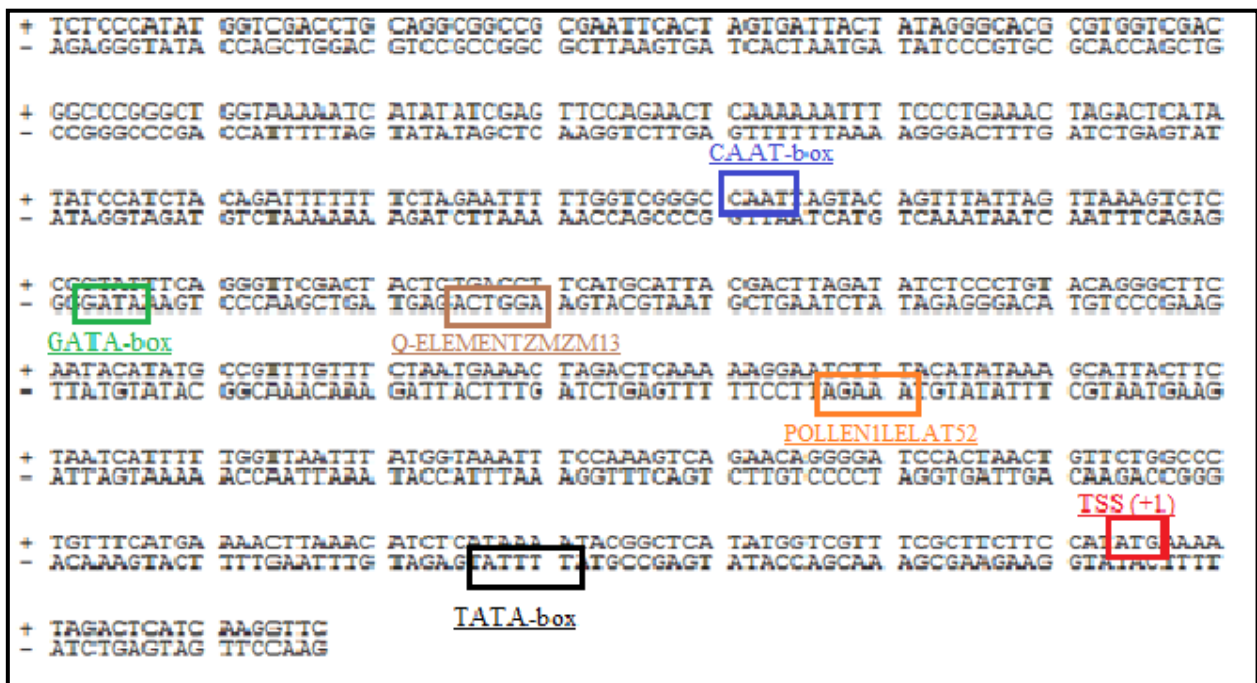
```

**Figura 9:** Alinhamento das duas sequências promotora do gene *ASH* proveniente das bibliotecas DL3 e DL4, utilizando-se do programa CLUSTALW, no qual o mesmo agrupa as sequências semelhantes. Pares de bases em destaque são as diferenças encontradas pelo alinhamento.

A sequência reguladora obtida foi analisada em vários bancos de análise de promotores. Os bancos de dados utilizados para as buscas dos elementos *cis* regulatórios possuem suas limitações, ou seja, alguns elementos são identificados em determinado banco e não são encontrados em outro. Diante disso, utilizamos três bancos de dados: PLACE, PlantCARE e PlantPAN.

Os resultados obtidos nas análises computacionais da região promotora, utilizando-se desses softwares, revelaram a presença de elementos regulatórios geral e específicos.

As análises *in silico* no PlantCARE revelaram a presença de elementos *cis* regulatórios comumente encontrados em regiões promotoras de plantas, como o TATA-box, localizado a -30 do TSS, com a função de elemento do *core promoter* (Figura 10), ele tem é responsável pelo primeiro passo na formação do complexo de iniciação da transcrição, ele é reconhecido pelo complexo de multiproteínas TFIID, que possui a proteína TATA *binding protein* (TBP) (SMALE e KADONAGA, 2003).



**Figura 10:** Análise computacional da sequência promotora do gene *ASH*, de 509 pb, proveniente do alinhamento, com auxílio do banco de dados do PlantCARE e PLACE. As sequências destacadas em preto, verde e azul representam a localização dos elementos *cis* conservados, laranja e marrom são os elementos *cis* específicos de órgão floral, e o em vermelho é o sítio de início da transcrição (TSS).

O CAAT-box foi identificado no promotor do gene *ASH*, pelo PLACE nas posições +182 e +281 e pelo PlantCARE a +280 e +181 (Figura 10). É o maior determinante da eficiência do promotor, devido a sua suscetibilidade a mutações. Talvez ele não tenha relação direta na

especificidade do promotor, mas sua inserção eleva a força do mesmo (LEWIN, 2001; CHEN et al., 2010).

