

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO  
DO BOTÃO FLORAL DO ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* H.) POR  
MEIO DE RT-PCR E RT-qPCR**

**VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE – PB  
AGOSTO DE 2012**

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO  
DO BOTÃO FLORAL DO ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* H.) POR  
MEIO DE RT-PCR E RT-qPCR**

**VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA**

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

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

**CAMPINA GRANDE – PB  
AGOSTO DE 2012**

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

B333e

Batista, Vandré Guevara Lyra.

Expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento do botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* H.) por meio de RT-PCR e RT-qPCR [manuscrito] / Vandré Guevara Lyra Batista. – 2012.

42 f.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Liziane Maria de Lima, Embrapa Algodão”

“Co-Orientação: Prof. Dr. Roseane Cavalcanti dos Santos, Universidade Federal Rural do Pernambuco”

1. Genética vegetal. 2. Algodoeiro. 3. GenBank. I. Título.

21. ed. CDD 581.3

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM O  
DESENVOLVIMENTO DO BOTÃO FLORAL DO ALGODOEIRO  
(*Gossypium hirsutum* H.) POR MEIO DE RT-PCR E RT-qPCR**

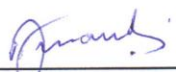
**VANDRÉ GUEVARA LYRA BATISTA**

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 22 de Agosto de 2012

Banca Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos Pfenning (D. Sc., Biologia Molecular) - UFCG

  
Prof. Pedro Dantas Fernandes (D. Sc., Fitotecnia) – UEPB

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

*Dedico este trabalho a minha família  
que sempre me deu suporte e atenção  
e a todos os meu amigos*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e paz em todos os momentos e a minha família por todo incentivo e apoio.

A Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias da UEPB/Embrapa pela realização deste trabalho.

A minha “mãorientadora” e exemplo de pessoa, Dr<sup>a</sup> Liziane Maria de Lima, pela orientação desde 2008, onde não faltaram palavras de incentivo, paciência, confiança e principalmente de conhecimento. Além dos “puxões de orelha”.

A Dr<sup>a</sup> Roseane Santos, pela coorientação e ao Prof. Péricles Melo Filho, gerente do Lab. de Expressão Gênica da UFRPE, agradeço a ambos pelos ensinamentos e pelo suporte de infraestrutura que contribuíram para execução do trabalho.

A Milena Silva Porto, minha noiva e companheira de jornada, por todo suporte emocional e companheirismo, imprescindíveis para o atingimento desta conquista.

Aos meus estimados amigos Morganna, Antônio, Geise, Pollyne, Patrícia, Joabson, Eveline, Fábria, Walesca, Suênia, pelo convívio sempre fraterno.

Aos colegas do Mestrado...

A Embrapa Algodão, a Finep e ao CNPq, pelo suporte financeiro; a Capes pela bolsa concedida

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1 Objetivo Geral</b>  | <b>15</b> |
| <b>1.2 Objetivos Específicos</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.1 Aspectos gerais da cultura do algodão</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.2 Anatomia da flor do algodoeiro e reprodução</b>   | <b>17</b> |
| <b>2.3 Melhoramento genético no algodoeiro</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.4 Regulação da expressão gênica em eucariotos</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.5 Genes expressos em estruturas reprodutivas do algodoeiro</b>  | <b>22</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.1 Análise <i>in silico</i> de genes que se expressam predominantemente em botão floral de algodoeiro</b>            | <b>25</b> |
| <b>3.2 Desenho de <i>primers</i> específicos</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.3 Material Vegetal</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA</b>   | <b>27</b> |
| <b>3.5 RT-PCR semiquantitativa</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.6 PCR em Tempo Real</b>   | <b>28</b> |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.1 Seleção de genes candidatos para estudos de expressão gênica no desenvolvimento do botão floral de algodoeiro</b> | <b>29</b> |
| <b>4.2 RT-PCR semiquantitativa</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.3 Expressão do gene em Tempo Real (RT-qPCR)</b>   | <b>32</b> |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>   | <b>35</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>36</b> |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Ciclo do algodoeiro   | 19 |
| <b>Tabela 2.</b> Genes relacionados com o botão floral de <i>G. hirsutum</i> e <i>A. thaliana</i>                      | 24 |
| <b>Tabela 3.</b> Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> selecionados.   | 26 |
| <b>Tabela 4.</b> . Eventos biológicos associados ao estágio de desenvolvimento do botão floral em <i>G. hirsutum</i> . | 27 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Secção longitudinal da flor do algodoeiro 18
- Figura 2.** Produtos da RT-PCR semiquantitativa em gel de agarose (0,8%) dos 31  
diferentes tecidos de *G.hirsutum*
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da extração de RNA total, tratado 32  
com DNaseI.
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da padronização do cDNA via 32  
RT-PCR com o gene da *actina*
- Figura 5.** Expressão relativa do *cottonbud10* em diferentes tecidos de algodoeiro e 34  
em diferentes fases de desenvolvimento.

## RESUMO

BATISTA, Vandr  Guevara Lyra. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Agosto, 2012. **Expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento do botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* H.) por meio de RT-PCR e RT-qPCR.**

Liziane Maria de Lima; Roseane Cavalcanti dos Santos.

A utiliza o de banco de dados públicos, gerados a partir de projetos genoma, como o NCBI, CottonDB, SUCEST, FORESTs, entre outros, é de grande relevância para estudos moleculares, especialmente aos relacionados a expressão gênica, uma vez que, de posse das sequências depositadas,   possível prospectar ou isolar novos genes e conhecer sua fun o em várias fases ontogenéticas. Em plantas, uma das fases de grande demanda de conhecimento é a relacionada com a reprodu o. Atualmente, vários estudos com *Arabidopsis thaliana* envolvendo identifica o e caracteriza o de genes associados aos órgãos reprodutores, especialmente a fenologia do botão floral, tem possibilitado grandes avanços no conhecimento de fun es, podendo correlacioná-las em outras espécies. Para espécies vegetais detentoras de grandes *commodities*, como algodão, tais resultados são relevantes, considerando que várias pesquisas desenvolvidas com essa cultura visam estudos que potencializem a expressão de características quantitativas dependentes da fisiologia de reprodu o. Neste trabalho, investigou-se a expressão temporal e espacial de genes que se expressam em botão floral de algodoeiro por meio de RT-PCR semiquantitativa e qPCR. Foram selecionados quatro genes com histórico prévio de

expressão em botão floral (*cottonbud7*, *cottonbud8*, *cottonbud9* e *cottonbud10*) e utilizados para desenho de *primers*. Amostras de tecidos de botões florais (2-8 mm; 10-12 mm e 14-20 mm), folhas, hastes e raízes foram coletadas e utilizadas para a extração de RNA total e síntese de cDNA. Os resultados das análises de expressão gênica mostraram expressão dos genes selecionados em todos os tecidos investigados, contudo os genes *cottonbud7* e *cottonbud10* apresentaram estabilidade da expressão em todas as fases investigadas do botão floral. Pôde-se observar ainda, que o *cottonbud10* apresentou nível de expressão levemente superior em botão floral, quando comparado aos demais genes. As análises de expressão do gene *cottonbud10* via qPCR corroboram com os resultados obtidos com o RT-PCR. Os resultados obtidos neste trabalho, fornecem informações sobre genes promissores para trabalhos de pesquisa envolvendo o programa de melhoramento do algodão.

**Palavras-chave:** GenBank, RNAm, Expressão gênica.

## ABSTRACT

The use of public database, generated from genome projects, such as NCBI, CottonDB, SUCEST FORESTs, among others, is of great importance for molecular studies, especially those related to gene expression, since, in possession of sequences deposited, it is possible to isolate new genes or prospect and know their role in various ontogenetic stages. In plants, a stage of great demand for knowledge is related to reproduction. Currently, several studies with *Arabidopsis thaliana* involving identification and characterization of genes associated with reproductive organs, especially the bud phenology, has enabled major advances in our understanding of functions and can correlate them with other species. For plant species possessing large commodities such as cotton, these results are relevant, considering that several studies developed with this aim culture studies that enhance the expression quantitative trait dependent physiology of reproduction. In this study, we investigated the temporal and spatial expression of genes that are expressed in cotton bud by semiquantitative RT-PCR and qPCR. We selected four genes with a history of expression in floral buds (cottonbud7, cottonbud8, and cottonbud9 cottonbud10) and used for primer design. Tissue samples of flower buds (2-8 mm, 10-12 mm and 14-20 mm), leaves, stems and roots were collected and used for total RNA extraction and cDNA synthesis. The results of gene expression analyzes showed expression of selected genes in all tissues investigated, though genes cottonbud7 cottonbud10 and showed a stable expression in all phases investigated bud. It was observed further that the cottonbud10 showed a slightly higher expression in floral bud, when compared to other genes. The analysis of

gene expression via cottonbud10 qPCR corroborate the results obtained with the RT-PCR. The results obtained in this study provide information about genes to promising research projects involving the improvement program for cotton.

**Keywords:** GenBank, mRNA, Gene expression.

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, novas informações geradas a partir das *omics*, amparadas pelas ferramentas da bioinformática têm contribuído expressivamente para a aceleração do conhecimento científico nas várias áreas da biotecnologia. Vários projetos de sequenciamento genômico têm sido realizados com o objetivo de compreender melhor os sistemas biológicos, cujos dados tem sido depositados em bancos de acesso livre que oferecem informações sobre sequências de genes exclusivas de organismos procariotos e eucariotos.

Para plantas superiores, vários bancos de genes encontram-se disponibilizados e acessíveis, o CottonDB, (algodão, *Gossypium* sp.) , SUCEST (cana-de-açúcar, *Saccharum* sp); FORESTS (eucalipto *Eucalyptus* sp; EST (café, *Coffea* sp), AGI (*Arabidopsis thaliana*), além do mais requisitado, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), que contem milhares de informações de genes de ampla natureza biológica.

A estratégia de prospecção de genes de interesse em genótipos sequenciados ou não sequenciados, através da utilização de informações geradas em projetos genoma ou proteoma, envolve etapas importantes como construção de bibliotecas de cDNA, triagem dessas bibliotecas, análise comparativa das sequências com os bancos de dados, identificação dos domínios conservados e desenho de *primers* (BINNECK, 2004).

Para o sucesso de trabalhos desta natureza, a definição do tecido alvo é imprescindível para conhecimento da função gênica e expressão. Para tanto, o conhecimento da fase fenológica e o *status* fisiológico são relevantes haja vista que derivações decorrentes de alterações bióticas ou abióticas respondem interativamente com o nível de expressão.

Para o caso de estudos envolvendo fenologia de estruturas reprodutivas, as fases que envolvem desde a iniciação do botão floral até a completa formação do fruto, envolvem síntese intensa de hormônios e novas proteínas, cujos genes codificadores, são ou de natureza temporal ou constitutiva. Tal conhecimento torna-se o ponto chave para identificação de suas funções e posterior uso em trabalhos de expressão e regulação gênicas.

Na literatura, vários genes associados a estruturas reprodutivas tem sido reportados, possibilitando consideráveis contribuições ao entendimento da fisiologia da reprodução em plantas. Tais estudos partiram, principalmente, de análises de mutantes em *Arabidopsis thaliana* (GEORGIADY et al., 2002). Esta espécie possui uma série de vantagens que explicam a sua escolha como planta modelo, além de possuir um genoma pequeno ( $2n=10$ ) completamente sequenciado, que serve de base para a busca de genes em outras espécies de plantas (AGI, 2000).

Com todas as informações disponíveis, a fisiologia de floração passou a ser compreendida como um processo que envolve múltiplas etapas, incluindo a indução e transição para um meristema apical reprodutivo, por meio da verificação dos sinais exógenos e endógenos, o estabelecimento de identidade dos órgãos, seguido pela identificação das estruturas florais (ZIK e IRISH, 2003).

O algodão é a principal fonte de fibra natural e também uma importante oleaginosa (ZHANG et al., 2002). Devido a aspectos únicos que envolvem sua reprodução, o gênero *Gossypium* tem atraído considerável interesse científico, não só entre os melhoristas de plantas, mas também entre os taxonomistas, geneticistas de desenvolvimentos e biólogos. (ADAMS et al., 2003; WANG et al., 2004; LIU et al., 2007; LIGHTFOOT et al., 2008)

Embora a cultura do algodão tenha obtido um grande avanço tecnológico, as ferramentas biotecnológicas podem acelerar o processo para o melhoramento e obtenção de novas cultivares. Técnicas que estimem a expressão de metabólitos primários, como RT-PCR semiquantitativa, *Northern blot* e qPCR, são de extrema importância para o melhorista porque podem auxiliar nos processos de seleção de descritores que atuam em tecido ou fase diferenciados, contribuindo adicionalmente para a ampliação do conhecimento das vias biossintéticas ali presentes.

Vários são os estudos envolvendo a identificação e expressão de genes em algodoeiro, durante as fases vegetativa e reprodutiva (BERG et al., 2005; NAQPAL et al., 2005).

Com intuito de agregar conhecimentos, o presente trabalho objetiva identificar e estimar a expressão de genes presentes em botões florais do algodoeiro.



## 1.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* H.) por meio de RT-PCR e RT-qPCR.

## 1.2 Objetivos específicos

- Selecionar genes de interesse em bancos de dados públicos
- Desenhar primers para os genes selecionados utilizando o programa Primer3
- Realizar análise comparativa entre as sequências de genes e proteínas utilizando o programa BLASTX
- Analisar a expressão gênica semiquantitativa via RT-PCR dos genes selecionados
- Validar a expressão gênica semiquantitativa de pelo menos um gene selecionado por RT-qPCR

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da cultura do algodão

O gênero *Gossypium*, família Malvaceae, que contem o algodão cultivado, possui mais de 56 espécies, sendo que destas apenas quatro são cultivadas, que são: *G. arboreum* H. e *G. herbaceu* H., ambas diploides ( $2n=2X=26$ ) e as alotetraploides ( $2n=4X=52$ ) *G. hirsutum* H. e *G. barbadense* H. (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

O algodão comercial (*G. hirsutum*) é cultivado em mais de 100 países, com área anual superior a 33 milhões de hectares (*Cotton World Statistics*, 2010). Trata-se de uma das maiores *commodities* mundiais, ao lado do petróleo, movimentando mais de 190 bilhões de dólares, só em produtos manufaturados. No Brasil, são movimentados cerca de 1,5 bilhões de reais por ano, empregando diretamente mais de um milhão de pessoas (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

Na safra de 2011/12, houve um crescimento na área plantada de algodão no Brasil, cerca de 1.403.000 ha, sendo o Mato Grosso o maior estado produtor, seguido da Bahia e Goiás (CONAB, 2012). O Brasil é o quinto maior produtor de algodão do mundo, precedido pela China, Índia, Turquia e Paquistão. No que diz respeito ao algodão geneticamente modificado, os Estados Unidos, Índia, China e Brasil são os maiores produtores.

Com os recentes avanços tecnológicos e industriais, o algodoeiro é considerado a planta de aproveitamento mais completo, onde quase tudo é aproveitado, principalmente a semente e a fibra. A semente é rica em óleo, com 18% a 25% (MEDEIROS et al., 2009) rerepresentando aproximadamente 65% do peso da produção, enquanto a fibra corresponde a 35% (BELTRÃO e

AZEVEDO, 2008). Algumas variedades que são plantadas atualmente tem maior porcentagem de fibra, chegando a atingir 40% da produção.

Um dos maiores interesse do algodão no mercado de *commodities* é que a cultura tem dupla vocação, atendendo tanto o segmento têxtil quanto o oleoquímico (BELTRÃO e PEREIRA, 2000). Os subprodutos da semente ou caroço são aproveitados na nutrição de ruminantes e na industrialização, com a produção de óleo refinado, manteiga vegetal, torta, farinha, concentrado proteico, plásticos biodegradáveis e produtos, como os derivados do línter (BELTRÃO e PEREIRA, 2000).