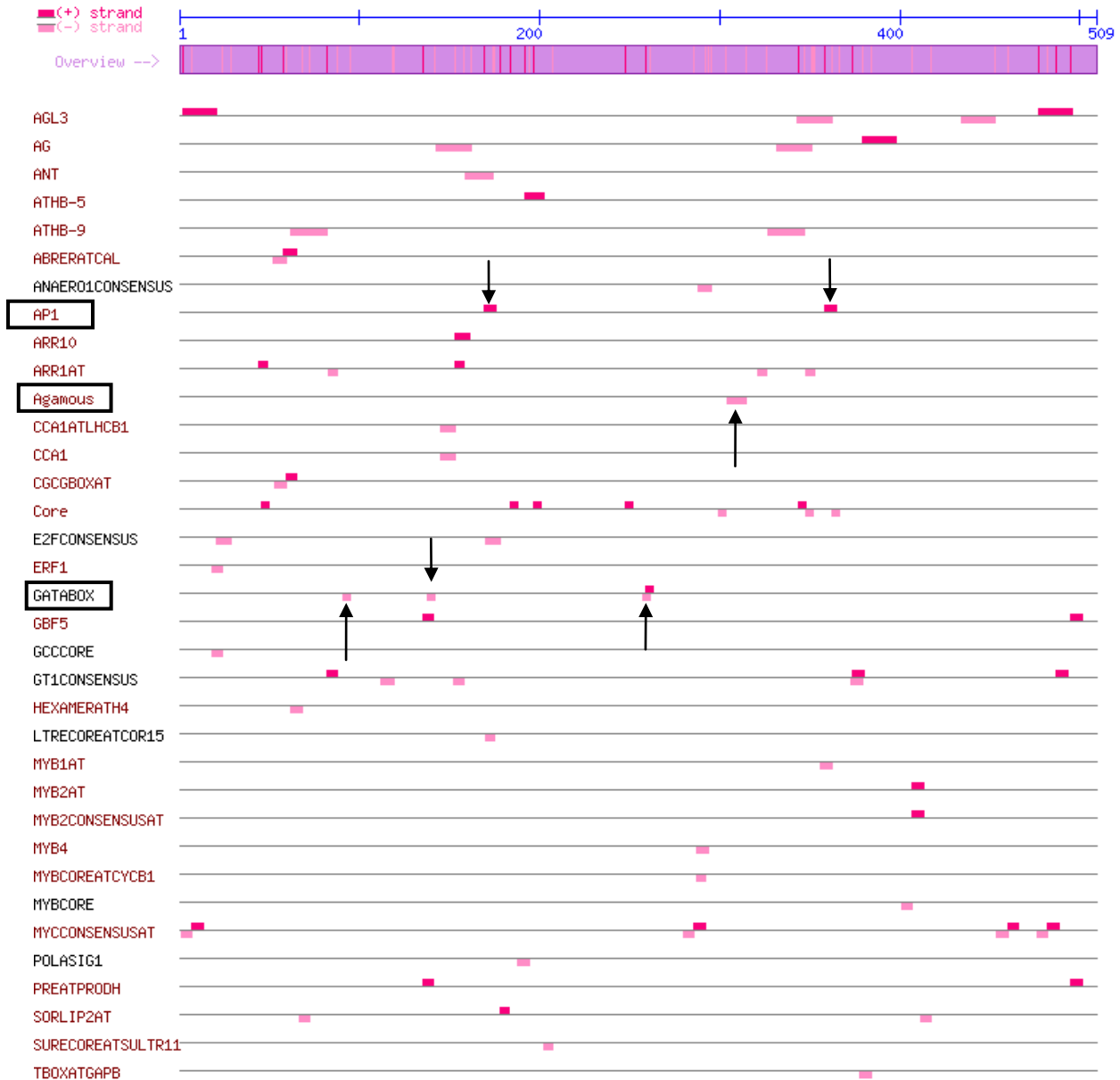
Outro elemento conservado encontrado foi o GATA-box, localizado nas posições +259, -95 e -142 no PLACE, e -142, +259, -261 e -95 pelo PlantPAN (Figura 10 e 11, respectivamente). Ele tem como principais funções a expressão tecido-específica e ser responsivo a luz. De acordo com Reyes et al. (2004) os fatores de transcrição GATA, fazem parte de um grupo de proteínas de ligação ao DNA amplamente distribuídos em eucariotos. Xu et al. (2013) identificaram seis cópias do GATA box em promotor de *Ginkgo biloba*, nas posições 129, 226, 299, 493, 360 com a função de resposta a luz. Kurita et al. (2013) também identificaram o GATA-box no promotor *CjMALE1* de falso-cedro-do-Japão (*Cryptomeria japonica*), nas posições -1,029(+), -939(+), -814(+), -441(-), -294(-) com funções de regulação a estímulos de luz, e expressão tecido específico.

Além da presença de elementos típicos de regiões promotoras de eucariotos, como os citados acima, outros elementos chaves foram encontrados que corroboram para a provável função fisiológica do gene em estudo, como o elemento POLLEN1LELAT52, que foi encontrado em duas cópias pelo PLACE, localizados nas posições -160 e -299, possuindo sequência consenso AGAAA e tem como principal função a expressão específica no pólen (Figura 11) (BATE e TWELL, 1998). Filichkin et al. (2004) isolaram o promotor LeMAN5 em tomate (*Lycopersicon esculentum*) e identificaram a presença de quatro cópias do elemento *cis* POLLEN1LELAT52, que por meio de ensaios com o gene repórter GUS detectou sua expressão em antera, durante as fases tardias de desenvolvimento, e no pólen, durante sua maturação.