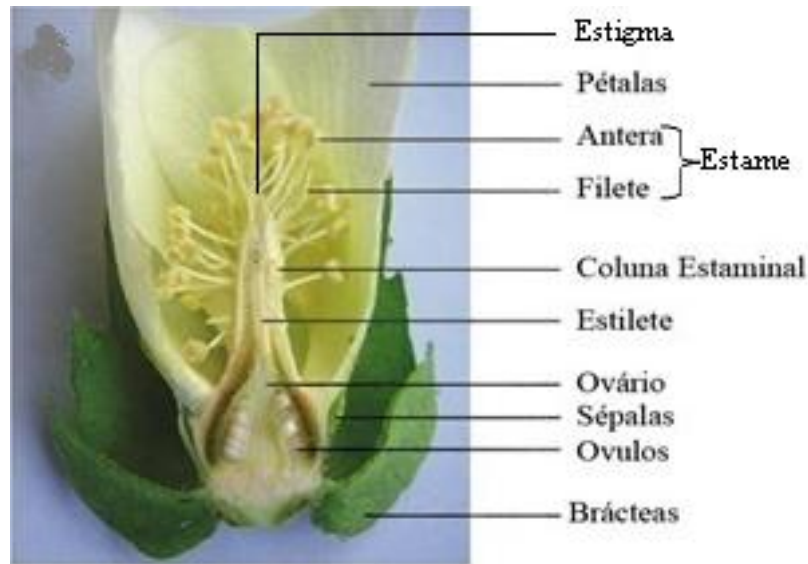
## 2.2 Anatomia da flor do algodoeiro e reprodução

O algodoeiro possui flores completas, com quatro verticilos florais.; são isoladas, pedunculares, actinomórficas e protegidas por três brácteas (PASSOS, 1982).

Na flor do algodoeiro (Figura 1) destaca-se, além dos verticilos de proteção, o androceu, que possui cerca de dez fileiras de estames, sendo o órgão masculino da flor, com colunas estaminais envolvendo o estilete até a altura do estigma. Cada filete possui uma antera de coloração creme e se encontra alinhado em cinco fileiras duplas longitudinais. As anteras apresentam um lóculo com deiscência longitudinal e são mesofixas.

O ovário é súpero, com três a cinco carpelos e três a cinco lóculos, com óvulos de placentação marginal-central e cada lóculo apresenta de oito a dez óvulos. Os grãos de pólen contêm 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 (OLIVEIRA, 2007).

As fibras do algodão são tricomas que se desenvolvem a partir da diferenciação da epiderme celular do tegumento do óvulo, após a fecundação (COUTINHO et al., 2005). Cada fibra é formada de uma única célula que se alonga cerca de 1 mm por dia, até atingir o tamanho final, que varia em função da cultivar e das condições edafoclimáticas. Em cada semente formam-se milhares de fibras, que variam em número, comprimento e espessura, de acordo com a espécie. Em *G. hirsutum* o número de fibras determinado em uma única semente pode variar entre 7000 e 15000 (FELTRIN, 2007).



**Figura 1** - Secção longitudinal da flor do algodoeiro.

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2007).

A floração do algodoeiro inicia-se por volta do 35º dia e tem duração de aproximadamente 60 dias, dependendo da cultivar e manejo da cultura. O botão floral, a partir do desenvolvimento meristemático, passa por diversas fases até culminar com a abertura da flor. Nesta fase, ela encontra-se apta para fertilização. Após esse período, a coloração das pétalas sofre uma mudança fisiológica, passando de creme ou amarelo para arroxeadado, devido a deposição de antocianinas, cujo sinal representa o início da fertilização (PASSOS, 1982; BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

Apesar do número de eventos que ocorrem concomitantemente, o ciclo do algodoeiro é dividido em fases de crescimento que se baseiam em função de suas fases fenológicas: vegetativa e reprodutiva (Tabela 1).

A fecundação do algodoeiro realiza-se em 2 fases: a polinização e a fecundação propriamente dita: a polinização, que consiste no transporte do grão de pólen para o estigma, área receptiva do pistilo, pode ser: direta (o pólen saído das anteras cai sobre o estigma da flor); indireta (quando o estigma recebe pólen por intervenção de vários agentes, tais como o vento, insetos, etc); e artificial (polinização feita por atuação do homem). A flor se abre, no geral, no período da manhã, quando o sol começa a esquentar; em dias mais frios e nublados, a abertura pode atrasar para o período da tarde. Com a abertura da antera os grãos de pólen ficam livres para a polinização (PASSOS, 1982).

Chegando o grão de pólen no estigma, inicia-se a fecundação propriamente dita, que por sua vez se divide em duas fases: a primeira consiste na germinação do pólen entre as papilas do estigma, a formação do tubo polínico e a descida até a micrópila do óvulo, depois de atravessar o estilete; a segunda consiste na entrada do tubo polínico pela micrópila, chegando ao saco embrionário e permitindo a saída dos anterozóides, que se fundem, um com a oosfera, produzindo o “ovo” (mais tarde o embrião) e o outro com o núcleo do saco embrionário. A flor, quando fecundada, torna-se de coloração roxa e no terceiro dia, as pétalas caem (PASSOS, 1982).

O aparecimento dos botões florais e a formação das flores estão relacionados diretamente com o crescimento vegetativo, devido ao aparecimento sucessivo de ramos frutíferos e de pontos florais nos ramos existentes. De acordo com Jackson e Arkin (1982), as folhas e estruturas reprodutivas competem entre si por assimilados disponíveis na planta. É muito importante, para o bom funcionamento do algodoeiro, o equilíbrio entre o crescimento vegetativo e o frutífero que são afetados pelas condições do ambiente, umidade, fertilidade do solo e temperatura que influencia significativamente na formação dos botões florais e das flores e, ainda, no crescimento e desenvolvimento das maçãs (SILVA et al., 2011).

**Tabela 1.** Ciclo do algodoeiro.

| <b>Estádio de desenvolvimento</b> | <b>Número de dias</b> |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Semeadura à emergência            | 5 – 9                 |
| Emergência ao primeiro botão      | 25 – 38               |
| Primeiro botão à primeira flor    | 20 – 25               |
| Emergência à primeira flor        | 47 – 63               |
| Primeira flor ao primeiro capulho | 40 – 66               |
| Emergência ao primeiro capulho    | 95 – 120              |

Fonte: Medeiros (2009).

### 2.3 Melhoramento genético do algodoeiro

O melhoramento genético tem gerado, juntamente com as tecnologias agregadas, uma série de benefícios agrícolas acessíveis aos produtores, além de relevantes processos no aspecto de segurança ambiental e alimentar.

As conquistas obtidas pelos métodos clássicos são importantes, mas tem ficado cada vez mais evidente que somente uma abordagem integrada, combinando as estratégias de melhoramento clássico e molecular pode permitir à agricultura e à indústria, encarar os atuais desafios e atender a crescente demanda mundial por seus derivados (LAKSHMANAN et al., 2005).

Há muitos anos, plantas de interesse da humanidade, vem sendo manipuladas por meio do melhoramento clássico, sendo que esses métodos convencionais possuem vários gargalos, dentre eles, a redução do *pool* gênico, a incompatibilidade sexual entre diferentes espécies, o tempo gasto para se obter uma característica desejada e a manutenção dessa característica ao longo das gerações (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1995).

O uso de ferramentas biotecnológicas contribuíram para um recente avanço no que diz respeito ao melhoramento genético de plantas. Para a agricultura, os métodos de transgenia possibilitaram a introdução de genes de interesse, que naturalmente seria “impossível” devido à incompatibilidade sexual, entre organismos filogeneticamente distantes (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1995; BELTRÃO e AZEVEDO, 2008). Atualmente, as ferramentas biotecnológicas vêm auxiliando os programas de melhoramento genético, principalmente na avaliação das linhagens durante seu processo de seleção, a fim de diminuir o tempo e os custos necessários para obtenção de uma cultivar melhorada.