Outro elemento específico de pólen encontrado, pelo PLACE, em uma única cópia foi o Q-ELEMENTZM13, que está localizado -236 e possui sequência AGGTCA. Hamilton et al. (1998) identificaram no promotor do gene ZM13 de milho esse elemento, específico de pólen, sendo muito ativo tanto em pólen de monocotiledôneas e dicotiledôneas (GUERRERO et al., 1990; MYOSHI et al., 1995).

Kurita et al. (2013) identificaram POLLEN1LELAT52 nas posições -811(+), -639(+), -156(+), -786(-), -612(-), -574(-), -266(-), -23(-) e Q-ELEMENTZM13 na posição -915(+) no promotor *CjMALE1* de falso-cedro-do-Japão (*Cryptomeria japonica*), ambos também com função de ativar a transcrição do gene específico de pólen. Yu et al. (2012) também detectaram o POLLEN1LELAT52 no promotor *GhWRKY15* de algodão, nas posições -82 (+), -163 (+), -306 (+), -345 (+), sendo um elemento tecido específico.

O promotor do gene *ASH* isolado neste trabalho indica ser um forte promotor específico de botão floral de algodoeiro, uma vez que foi identificado elementos *cis* regulatórios específicos de pólen, em várias cópias na região promotora. A tecido-especificidade está relacionada a elementos específicos presentes na sequência isolada.



**Figura 11:** Análise dos elementos *cis* gerado pelo PlantPAN, mostrando a localização dos mesmos na sequência do promotor do gene *ASH*. Os elementos sublinhados são aqueles considerados como frequentes, GATABOX, e que atuam em órgãos florais AP1 e AGAMOUS; as setas indicam sua localização na sequência regulatória.



O elemento AP1 localizado nas posições +169 e +358, com sequência TTTTTGG e TTTTTGG, respectivamente, e o elemento AGAMOUS, localizado na posição -315, com sequência ACTCAAAAAGG, foram identificados no promotor do gene *ASH*, pelo PlanPAN (Figura 11). Angelo (2005) identificou o *AGAMOUS* na posição -300 da região regulatória do gene para Sp41, em fumo. Ambos os elementos pertencem a família dos genes denominados fatores transcricionais MADS-box, que atuam também em órgãos reprodutivos e são bastante estudados devido a sua relevância na elucidação da identidade de órgãos florais através do modelo “ABCE” que explica as classes de genes relacionados ao surgimento dos quatro verticilos florais (pétalas, sépalas, carpelos e estames) (THEIBEIN et al., 2000; THEIBEIN, 2001). De acordo com Hill et al. (1998), os genes *LEAFY* (*LFY*) e *APETALA1* (*AP1*) são responsáveis pela adequada expressão do gene *APETALA3* (*AP3*), onde o mesmo está relacionado a processos que envolvem o desenvolvimento da pétala e estame em *A. thaliana*. Os genes *AGAMOUS*, *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA3* (*AP3*) 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).

Existem ainda outros elementos *cis* regulatórios que estão presentes no promotor em estudo, que não ocorrem com frequência como os citados acima, mas que foram comuns em dois bancos de dados (Tabela 2). Eles possuem as mais diversas funções, como o *ARR1AT*, encontrado em promotores de genes de resposta a infecção por bactérias ou fungos em nódulos de raiz (SAKAI et al., 2000); *MYCCONSENSUSAT*, está relacionado à resposta a estresse por frio e seca; *HSE*, *MBS*, *MYBCORE* e *MYB1AT*, são responsivos a estresses abióticos; *AE-box*, *GT1-motif* e *L-box* são elementos responsivos à luz; *ABRERATCAL*, elemento responsivo à íons  $Ca^{2+}$ ; *TCA-element*, envolvido na capacidade de resposta ao ácido salicílico; *TGA-element*, responsivo à auxina; entre outros. Esses elementos *cis* dão uma noção de funcionalidade do gene *ASH* no botão floral e sua resposta aos mais diversos estímulos da planta.

**Tabela 2:** Outros elementos *cis* encontrados no promotor do gene *ASH* pelos três bancos de dados.

<b>Elemento</b>	<b>Sequência</b>	<b>Posição</b>	<b>Banco de dados</b>
<b>ABRERATCAL</b>	MACGYGB/ CACGCGT ACGCGTG	+58 -59	PLACE/PlantPAN
<b>ANAERO1CONSENSUS</b>	AAACAAA/TTTGTTT	-295	PLACE/PlantPAN
<b>ARR1AT</b>	NGATT/ AGATT AATCT AATCA TGATT AATCA	+153 -326 -353 +44 -88	PLACE/PlantPAN
<b>CGCGBOXAT</b>	VCGCGB/ ACGCGT	+59/ -59 +59	PLACE/PlantPAN
<b>E2FCONSENSUS</b>	WTTSSCSS/ GGGCCAAT CCGCGAAT	-29 -178	PLACE/PlantPAN
<b>GCCCORE</b>	GGCGGC	-24	PLACE/PlantPAN
<b>GT1CONSENSUS</b>	GRWAAW/ GGTAAA ATTTTC TTTTCC TTTTTC GGTAAA ATTTCC GAAAAT	+82 +374 +487 -118 -379 -119 -158	PLACE/PlantPAN
<b>HEXAMERATH4</b>	CCGTCG/CGACGG	-68	PLACE/PlantPAN
<b>MYB1AT</b>	TGGTTA /WAACCA	-362	PLACE/PlantPAN
<b>AE-box</b>	AGAAACAA	-295	PlantCARE
<b>MYBCORE</b>	CNGTTR/ TAACTG	-407	PLACE/PlantPAN
<b>HSE</b>	AAAAAATTTTC AAAAAATTTTC	+112 +113	PlantCARE
<b>L-box</b>	AAATTAACCAAC/ AAATTAACCAA	-359/ -361	PlantCARE/PLACE
<b>TCA-element</b>	TCAGAAGAGG	+388	PlantCARE
<b>TGA-element</b>	AACGAC	-365	PlantCARE
<b>MYB2AT</b>	TAACTG	+407	PLACE/PlantPAN
<b>GT1-motif</b>	GGTTAAT	+362	PlantCARE
<b>MYB2CONSENSUSAT</b>	YAACKG/ TAACTG	+407	PLACE/PlantPAN
<b>MYBCOREATCYCB1</b>	AACGG/ CCGTT	-292	PLACE/PlantPAN
<b>MBS</b>	TAACTG	+406	PlantCARE

Tabela 2. Cont.

		+7	
		+286	
		+460	
<b>MYCCONSENSUSAT</b>	<b>CANNTG/ CATATG</b>	+482	<b>PLACE/PlantPAN</b>
		-7	
		-286	
		-460	
		-482	
<b>POLASIG1</b>	<b>AATAAA/ TTTATT</b>	-194	<b>PLACE/PlantPAN</b>
<b>PREATPRODH</b>	<b>ACTCAT</b>	+135	<b>PLACE/PlantPAN</b>
		+495	
<b>SORLIP2AT</b>	<b>GGCCC</b>	+178	<b>PLACE/PlantPAN</b>
		-417	
		-72	
<b>SURECOREATSULTR11</b>	<b>GAGAC</b>	-207	<b>PLACE/PlantPAN</b>
<b>TBOXATGAPB</b>	<b>ACTTTG</b>	-384	<b>PLACE/PlantPAN</b>

O promotor de botão floral de algodoeiro, isolado neste trabalho, tem potencial para ser utilizado em pesquisas envolvendo transgenia. No caso de desenvolvimento de plantas de algodão geneticamente modificadas (GM) resistentes a pragas que incidem nas estruturas reprodutivas, a identificação de promotores com alta expressão em botão floral, constitui um grande avanço, devido à possibilidade de aumentar a eficiência e a estabilidade da proteína expressa no tecido alvo, melhorando a desempenho do algodão GM em campo; ademais, poderá reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência por parte das pragas alvo, em função da alta dose de proteína expressa. Além disso, projetos biotecnológicos que visem a expressão de outras proteínas no botão floral, nos mais diversos objetivos podem testar esse promotor.

## 5. CONCLUSÕES

- O gene *ASH* apresentou elevada expressão em todas as fases de desenvolvimento do botão floral, com maior nível de expressão relativa na fase de 14 a 16 mm.
- Foi isolada uma sequência promotora com 509 pb.
- Identificou-se a presença de quatro elementos *cis* regulatórios (POLLEN1LELAT52, Q-ELEMENTZMZM13, AP1 e AGAMOUS) com atividade específica em órgãos florais, configurando-se o promotor encontrado como sendo de largo aproveitamento para posteriores estudos biotecnológicos para a cultura do algodão.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a obtenção de plantas transgênicas levou a um grande impacto na melhoria da cultura do algodão. Com a crescente demanda de focar a expressão gênica em determinados órgãos, várias pesquisas vem sendo desenvolvidas para isolar promotores tecido específicos, a fim de agregar valor aos transgenes.

Assim, a busca por essas sequências que regulam a expressão gênica tecido específica é uma das prioridades para o setor biotecnológico vegetal. O uso de promotores que se expressem principalmente nas regiões reprodutivas possibilita para que a transgenia seja uma potente arma de controle eficaz contra doenças e insetos, como também para qualquer processo que envolva a estrutura reprodutiva do algodoeiro.

O promotor do gene *ASH* isolado neste trabalho tem potencial para ser expresso em botão floral de algodoeiro e, assim, ser utilizado em trabalhos de transgenia do algodoeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; et al. Control of Gene Expression. In: (Ed.). **Molecular Biology of the Cell**. 4. New York: Garland Science, p. 375-466, 2002.
- ANGELO, P.C.S. Expressão gênica nos estigmas e estiletos de plantas da família Solanaceae: seqüências relacionadas com a patogênese. **Bragantia**, v. 64, n. 2, p. 177-184, 2005.
- BATE, N.; TWELL, D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. **Plant Molecular Biology**, v. 37, n. 5 p. 859–869, 1998.