Especificamente, no caso da melhoria da qualidade da fibra, as perspectivas são as mais amplas e melhores possíveis. Kiser (1995) reconhece a possibilidade de se adicionar novas características à fibra do algodão. O conhecimento da fisiologia da fibra tem sido ampliado após o desenvolvimento de um sistema de cultivo de óvulos proposto por Beasley et al. (1974). A partir de outros trabalhos que seguiram a mesma linha de conhecimento, variedades de algodoeiros com fibra colorida vem sendo estudados, e identificados genes responsáveis pela pigmentação da fibra (KOHEL, 1985; XIAO et al. 2007; TALIERCIO e HAIGLER, 2011)

Atualmente, o melhoramento genético visando a resistência à pragas, utiliza diferentes metodologias de transformação para síntese de plantas com propriedades inseticidas e herbicidas. No Brasil, só a partir de 2005, com a aprovação da lei dos transgênicos, que foi implantado o primeiro evento comercial geneticamente modificado, o algodoeiro Bollgard I, com propriedade

inseticida, transformado com o gene *CryIAc*, que confere resistência a lepdópteros (Monsanto; CTNBio 513/2005). Em seguida, várias outras empresas lançaram eventos que atendessem a demanda da cotonicultura mundial: LLCotton25, CTNBio 1521/2008, transformado com o gene *bar*, conferindo tolerância ao glufosinato de amônio (Bayer); MON 1445, 1598/2008, transformado com o gene *Cp4 epsps*, tolerante ao herbicida glifosato (Monsanto); 281-24-236/3006-210-23, CTNBio 1757/2009, transformado com o gene *CryIF* (Dow AgroSciences Industrial), entre outros.

## 2.4 Regulação da expressão gênica em eucariotos

A expressão gênica é o principal fator responsável pelos efeitos das interações genótipo x ambiente em todos os organismos, sendo, portanto, um importante componente da base genética para a mudança evolutiva em diversos aspectos (WRAY et al., 2003). Segundo Lewin (2000), existem vários mecanismos e fatores que regulam a expressão gênica, em eucariotos como, por exemplo, a condensação da cromatina, metilação do DNA, iniciação transcricional, “splicing” alternativo de RNA, estabilidade do RNA mensageiro, controles traducionais, diversas formas de modificações pós-traducionais, tráfego intracelular, degradação de proteína. Para cada gene eucariótico, a iniciação da transcrição parece ser o determinante primário de controle da expressão gênica (WRAY et al., 2003).

O principal componente para a regulação da expressão gênica é o promotor, uma vez que possuem os sítios de ligação para as RNAs polimerases, responsáveis pela transcrição gênica. A região promotora é uma região do DNA que marca o início da transcrição, compreendendo a região 5' da sequência transcrita, contendo, em geral, uma sequência conservada, o *TATA Box*, situado a aproximadamente 30 pb antes do sítio de início da transcrição, e elementos proximais do promotor, localizados a aproximadamente 100 pb (*CCAAT Box*) e 200 pb (*GC Box*) antes do ponto de início da transcrição (GRIFFITHS et al., 2000). Tais sequências determinam o ponto correto do início da transcrição e a taxa da transcrição, bem como o local e o momento em que este processo deverá ocorrer. Existem também outros elementos, que atuam a uma considerável distância do promotor (muitas vezes vários kilobases), os acentuadores e os silenciadores. Os acentuadores são elementos que podem aumentar a taxa de transcrição dos promotores, com isso, esses elementos atuam para ativar ou regular a transcrição. Os silenciadores são elementos que se ligam aos repressores, inibindo assim os ativadores, resultando na redução da transcrição (GRIFFITHS et al., 2002). Existem também proteínas reguladoras de ação *trans* que fazem parte do complexo de iniciação da transcrição, onde as mesmas se ligam aos elementos proximais de

ação *cis* do promotor, como por exemplo o complexo TFIID que se liga ao *TATA Box* (BUTLER e KADONAGA, 2002).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para identificar novos promotores com potencial para a expressão em tecidos ou órgãos específicos em diversas espécies vegetais. Chen et al. (2007) isolaram e caracterizaram o promotor do gene da subunidade menor da AGPase (*ADP-glucose pyrophosphorylase*) do endosperma de milho, o qual foi capaz de regular a expressão de maneira específica em sementes de tabaco. Freitas (2007) isolou o promotor do gene *SPB2* (*sucrose binding protein*) de soja, o 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. Já em algodoeiro foi isolado o promotor *GHACT1* relacionado ao alongamento da fibra, esse promotor pode ser utilizado para dirigir a expressão de genes visando o aumento na qualidade da fibra (LI et al., 2005), assim como os promotores *Gh-sp* isolados de sementes e *Gh-rbcS* isolados de cloroplastos de algodão, úteis para expressão de genes importantes em tecidos específicos (SONG et al., 2000). É de grande importância a identificação de genes que se expressem apenas em botão floral de algodoeiro, pois, a partir dessa identificação pode-se, no futuro, seguir na busca de suas regiões promotoras.

## **2.5 Genes expressos em estruturas reprodutivas do algodoeiro**

Vários estudos envolvendo genes que se expressam na fase reprodutiva do algodoeiro tem sido identificados e suas funções elucidadas. Organismos que possuem seu genoma sequenciado, como *Arabidopsis thaliana*, tem sido utilizados como referencial para identificar tais genes, comparando-os a sequências já disponíveis em banco de dados (AGI, 2000).

Entre os vários genes já descritos e sequenciados, citam-se alguns mais relevantes por estarem relacionados a estrutura e funções do botão floral do algodoeiro, quer sejam: O *ARF6*, envolvido com o desenvolvimento da flor e óvulo (NAQPAL et al., 2005); *ATFYPP3*, envolvido com a regulação negativa do desenvolvimento da flor (KIM et al., 2002); *ATRAB*, envolvido no crescimento do tubo polínico (JOSHUA et al., 2004); *SEUSS* e *CDKC2* relacionado ao desenvolvimento da flor (VANIYAMBADI et al., 2006; CUI et al., 2007); *BOP2*, envolvido com a morfogênese da flor e abscisão do órgão floral (MCKIM et al., 2008); *HEN1*, relacionado com a regulação do desenvolvimento da flor e formação da pétala (SUZUKI et al., 2002); *ROXY1*, envolvido com desenvolvimento da antera e pétala (XING et al., 2005); *ASH*, relacionado com o desenvolvimento da antera, pólen e óvulo (PINHEIRO et al., 2010). No que



diz respeito a pigmentação da fibra do algodão, alguns trabalhos identificaram genes envolvidos com a síntese de flavonoides, estes responsáveis pela pigmentação da flor e fibra (KOES et al., 2005; XIAO et al., 2007), em relação a qualidade da fibra, foram identificados alguns genes relacionados com a deposição de celulose na fibra (LEE et al., 2007). Uma síntese da função e dos processos biológicos a eles ligados encontra-se na Tabela 2.

Outros genes, denominados fatores transcricionais MADS-box, atuam também em estruturas florais e são bastante estudados devido a sua importância 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 e BECKER, 2000; THEIBEIN, 2001). Alguns exemplos de genes agrupados na classe dos genes MADS-box incluem: *AGAMOUS* (AG) em *A. thaliana* (YANOFSKY et al., 1990), *DEFICIENS* (DEF) em *Antirrhinum majus* (SOMMER et al., 1990; SCHWARZ et al., 1992), *GhSQUA-like 1* e *GhSQUA-like 2* relacionados ao desenvolvimento floral em *G. hirsutum* (NARDELI et al., 2009), entre outros. É de extrema importância a identificação de genes envolvidos com as estruturas reprodutivas do algodoeiro, pois a partir dessa identificação, é possível se obter informações úteis visando a melhoria genética dessa espécie.

**Tabela 2.** Genes relacionados com o botão floral em *G. hirsutum* e *A. thaliana*.

| <b>Gene</b>      | <b>Função</b>                        | <b>Espécie</b>                  | <b>Processo Biológico</b>                                | <b>Fonte</b>              |
|------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------|
| <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)       |
| <i>CDKC2</i>     | Kinase                               | <i>A. thaliana/ G. hirsutum</i> | Desenvolvimento da flor, carpelo e folha                 | Cui et al. (2007)         |
| <i>HEN1</i>      | RNA metiltransferase                 | <i>A. thaliana/ G. hirsutum</i> | Regulação do desenvolvimento da flor, formação da pétala | Suzuki et al. (2002)      |
| <i>ROXY1</i>     | Intermedia a troca de tiol-disulfite | <i>A. thaliana/ G. hirsutum</i> | Desenvolvimento da antera e pétala                       | Xing et al. (2005)        |
| <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)   |
| <i>OVA1</i>      | Ligante de ATP                       | <i>A. thaliana</i>              | Desenvolvimento do óvulo                                 | Berg et al. (2005)        |

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise *in silico* de genes expressos predominantemente em botão floral de algodoeiro

Inicialmente, foi realizada uma varredura nos bancos de dados públicos para selecionar genes relacionados ao botão floral. Dentre os genes selecionados, quatro candidatos foram identificados como expressos em *A. thaliana*, utilizando o banco de dados público GenBank (National Center for Biotechnology Information) NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Em seguida as sequências foram comparadas com outras contidas no banco de dados público de algodoeiro, Cotton Genome Database (<http://cottondb.org/>), para identificar a similaridade entre elas. Os quais foram pesquisados quanto a proteção intelectual e ao nível de investigação nos bancos de patentes como o *Patent Lens* (<http://www.patentlens.net>) e na literatura disponível na internet, respectivamente. Além disso, para as sequências homólogas de interesse foi realizado um estudo comparativo entre as sequências de aminoácidos a partir dos genes e proteínas similares utilizando a ferramenta BLASTX (NCBI).

#### 3.2 Desenho de *primers* específicos

Após a análise *in silico*, pares de *primers* específicos foram desenhados e sintetizados a partir das sequências selecionadas utilizando o programa computacional *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), seguindo os seguintes critérios: máximo de 20 pares de base (pb),

conteúdo de GC entre 45% a 50%, temperatura de anelamento até 60°C e *amplicons* de aproximadamente 200 pb (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos *primers* desenhados e sintetizados.

| Gene               | Sequência  |
|--------------------|--|
| <i>cottonbud7</i>  | 5' GAGTTGGCACCTGATAGTGA 3'<br>5' CCGAAGGACCCTGATTTATA 3' |
| <i>cottonbud8</i>  | 5' GGTAAAGAAGGCCAGCATC 3'<br>5' CTCGATCAACAAAATCTCCC 3'  |
| <i>cottonbud9</i>  | 5' GTGAGATCTCGACGTTGGAT 3'<br>5' TCAATTCCAATGGTAGCCTG 3' |
| <i>cottonbud10</i> | 5' CAAATGCGAAGAAGAAGTGG 3'<br>5' CGGGGCATATCAACATAAAG 3' |

### 3.3 Material Vegetal

Sementes da cultivar BRS 293 (*Gossypium. hirsutum* H.) foram semeadas em vasos de 20 L contendo solo previamente adubado e mantidos em casa de vegetação, na Embrapa Algodão em Campina Grande, PB, Brasil, sob fotoperíodo natural. A partir do início da floração, por volta do 35º dia, foram coletados botões florais em três fases de desenvolvimento, com diâmetro de 2-8 mm, 10-12 mm e 14-20 mm, além de folhas jovens, haste principal e raízes, todos nas respectivas datas de coleta, para posterior extração de RNAs. Os tecidos coletados foram imediatamente congelados em N<sub>2</sub> líquido e mantidos a -80°C até sua utilização. Na Tabela 4 estão representados alguns eventos biológicos associados ao estágio de desenvolvimento dos botões florais, nas fases de coleta.

**Tabela 4.** Eventos biológicos associados ao estágio de desenvolvimento do botão floral em *G. hirsutum*.

| Diâmetro botão floral | Evento   |
|-----------------------|--|
| 2-8 mm                | Micrósporos e anteras completamente separadas; óvulos em desenvolvimento       |
| 10-12 mm              | Tapetum degenerado; grãos de pólen binucleados; saco embrionário com 4 núcleos |
| 14-20 mm              | Redução das paredes das anteras; degeneração das antípodas                     |

Adaptado de Quintanilha et al. (1962).

### 3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Os tecidos vegetais com a mesma idade fenológica dos botões foram macerados em N<sub>2</sub> líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. O RNA total foi extraído utilizando o *Invisorb Kit* (Invitex), seguindo as recomendações do fabricante. A seguir, as amostras foram tratadas, com *DNase I* (BioLab), com a seguinte reação: 3 µg de RNA total, 3 µL de *DNase I* Reaction Buffer (10X), 1 µL de *DNase I* (2U/µL) para um volume final de 30 µL. As amostras foram incubadas à 37°C por 10 minutos, adicionando-se, posteriormente, 1 µL de EDTA (150 mMol/L) para parar a reação da enzima, seguindo uma incubação final à 75°C por 10 minutos para inativação da *DNase*. A pureza e concentração foram estimadas em gel de agarose (0,8%) e por espectrofotometria.

A síntese do cDNA foi feita utilizando o kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (Promega) a partir de 1 µg de RNA total. Primeiramente, adicionou-se 10 µL de RNA total (1 µg) e 1 µL de Oligo dT<sub>15</sub> (0,5 µg/µL) em um microtubo de 1,5 ml, e incubação à 70°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a reação de transcrição reversa nas seguintes condições: 11 µL da reação (RNA total + Oligo dT<sub>15</sub>); 8,8 µL de *ImProm-II<sup>TM</sup> 5X Reaction Buffer*; 10,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mMol); 2,2 µL de dNTP (10 mMol); 1,1 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/ µL); *ImProm-II<sup>TM</sup> RT* (25 U/µL) em um volume final de 44 µL. Finalmente, as

amostras foram incubadas em termociclador, primeiramente à 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos.

### 3.5 RT-PCR Semiquantitativa

Foram utilizados para as RT-PCRs, *primers* específicos, previamente desenhados, e os cDNAs obtidos no ensaio anterior. Cada reação constou de: 1 µL de cDNA; 2,5 µL de cada *primer* senso e antisenso (2 µM); 0,2 µL de Taq Polimerase (5 U/µL); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) e 2,5 µL de tampão (10X), para um volume final de 25 µL. As condições das RT-PCRs foram: pré-desnaturação à 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, anelamento à 59°C por 1 min e extensão à 72°C por 2 min. Uma extensão final foi adicionada à 94°C por 5 min.

Os produtos das reações foram analisadas em gel de agarose (0,8%) e fotodocumentados pelo programa Kodak. Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100 pb (Invitrogen).

### 3.7 PCR em Tempo Real

Para este estudo, foi utilizado o gene *cottonbud10* e os mesmos *primers* dos ensaios de RT-PCR (Tabela 3). A extração de RNA foi realizada conforme descrito anteriormente e a síntese de cDNA foi realizada utilizando o *SuperScript™ III* Reverse Transcriptase (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. Para garantir uniformidade dos resultados, uma padronização da quantidade de cDNA foi realizada a partir de RT-PCR utilizando os *primers* do gene da *actina* e análise quantitativa por meio de eletroforese em gel de agarose à 0,8%..

Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados 5 µL do *Evagreen* (Biotium), 0,2 µL de cada primer (10 µM), 2 µL de cDNA (diluído 1:20) e água para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, e por fim 60 °C por 1 minuto. Os gráficos, curva de Melt e Cqs foram gerados automaticamente pelo termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina) baseando-se no método de normalização com um gene de referência,  $\Delta\Delta Cq$  (LIVAK et al., 2001); para análise do padrão gerado foi utilizado a quantificação relativa. Reações com o gene da *actina* foram realizadas como controle endógeno. Visando determinar as variações na expressão gênica foi utilizado como controle da reação um pool das três fases de botão floral.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de genes candidatos para estudos de expressão gênica no desenvolvimento do botão floral de algodoeiro.

Dos vários genes pesquisados no banco de dados públicos do NCBI, quatro deles, expressos em botão floral de *Arabidopsis*, foram selecionados para pesquisa de homologia com genes depositados no banco de sequências de algodão (CottonDB). Os genes selecionados foram denominados de *cottonbud7*, *cottonbud8*, *cottonbud9* e *cottonbud10*, de modo a preservar a identidade dos mesmos visando posterior perspectiva de proteção intelectual.

A análise de similaridade de sequências, utilizando a ferramenta computacional BLASTn revelou 17 sequências homólogas ao produto do gene *cottonbud7*, estas sequências homólogas foram descritas como expressas em cloroplastos (5), núcleo (17) e no fruto (1); nove sequências homólogas à *cottonbud8*, expressas em tubo polínico (3) e núcleo (6); nove homólogas à *cottonbud9*, expressas em mitocôndria (9), tubo polínico (8), flor (8) e núcleo (1); e dez sequências homólogas à *cottonbud10*, onde foram descritas como expressas em núcleo (2) e flor (6).