- BELTRÃO, N.E.M.; AZEVEDO, D.M.P. de. **O agronegócio do Algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa, 2008.
- BENFEY, P.N.; CHUA, N.H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. **Science**, v. 250, p. 959-966, 1990.
- 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.
- BORÉM, A. Variedades transgênicas e meio ambiente – Segurança ambiental das variedades comerciais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, 2005.
- BRANDALISE, M. **Isolamento e caracterização de promotores tecido- específicos de raiz e folha de *Coffea arabica***. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu – SP, 2007.
- BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 50, p.349-383, 1981.

BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva do algodão**. MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: IICA: MAPA/SPA, Agronegócios, v. 4, p. 110, 2007.

BUTLER, J.E.F.; KADONAGA, J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, v.16, p.2583-2592, 2002.

CARVALHO, L. P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 251-270, 2008.

CHANG, W.C.; LEE, T.Y.; HUANG, H.D.; HUANG, H.Y.; PAN, R.L. "PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group". **BMC Genomics**, v. 9, p. 561, 2008

CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Nature**, v. 8, p. 93-103, 2007.

CHEN, L. ; TU, Z. ; HUSSAIN, J.; CONG, L.; YAN, Y.; JIN, L.; YANG, G.; HE, G. Isolation and heterologous transformation analysis of a pollen-specific promoter from wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Biology**, v. 37, p. 737-744, 2010.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – Safra 2012/2013**. Brasília: Conab, 2013.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, v. 18, n. 4, p. 675-89, 1992.

COSTA, C. S. **Caracterização de promotores de Eucalipto com expressão tecido-específica: raiz e folha**. **Dissertação**, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu – SP, 2011.

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.

DANIELL, H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nature Biotechnology**, v. 20, n.6, p. 581-586, 2002.

DEVIC, M.; ALBERT, S.; DELSENY, M.; ROSCOE, T.J. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 331-339, 1997.

FAO. **Food and Agricultural commodities production - production - countries by commodity - cottonseed - 2012- value**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p., 1998.

FESSELE, S.; MAIER, H.; ZISCHEK, C.; NELSON, P. J.; WERNER, T. Regulatory context is a crucial part of gene function. **Trends Genetics**, n.18, v. 2, p. 60-63, 2002.

FICKETT, J.W.; HATZIGEORGIOU, A.G. Eukaryotic Promoter Recognition. **Genome Research**, v. 7, p. 861-878, 1997.

FILICHKIN, S.A.; LEONARD, J.M.; MONTEROS, A.; LIU, P.P.; NONOGAKI, H. A novel endo-beta-mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1080-1087, 2004.

FREITAS, R. L. **Identificação de regiões no promotor do gene SBP2 (*Sucrose Binding Protein*) de soja que conferem expressão espacial específica.** Dissertação (*Magister Scientiae*), Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fisiologia Vegetal, Minas Gerais, 2007.

FRENKEL, B.; MIJNES, J.; ARONOW, M. A.; ZAMBETTI, G.; BANERJEE, C.; STEIN, J. L.; JANE, B. L.; STEIN, G. S. Position and orientation-selective silencer in protein-coding sequences of the rat osteocalcin gene. **Biochemistry**, v. 32, n. 49, p. 13636-13643, 1993.

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.

**GenomeWalker™ Universal Kit User Manual.** Cat. No. 638904, PT3042-1, (PR742239). Published 25 April 2007.

GIBSON, T.; HIGGINS, D.; THOMPSON J. CLUSTAL W, version 1.6, EMBL, Heidelberg, Germany and EMBL/EBI, Hinxton, UK, 1996.

GOLDBERG, M.L. **Sequence analysis of *Drosophila* histone genes.** Dissertação, Stanford University, Califórnia, 1979.

GONDIM, D. M. C.; JEAN-LOUIS, B.; SILVIE, P.; PEITI, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil.** 3a ed. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 120p. (B.T. N° 33), 1999.

GREEN, J., VAIN, P., FEARNEHOUGH, M.T., WORLAND, B., SNAPE, J.W., ATKINSON, H.J. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.197-205, 2002.

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.

GROSSI DE SA, M. F.; GUIMARÃES, L. M.; BATISTA, J. A. N.; VIANA, A.A.; FRAGOSO, R. D. R.; MATTAR DA, S. M.C. Compositions and methods for modifying gene expression



using the promoter of ubiquitin conjugating protein coding gene of soybean plants. **EMBRAPA**, 2010005539, 31, 2010.

GUERRERO, F.D.; CROSSLAND, L.; SMUTZER, G.S.; HAMILTON, D.A.; MASCARENHAS, J.P. Promoter sequences from a maize pollen-specific gene direct tissue-specific transcription in tobacco. **Molecular Gen Genetic**, v. 224, p. 161–168, 1990.

GRIFFITHS, A.J.; MILLER, J.H., SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W. M. **Regulation of gene transcription**. In: Modern Genetic Analysis, 3rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2000.

HAAG, J.R.; PIKAARD, C.S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of noncoding RNA for plants gene silencing. **Natures Reviews Molecular Cells Biology**, v. 2, n. 8, p. 483-492, 2011.