A obtenção de ESTs a partir de bibliotecas de cDNA é uma poderosa estratégia para a descoberta de novos genes como também para avaliar seus perfis de expressão. A abundância de ESTs em uma biblioteca de cDNA reflete os níveis de expressão nos tecidos usados para extrair o RNA (OKUBO et al., 1992).

O banco de dados público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) possui milhares de sequências expressas ou não identificadas, de organismos sequenciados, como a *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Gallus gallus*, *Arabidopsis thaliana*, entre outros. Este banco possui uma ferramenta que permite comparar sequências de um organismo com sequências de bibliotecas depositadas de várias espécies vegetal e animal.

O gene *cottonbud7*, por exemplo, homólogo ao gene *ARF6* em *Arabidopsis*, participa de eventos relacionados ao desenvolvimento da flor e a resposta a estímulos por auxina, cujo hormônio é imprescindível para diferenciação dos tecidos e regulação de enraizamento adventício (GUTIERREZ et al., 2009; TABATA et al., 2009).

Já o gene *cottonbud8*, homólogo ao gene *ATFYPP3* em *Arabidopsis*, está envolvido à atividade de hidrolases no interior das células, além das etapas de floração, reprimindo ou acelerando o processo de acordo com o seu nível de expressão (KIM et al., 2002). Sua atividade está relacionada com a translocação dos fitocromos A e B relacionados com a floração em *A. thaliana* (KIRCHER et al., 1999; NAGY et al., 2000).

Quanto aos genes *cottonbud9* e *cottonbud10*, homólogos aos genes *ATRAB* e *SEUSS* em *Arabidopsis*, respectivamente, participam de processos relacionados ao órgão floral, sendo o primeiro envolvido com o grão de pólen e crescimento do tubo polínico e o segundo com a estrutura reprodutiva feminina, tendo como função principal a co-regulação transcricional (VANIYAMBADI et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2008; BAO et al., 2010). De acordo com Hashimoto et al. (2008), o *ATRAB* interage com o gene *MYA2*, que codifica a proteína miosina em plantas, participando da translocação de organelas no interior celular e segundo Johansen (2009) reporta que esse gene está localizado no aparelho de Golgi.

Em trabalho com café, Brandalise (2007) identificou apenas dois genes referentes ao tecido alvo; Sasaki (2008) identificou seis genes tecido-específico, dos 59 estudados, e observou que a baixa especificidade é devido ao fato que os genes apresentaram uma taxa de transcrição muito baixa em determinados órgãos, fazendo com não sejam amostrados durante a preparação das bibliotecas.

#### **4.2 RT-PCR semiquantitativa**

Os resultados obtidos por meio de RT-PCR semiquantitativa mostraram que, embora os quatro genes tenham sido selecionados por expressar atividade em botões florais, eles também apresentaram expressão nos demais tecidos, embora com níveis diferenciados (Figura 3).

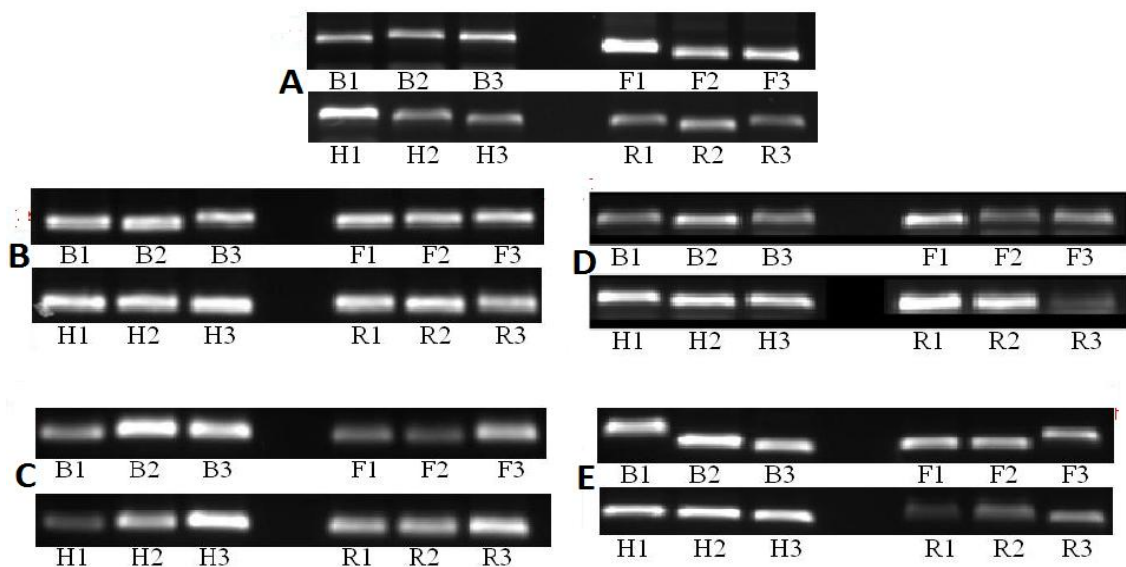


De forma geral, verificou-se que a expressão dos quatro genes no botão floral foi alta nas três fases de desenvolvimento, considerando-se o perfil qualitativo da *actina*, contudo, com exceção do *cottonbud7* (Fig. 3B), cujo perfil foi praticamente idêntico em todos os tecidos, e do *cottonbud8* (Fig. 3C), que revelou expressão idêntica nos botões florais e nas raízes, os dois restantes, *cottonbud9* e *cottonbud10*, revelaram expressão praticamente estável em botão floral, folhas e hastes (Figura 3D e E).

A interrelação nos níveis de expressão tissular verificada neste trabalho não descredencia a informação coletada nos bancos de dados, até porque, há de se considerar que mesmo obedecendo o maior rigor para a coleta do tecido a ser estudado, vários genes que revelam alto nível de expressão em uma determinada fase, pode estar também participando de eventos correlatos ou paralelos, demandados pelo evento fisiológico ao qual eles estão associados.

A expressão basal dos 4 genes estudados foi elevada em todos os tecidos analisados, quando comparados com o controle constitutivo *actina*, com padrão independente do desenvolvimento do botão floral.

No caso do presente estudo, os botões coletados para análise tinham, em comum com as hastes e folhas, pigmentos de antocianina, pêlos glandulares, pigmentos fotossintéticos, sem contar as próprias brácteas que, embora sejam estruturas reprodutivas, são também folhas modificadas que compartilham vários genes presentes nas folhas convencionais.



**Figura 2:** Produtos de RT-PCR semiquantitativa em gel de agarose (0,8%) dos diferentes tecidos de *G. hirsutum*, A) Controle positivo, *actina*; B) *cottonbud7*; C) *cottonbud8*; D) *cottonbud9* e E)

*cottonbud10*. (B) – Botão floral; (F) – Folha; (H) – Haste; (R) – Raiz. 1 – 2 a 8 mm; 2 – 10 a 12 mm; 3 - 14 a 20 mm.

Dessa forma, o nível praticamente uniforme de expressão observado com esse gene nas folhas e haste e botão floral, é procedente. Nas raízes, pelo que se percebe na Figura 3D, essa expressão é temporal, sendo de elevada atividade em R1 e R2 e expressiva queda a seguir.

Hoshino (2007) em trabalho com cana de açúcar, verificou por meio de RT-PCR semiquantitativa, que a maioria dos genes candidatos apresentaram expressão em raiz, semente e folha; em outro trabalho, Sasaki (2008), estudou a expressão de diferentes genes de eucalipto e apesar das ESTs evidenciarem expressão tecido-específica *in silico*, após análise via RT-PCR semiquantitativa, verificou que os genes foram expressos em mais de um tecido, fruto e botão floral. Em trabalho com café, Brandalise (2007) selecionou 28 ESTs sendo que, apenas 2 apresentaram perfil de expressão tecido/específica, uma em raiz e outra em folha. Esses resultados são suporte aos resultados encontrados neste trabalho.

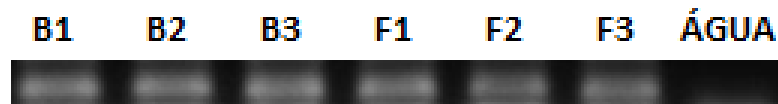
#### 4.3 Expressão do gene em Tempo Real (RT-qPCR)

Para as análises de expressão por meio de PCR em tempo real é fundamental utilizar-se RNA de alta qualidade (íntegro e puro) e padronizá-los por meio de eletroforese em gel de agarose para confirmação das quantidades similares de cada amostra a ser utilizada, a fim de evitar variações nos resultados de expressão gênica, tendo em vista ser uma técnica sensível e que requer pouquíssimo material inicial, em torno de 10 ng (JIAN et al., 2008).