HAMILTON, D.A.; SCHWARZ, Y.H.; MASCARENHAS, J.P. A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. **Plant Molecular Biology**, v. 38, p. 663–669, 1998.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, 2007.

HIGO, K.; UGAWA Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. **Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database**, 1999.

HILL, T.A.; DAY, C.D.; ZONDLO, S. C.; THACKERAY A.G.; IRISH, V. F. Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA3*. **Development**, v. 125, p. 1711-1721, 1998.

HOCHHEIMER, A.; TJIAN, R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Gene Dev*, v. 17, n. 11, p. 1309-20, 2003.

HOSHINO, A.A. **Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos a partir das informações do SUCEST (“Sugarcane expressed sequence TAGS”)**. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2007.

HSU, C.; JENKINS, J.N.; SAHA, S.; MA, D. Transcriptional regulation of the lipid transfer protein gene LTP3 in cotton fibers by a novel MYB protein. **Plant Science**, v. 168, p. 167-181, 2005.

HUANG, N.; WU, L.; NANDI, S.; BOWMAN, E.; HUANG, J.; SUTLIFF, T.; RODRIGUEZ, R. L. The tissue-specific activity of a rice beta-glucanase promoter (*Gns9*) is used to select rice transformants. **Plant Science**, v.161, p.589-595, 2001.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Outubro de 2011. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default\\_publ\\_completa.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publ_completa.shtm)> publicação completa. Acesso em: 10 jan. 2013.

JOSHUA L. H.; JULIAN, S. T. F.; ALEXANDER, M. G.; DAVID, A.; WHELAN, J.; MILLAR, A. H. Experimental Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. **The Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 241–256, 2004.

KAMALADINI, H.; ABDULLAH, N. A S.; AZIZ, M. A., ISMAIL, I. B.; HADDADI, F.. Breaking-off tissue specific activity of the oil palm metallothionein-like gene promoter in  $T_1$  seedlings of tomato exposed to metal ions. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 3, p. 346–354, 2013.

KAY, R.; CHAN, A.; DALY, M.; MCPHERSON, J. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plants Genes. **Science**, v. 236, n. 4806, p. 1299-1302, 1987.

KIM, D. H.; KANG, J. G.; YANG, S. S.; CHUNG, K. S.; SONG, P. S.; PARKA, C. M. A Phytochrome-Associated Protein Phosphatase 2A Modulates Light Signals in flowering Time Control in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. v. 14, n. 12, p. 3043–3056, 2002.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A., TORRENS, D. B. I.; WARD, S. M. **Conceptos de genetic**, Prentice Hall, 2006.

KO, J.H.; KIM, H.T.; HWANG, I.; HAN, K.H. Tissue-type-specific transcriptome analysis identifies developing xylem-specific promoters in poplar. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1467-7652, 2012.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Plant Science**, vol. 10, n. 5, 2005.

KOLOVOS, P.; KNOCH, T. A.; GROSVELD, F. G.; COOK, P. R.; PAPANTONIS, A. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. **Epigenetics & Chromatin**, v. 5, n. 1, 2012.

KOMATSU, S.; et al. Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. **Plant Molecular Biology**, v. 77, n. 3, p. 309-322, 2011.

KONCZ, C.; DEGREVE, H.; ANDRE, D.; DEBOECK, F.; VANMONTAGU, M.; SCHELL, J. The opine synthase genes carried by TI plasmids contain all signals necessary for expression in plants. **EMBO Jornal**, v. 2, n.9, p. 1597-603, 1983.

KORNBERG, R.D. The molecular basis of eukaryotic transcription. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 104, n. 32, p. 12955- 12961, 2007.

KURITA, M.; KONAGAYA, K.; WATANABE, A.; KONDO, T.; ISHII, K.; TANIGUCHI, T. The promoter of an A9 homolog from the conifer *Cryptomeria japonica* imparts male strobilus-dominant expression in transgenic trees. **Plant Cell**, v. 32, p. 319–328, 2013.

- LEE, J. J.; WOODWARD, A.; CHEN, Z. J. Gene Expression Changes and Early Events in Cotton Fibre Development. **Annals of Botany**, v.100, n. 7, p. 1391–1401, 2007.
- LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; PEER, Y. V.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 325–327, 2002.
- LEWIN, B. **Genes VII**. Artmed Editora LTDA, Porto Alegre-RS, 2001, 955p.
- LI, L. M.; ARNOSTI, D.N. Long- and short-range transcriptional repressors induce distinct chromatin states on repressed genes. **Current Biology**, v. 21, p. 406-412, 2011.
- 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.
- LI, X.; FAN, X.; LANWANG, X.; CAI, L.; YANG, A. The cotton actin1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. **The Plant Cell**, v. 17, p. 859–875, 2005.
- 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.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L.S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Regulation of Transcription Initiation. In: (Ed.) **Molecular Cell Biology**, New York: W. H. Freeman; 2000.
- MEDEIROS, A. A.; GUEDES, F. X.; PEREIRA FILHO, J. E.; OLIVEIRA, L. M. **Fenologia do algodoeiro**. Natal: EMPARN, 22p, 2009.
- MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, v. 2, n. 2, p. 163-71, 1990.
- MCKIM, S. M.; STENVIK, G. E.; BUTENKO, M. A.; KRISTIENSEN, 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.
- MIYOSHI, H.; USAMI, T.; TANAKA, I. High levels of GUS gene expression driven by pollen-specific promoters in electroporated lily pollen protoplasts. **Sex Plant Reproduction**, v. 8, p. 205–209, 1995
- NAQPAL, P.; ELLIS, C. M.; WEBER, H.; PLOENSE, S.E.; BARKAWI, L. S.; GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G.; ALONSO, J. M.; COHEN, J. D.; FARMER, E. E.; ECKER, J. R.; REED, J. W. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, v. 132, n. 18, p. 4107-4118, 2005.

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.

NEUTEBOOM, L.W., KUNIMITSU, W.Y., WEBB, D., CHRISTOPHER, D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, v.163, p.1021-1035, 2002.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequence required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 810-812, 1985.

OHLER, U.; NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends in Genetics**, v.17, n.2, p.56- 60, 2001.

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.

OLIVEIRA, R.S.; OLIVEIRA NETO, O.B.; WANCHAO, N.; COSTA, P.H.A.; EVANGELISTA, I.B.R.; LEONARDECZ, E.; ROMANO, E.; COUTINHO, M.V.; VIANA, A.A.B.; SILVA, M.C.M.; ROCHA, T.L.; GROSSI DE SÁ, M. F. **Transformação de algodoeiro via tubo polínico: otimização e perspectivas de aplicação**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 7-12, 2007.

OHLER, U.; NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends Genet**, v.17, p.56-60, 2001.

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.

PASSOS, S.M.G. **Algodão**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola 424p, 1982.

PÉRIER, R. C.; JUNIER, T.; BUCHER, P. The Eukaryotic Promoter Database EPD. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 1, p. 353-357, 1998.

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

PINHEIRO, M. P. N. ; BATISTA, V.G.L. ; MARTINS, N.F. ; SANTOS, R. C. ; MELO FILHO, P.A. ; SILVA,C.R.C.; LIMA, L.M. . Genes expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) buds isolated by wit subtractive library. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 10.4238/2013-43, 2013.

PRASHANT, S.; SUNITA M. S. L.; SIRISHA, V. L.; BHASKAR V. V.; RAO A. M.; NARASU, M. L.; KISHOR, P. B. K. Isolation of cinnamoyl CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene promoters from *Leucaena leucocephala*, a leguminous tree species, and characterization of tissue-specific activity in transgenic tobacco. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 108, p. 421–436, 2012.

PREISZNER, J.; VANTOAI, T.; HUYNH, L.; BOLLA, R.; YEN, H. Structure and activity of a soybean Adh promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, v. 20, n.8, p. 763-769, 2001.

PRIBNOW, D. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 3, p. 784-788, 1975.

QUINTANILHA, A, P. S. **Boletim da Sociedade Broteriana**. Coimbra: Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, 1962.

RADER, C.;RITTER, G.; NATHAN, S.; ELIA, M.; GOUT, I.; JUNGBLUTH, A.A.; COHEN, L.S.; WELT, S.; OLD, L.J.; BARBAS, C.F. The rabbit antibody repertoire as novel source for generation of therapeutic human antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.13668-13676, 2000.

RANCE, I., NORRE, F., GRUBER, V., THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, v.162, p.833-842, 2002.

RASCO, G.; RASCO-GAUNT, S.; LIU, D.; LI, C.; DOHERTY, A.; HAGEMANN, K. ;RILEY, A.; THOMPSON, T.; BRUNKAN, C.; MITCHELL, M.;LOWE, K.; KREBBERS, E.; LAZZERI, P.; JAYNE, S.; RICE, D. Characterization of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. **Plant Cell**, v.6, n.21, p. 569-576, 2003.

REYES, J. C.; MURO-PASTOR, M. I.; FLORENCIO, F. J. The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1718–1732, 2004.

RIETHOVEN, J.J. M. Regulatory Regions in DNA: Promoters, Enhancers, Silencers, and Insulators. **Methods in Molecular Biology**, v. 674, p. 33-42, 2010.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, 2001.

SANTANA, R.H. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos de plantas de soja (*Glycyne Max*)**. Dissertação. Universidade de Brasília-DF, 2012.

SASSAKI, F.T. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do banco forests (*Eucalyptus* Genome Sequencing Project Consortium)**. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2008.

SEURINCK, J.; TRUETTNER, J.; GOLDBERG, R. B. The nucleotide sequence of an another-specific gene. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 11, p. 3403-3403, 1990.

SHELENKOV, A.; KOROTKOV, E. Search of regular sequences in promoters from eukaryotic genomes. **Computational Biology and Chemistry**, v. 33, p. 196-204, 2009.

SISTERSON, M. S.; CARRIERE, Y., DENNEHY, T. J., TABASHNIK, B. E. Nontarget effects of transgenic insecticidal crops: implications of source-sink population dynamics. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 121-127, 2007.

SMALE, S.T.; KADONAGA, J.T. The RNA polymerase II core promoter, **Annual Review Biochemistry**, v. 72, p. 449-479, 2003.

SNOW, J. W.; TROWBRIDGE, J. J.; FUJIWARA, T.; EMAMBOKUS, N. E.; GRASS, J. A.; ORKIN, S. H.; BRESNICK, E. H. A Single cis Element Maintains Repression of the Key Developmental Regulator Gata2. **PLOS Genetics**, n.9, v. 6, 12p, 2010.

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.

SONG, P.; HEINEN, J.L.; BURNS, T.H.; ALLEN, R.D. Expression of two tissue-specific promoters in transgenic cotton plants. **The Journal of Cotton Science**, v. 4, p. 217-223, 2000.

STEPHEN, T.S., JAMES T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annu. Rev. Biochem.**, v.72, p.449-479, 2003.

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.

SUNILKUMAR, G.; CAMPBELL, L.M.; HOSSEN, M.; CONNELL, J.P.; HERNANDEZ, E.; REDDY, A.S.; SMITH, C.W.; RATHORE, K.S. A comprehensive study of the use of a homologous promoter in antisense cotton lines exhibiting a high seed oleic acid phenotype. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, n. 3, p. 319-330, 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.

THEIBEN, G.; BECKER, A.; DI ROSA, A.; KANNO, A.; KIM, J. T.; MÜNSTER, T.; WINTER, K. U.; SAEDLER, H. A short history of MADS-genes in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 115-149, 2000.

THEIBEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 75-85, 2001.

THORSTENSEN, T.; GRINI, P.E.; MERCY, I.S.; ALM, V.; ERDAL, S.; AASLAND, R.; AALEN, R.B. The Arabidopsis SET-domain protein ASHR3 is involved in stamen development and interacts with the bHLH transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS). **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 47-59, 2008.

TWYMAN, R.M. Grow and development: Control of gene expression, regulation of transcription. **Encyclopedia of Applied Plant Science**. London UK: Elsevier Science, p. 558-567, 2003.

VANIYAMBADI, V.; SRIDHAR, A. S.; ZHONGCHI, L. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact with *SEUSS* to mediate transcription repression during flower development, **Development**, v. 133, n. 17, p. 3159-3166, 2006.

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.

WACLAWOVSKY, A. J.; FREITAS, R. L.; ROCHA, C. S.; CONTIM, L. A. S.; FONTES, E. P.B. Combinatorial regulation modules on *GmSBP2* promoter: A distal cis-regulatory domain confines the *SBP2* promoter activity to the vascular tissue in vegetative organs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1759, n. 1, p. 89-98, 2006.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Molecular Biology of the Gene**. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Benjamin Cummings, 6<sup>a</sup> Ed., 2008.

WRAY, G.A. ; HAHN, M.W.; ABOUHEIF, E.; BALHOFF, J.P.; PIZER, M.; ROCKMAN, M.V.; ROMANO, L.A. The evolution of transcriptional regulation in Eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 1377-1419, 2003.

WROBLEWSKI, T.; TOMCZAK, A.; MICHELMORE, R. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, p. 259-273, 2005.

XIAO, K.; ZHANG, C.; HARRISON, M.; WANG, Z.Y. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 15, p. 221-231, 2005.

XIAO, Y. H.; ZHANG, Z. S.; YIN, M. H.; LUO, M.; LI, X. B.; HOU, L.; PEI, Y. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 73-78, 2007.

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.

XU, F.; HUANG, X.H.; , LI, L.L.; DENG, G.; CHENG, H.; RONG, X.F.; LI, J.B.; CHENG, S.Y. Molecular cloning and characterization of GbDXS and GbGGPPS gene promoters from *Ginkgo biloba*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n.1, p. 293-301, 2013.

YE, R.; ZHOU, F.; LIN, Y. Two novel positive cis-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L ssp.). **Plant Cell**, v. 31, p. 1159–1172, 2012.

YU F.; HUAXIA, Y.; LU, W.; WU, C.; CAO, X.; GUO, X. GhWRKY15, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), is involved in disease resistance and plant development. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 144, 2012.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of computational biology**, v. 12, n. 8 p. 1047-1064, 2005.

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




**ANÁLISE PARCIAL *IN SILICO* DA ESTRUTURA DA REGIÃO 5'  
FLANQUEADORA DO GENE *ASH* EXPRESSO EM BOTÃO FLORAL DE  
ALGODOEIRO**

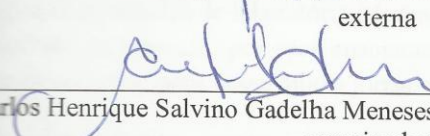
**MILENA SILVA PORTO**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.


aprovada em 20 de Março de 2013

Banca Examinadora:

  
Prof. Ana Heloneida de Araújo Moraes (D. Sc., Biologia Molecular) – UFRN, examinadora externa

  
Prof. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (Ph.D., Biologia Molecular) – UEPB, examinador interno

  
Prof. Roseane Cavalcanti dos Santos (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão (Coorientadora)

  
Prof. Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão (Orientadora)