Nas análises de RNA total para este trabalho, observou-se amostras de alta qualidade, livres de DNA e em quantidades equivalentes (Figura 4). Após a síntese do cDNA, foi realizada análise da qualidade e padronização das amostras por meio de RT-PCR e utilizando o gene constitutivo da *actina* como controle positivo (Figura 5).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da extração de RNA total, tratado com DNaseI. (B) – Botão floral; (F) – Folha; (H) – Haste; (R) – Raiz. 1 – 2 a 8 mm; 2 – 10 a 12 mm; 3 - 14 a 20 mm.



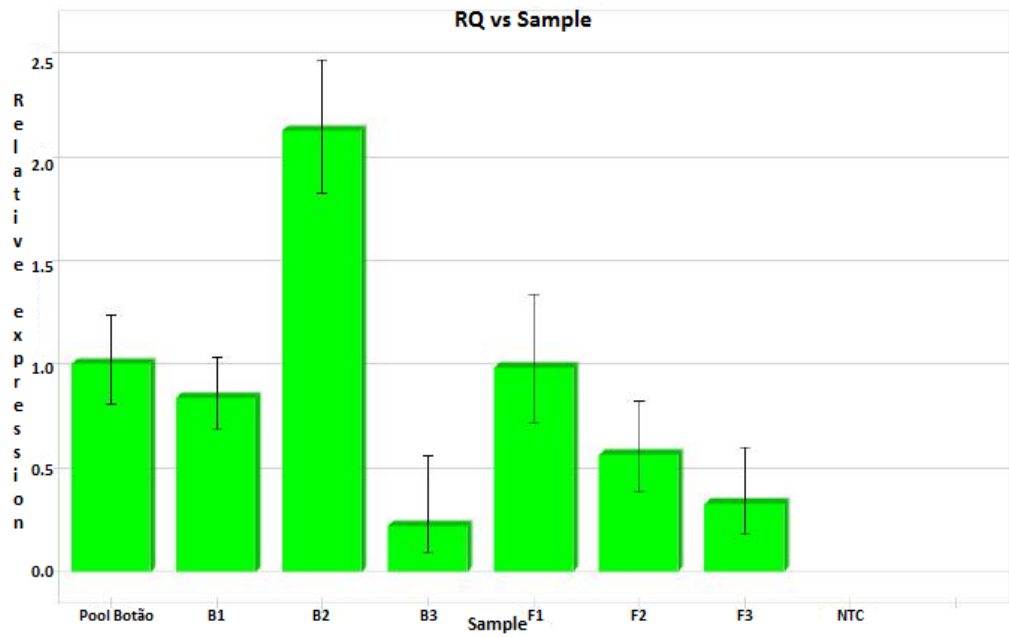
**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da padronização do cDNA via RT-PCR com o gene da *actina*. (B) – Botão floral; (F) – Folha; (H) – Haste; (R) – Raiz e água. 1 – 2 a 8 mm; 2 – 10 a 12 mm; 3 - 14 a 20 mm.

Para as análises de qPCR selecionou-se o *cottonbud10* por estar envolvido nos processos de floração e desenvolvimento do gineceu.

As análises de expressão relativa (Figura 6) revelaram que o gene *cottonbud10* foi expresso em maior quantidade em botões florais com 10 a 12 mm, com nível de expressão 2,52 e 9,21 vezes maior do que nos estágios de 2 a 8 mm e 14 a 20 mm, respectivamente.

Comparando-se com os perfis de expressão obtidos em folha, a atividade do gene *cottonbud10* nos botões com 10 a 12 mm foi superior a qualquer uma das amostras de folha respectivamente coletadas. Àrtico et al. (2009) observaram, por meio de qPCR, que os genes de algodão, *GhPGFS1*, *GhPGFS2*, *GhPGFS4* e *GhPGFS8* apresentaram nível de expressão maior em botões florais de algodoeiro nos diâmetros de 6, 10 e 12 mm, do que nos demais tecidos (raízes, folhas, haste, ramos e maçãs). De acordo com Quintanilha (1962), na fase em que o botão encontra-se com 10 a 12 mm, uma elevada atividade celular é detectada devido às várias divisões mitóticas no pólen e formação dos sacos embrionários. Tal diferenciação fisiológica justifica os resultados observados neste trabalho.

O *cottonbud10* tem homologia com o gene *SEUSS* de *Arabidopsis*, gene que codifica para uma proteína amplamente expressa em muitos estágios de desenvolvimento de diferentes tecidos. Análises funcionais indicam que o gene *SEUSS* desempenha várias funções no desenvolvimento da flor de *Arabidopsis*, mais especificamente no CMM (também denominado de cume medial do gineceu), uma estrutura meristemática vital localizada nas margens dos carpelos fundidos de *Arabidopsis* e dá origem a várias estruturas no aparelho reprodutor feminino, incluindo os óvulos (FRANKS et al., 2002; AZHAKANANDAM et al., 2008). O gene *SEUSS* também está relacionado à resposta da planta ao hormônio auxina, durante a floração (PFLUGER e ZAMBRYSKI, 2004). A auxina é um fitormônio responsável por vários processos na planta, como, alongamento do caule, dominância apical, formação da raiz, desenvolvimento de frutos e fototropismo (TAIZ e ZEIGER, 2009).



**Figura 5:** Expressão relativa do *cottonbud10* em diferentes tecidos de algodoeiro e em três fases de desenvolvimento. *Pool Botão* – mistura dos cDNAs de botões florais; B – Botão floral; F – Folha; NTC – amostra sem cDNA. 1 – 2 a 8 mm; 2 – 10 a 12 mm; 3 - 14 a 20 mm.

## 5. CONCLUSÕES

- Os genes selecionados *cottonbud7*, *cottonbud8*, *cottonbud9* e *cottonbud10* tem atividade em botões florais e em outros tecidos vegetativos do algodoeiro.
- O gene *cottonbud10* apresenta maior expressão em botões com 10 a 12 mm, fase essa que demanda elevada atividade celular para diferenciação do pólen e óvulo.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, K. L.; CRONN, R.; PERCIFIELD, R.; WENDEL, J. F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. **PNAS**, v. 100, p. 4649-4654, 2003.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, p. 796-815, 2000.

ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; ALVES, F. M. Desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle do bicudo-do-algodoeiro: Identificação de gene expressos exclusivamente em tecidos florais para clonagem e caracterização preliminar de promotores específicos de flor, Salvador, BA, 2008. In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2008, Salvador, BA. **Anais...**Salvador.

AZHAKANANDAM, S.; NOLE, W. S.; BAO, F.; FRANKS, R. G. *SEUSS* and *AINTEGUMENTA* mediate patterning and ovule initiation during gynoecium medial domain development. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 1165–1181, 2008.

BAO, F.; AZHAKANANDAM, S.; FRANKS, R. G.; SEUSS and SEUSS-LIKE Transcriptional Adaptors Regulate Floral and Embryonic Development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 821–836. 2010

BEASLEY, C. ; THING, L. P.; LINK, A. E.; BIRMBBAUM, E. H.; DELMER, D. P. Cotton ovule culture of review of progress and preview of potentiality, 1974, London: In: STREET, H. E. ed. Tissue culture and plant science. London: **Academic Press**, 1974. p. 169-172.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. de. **O agronegócio do Algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa, 2008.

BELTRÃO, N. E. M.; PEREIRA, J. R. A. **Semente do Algodoeiro I. Uso "In Natura" na Alimentação Animal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000. 3p. (Comunicado Técnico)

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

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

BRANDALISE, M. **Isolamento e caracterização de promotores tecido- específicos de raiz e folha de *coffea arábica***. Botucatu, 2007. 140f. Tese (Doutorado em Genética) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Estadual Paulista.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1995.

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.

CHEN, X.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, M.; ZHAO, L.; WANG, G. Isolation and characterization of Brittle2 promoter from *Zea Mays* and its comparison with Ze19 promoter in transgenic tobacco plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 88, p.11-20, 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: sexto levantamento da safra 2011/2012, março, 2012**. Disponível em: [http://conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_03\\_13\\_11\\_04\\_08\\_boletim\\_marco\\_2012.pdf](http://conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_13_11_04_08_boletim_marco_2012.pdf). Acesso em 20 mai. 2012.

COUTINHO, T. C.; LUCENA, W. A.; SCORTECCI, K. C.; VIDAL, M. S. Construção de biblioteca de cDNA de fibras de algodão e análise *in silico* de um dos clones isolado. In: V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: Embrapa Algodão, 2005.

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. **The Plant Cell**. v. 19, p. 1388-1402, 2007.

FELTRIN, E. B. **Produtividade e qualidade de fibra de cultivares de algodoeiro em função de doses de nitrogênio**. Ilha Solteira, 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista.

FRANKS, R. G.; WANG, C.; LEVIN, J. Z.; LIU, Z. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with *LEUNIG*. **Development**, v. 129, n. 1, p. 253–263. ,2002.

FREITAS, R. L. **Identificação de regiões no promotor do gene SBP2 (*Sucrose Binding Protein*) de soja que conferem expressão espacial específica**. Viçosa, 2007 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa.

GEORGIADY, M. S.; WHITKUS, R. W.; LORD, E. M. Genetic analysis of traits distinguishing outcrossing and self-pollinating forms of currant tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. **Genetics**. v.161, n. 1, p.333-344, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R. C. **Introdução a Genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2002.

GUTIERREZ, L.; BUSSELL, J. D.; SCHWAMBACH, J.; BELLINI, C. Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Is Controlled by Complex Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR* Transcripts and MicroRNA Abundance. **The Plant Cell**, Vol. 21, n. 10, p. 3119–3132, 2009.

HASHIMOTO, K.; IGARASHI, H.; MANO, S.; TAKENAKA, C.; SHIINA, T.; YAMAGUCHI, M.; DEMURA, T.; NISHIMURA, M.; SHIMMEN, T.; YOKOTA, E. An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. **Journal of Experimental Botany**, vol. 59, n. 13, p. 3523–3531, 2008.

HOSHINO, A. A. **Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos a partir das informações do SUCEST (*Sugarcane expressed sequence TAGS*)**. Botucatu, 2007. 143f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

ICAC - Cotton World Statistics. Washigton. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/50524325/ICAC-Cotton-World-Statistics-Bulletin-Sept-2010>. Acesso em 14 de mar. 2011.

JACKSON, B. S.; ARKIN, G. F. Fruit growth in a cotton simulation model, Phoenix, Arizona, 1982. In: BELTWISE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, 1982, Phoenix, Arizona. **Proceeding**. Phoenix: National Cotton Council, 1982, p.61-64.

JOHANSEN, J. N.; CHOW, C. M.; MOORE, I.; HAWES, C. AtRAB-H1b and AtRAB-H1c GTPases, homologues of the yeast Ypt6, target reporter proteins to the Golgi when expressed in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3179–3193, 2009.

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.

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.

KIRCHER, S.; KOZMA, B. L.; KIM, L.; ADAM, E.; HARTER, K.; SCHÄFER, E.; NAGY, F. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. **The Plant Cell**, v. 11, n. 8, p. 1445–1456, 1999.



KISER, J. Transgenic cotton products from Stoneville. Memphis, 1995. In: BELTWISE COTTON CONFERENCES, 1995, Memphis. **Proceedings Memphis**: National Cotton Council, 1995. p. 169-170.

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.

KOHEL R. J. Genetic analysis of fiber color variants in cotton, **Crop Science**. v. 25, p. 793–797, 1985.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane Biotechnology: the Challenges and Opportunities. **In Vitro Cell Dev Biol-Plant**, v. 41, p.345-363, 2005.

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.

LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

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, n. 2, 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, n. 3, p. 859–875, 2005.

LIGHTFOOT, D. J.; MALONE, K. M.; TIMMIS, J. N.; ORFORD, S. J. Evidence for alternative splicing of MADS-box transcripts in developing cotton fibre cells. **Molecular genetics and genomics**, v. 279, n. 1, p. 75-85, 2008.

LIU, Z. L.; ADAMS, K. L. Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. **Current biology**, v. 17, n.19, p. 1669-1674, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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

MEDEIROS, A. A.; GUEDES, F. X.; PEREIRA FILHO, J. E.; OLIVEIRA, L. M. **Fenologia do algodoeiro**. Natal: EMPARN, 2009.

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.

NAGY, F.; KIRCHER, S.; SCHÄFER, E. Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochromes. **Seminars in Cell & Development. Biology**, v. 11, n. 6, p. 505–510. 2000.

NARDELI, S. M.; ARTICO, S.; FERREIRA, A. M. Expressão de genes MADS-box - novas ferramentas biotecnológicas no combate ao bicudo-do-algodoeiro & seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Gossypium hirsutum*. In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia, SP. **Anais... Águas de Lindóia**, 2009.

OKUBO, K.; IJIMA, M.; KOBAYASHI, Y.; YOSHIKOSHI, M.; UCHIDA, T.; KUDOU, S. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, p.99-103, 1992.

OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; 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**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2007. 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 184).

ORFORD, S. J.; TIMMIS, J. N. Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibres. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**. v. 1398, n. 3, p. 342-346, 1998.

PASSOS, S. M. G. **Algodão**. Campinas: ICEA, 1982.

PFLUGER, J.; ZAMBRYSKI, P. The role of *SEUSS* in auxin response and floral organ patterning. **Development** v. 131, n. 19, p. 4697–4707, 2004.

PINHEIRO, M. P. N. **Prospecção de genes regulatórios e estruturais em botão floral de algodoeiro**. Recife, 2010. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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

SASSAKI, F. T. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do banco FORESTS (Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium)**. Botucatu, 2008. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SILVA, I. P. F.; JUNIOR, J. F. S.; ARALDI, R.; TANAKA, A. A.; GIROTTO, M.; BOSQUÊ, G. G.; LIMA, F. C.C. Estudo das fases fenológicas do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 20, 2011.

SOMMER, H.; BELTRÁN, J. P.; HUIJSER, P.; PAPE, H.; LÖNNING, W. E.; SAEDLER, H.; SOMMER, S. Z. Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*. The protein shows homology to transcription factors. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 3, p. 605-613, 1990.

SCHWARZ, S. Z.; HUE, I.; HUIJSER, P.; FLOR, P. J.; HANSEN, R.; TETENS, F.; LONNING, W. E.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Characterization of the Antirrhinum floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 1, p. 251-263, 1992.

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.

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.

TABATA, R.; IKEZAKI, M.; FUJIBE, T.; AIDA, M.; TIAN, C.; UENO, Y.; YAMAMOTO, K. T.; MACHIDA, Y.; NAKAMURA, K.; ISHIGURO, S. *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6* and *8* Regulate Jasmonic Acid Biosynthesis and Floral Organ Development via Repression of Class 1 *KNOX* Genes. **Plant e Cell Physiology**, v. 51, n. 1, p. 164-175, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **FISIOLOGIA VEGETAL**. Porto Alegre: ARTMED, 2006.

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.

TALIERCIO, E.; HAIGLER, C. H. The Effect of Calcium on Early Fiber Elongation in Cotton Ovule Culture, **The Journal of Cotton Science**, v. 15, p. 154-161, 2011.

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.

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.

TISKI, I.; PEREIRA, L. F. P.; MARRACCINI, P. R.; VIEIRA, L. G. E. Análise *in silico* e *in vivo* da via de isoprenóides em café, Brasília, DF, 2007. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Brasília, DF. Anais... Brasília: Embrapa Café, 2007.

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.

WANG, S. WANG, J. W.; YU, N. L. C. H.; LUO, B. G. Y.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Control of plat trichome development by a cotton fiber *MYB* gene. **Plant Cell**, v.16, n. 9, p. 2323-2334, 2004.

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

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.

YANOFSKY, M. F.; BOWMAN, J. L.; DREWS, G. N.; FELDMANN, K. A.; MEYEROWITZ, E.M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. **Nature**, v. 346, p. 35-39. 1990.

ZHANG, J.; GUO, W.; ZHANG, T. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. X *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. **Theoretical and applied genetics**, v. 105, n. 8, p. 1166-1174, 2002.

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