



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**VALIDAÇÃO TEMPORAL E TISSULAR DE GENES ENVOLVIDOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE BOTÃO FLORAL DE ALGODOEIRO**

**MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO**

**RECIFE-PE**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**TESE DE DOUTORADO**

**VALIDAÇÃO TEMPORAL E TISSULAR DE GENES ENVOLVIDOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE BOTÃO FLORAL DE ALGODOEIRO**

**MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO**

Apresentação:

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO no ponto focal Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia na Agropecuária

Linha de Pesquisa: Melhoramento Vegetal

**RECIFE-PE**

**2015**

# TERMO DE APROVAÇÃO

## UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

**MORGANNA POLLYNNE NÓBREGA PINHEIRO**

**Validação temporal e tissular de genes envolvidos no desenvolvimento de  
botão floral de algodoeiro**

### BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28 de maio de 2015

**Orientador:**

---

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

**Co-Orientadoras:**

---

Dra. *Roseane Cavalcanti dos Santos*  
Pesquisadora Embrapa Algodão – PB

---

Dra. *Liziane Maria de Lima*  
Pesquisadora Embrapa Algodão – PB

**Examinadores:**

---

Prof. Dra. *Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira*  
Departamento de Biologia – UFRPE

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. *Terezinha de Jesus Rangel Camara*  
Departamento de Química- UFRPE

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. *Vivian Loges*  
Departamento de Agronomia-Melhoramento Genético de Plantas - UFRPE

---

Prof. Dr. *José Luiz Sandes de Carvalho Filho*  
Departamento de Fitotecnia - UFRPE

O difícil não é iniciar uma caminhada, mas sim continuar. Ir em frente requer perseverança, persistência e humildade. Mas, semeando a boa semente, ainda que seja pela umidade das lágrimas ela germinará. Pode acontecer que os outros não valorizem os nossos trabalhos, as nossas lutas diárias. Mas os resultados dessas lutas nos fazem sentir que as experiências adquiridas na longa caminhada serviram para que acreditássemos em sonhos, mesmo sabendo que jamais deveríamos viver deles. Estas experiências, muitas vezes, nos fizeram chorar, mas jamais deixamos as lágrimas turvarem a nossa visão. Não importa também se, nesse esforço, tropeçamos e caímos, pois é aos que tombam na luta que se costuma chamar de heróis.

(Grifos nosso)

## *Dedicatória*

À Deus, por ter me dado o que tenho de mais precioso, minha vida.

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigado. Por isto dedico à Maria das Graças Nóbrega Pinheiro e José Washington Pinheiro, meus pais amados, essa minha conquista.

Ao homem que organiza toda minha vida, que me protege, me aconselha. Obrigada por todo amor e dedicação. Você não faz ideia do quanto me orgulho de ser sua irmã. Amo você, Wellber Renné.

## *Ofereço*

Às minhas Marias (Maria Rosa e Maria Júlia), que como crianças não sabem da importância de se chegar até aqui, mas sabem e fizeram o principal de colocarem leveza, pureza e sorrisos em meus dias, principalmente nos mais difíceis e assim tornaram-se imprescindíveis na caminhada de titia. Um dia irei dizer-lhes do valor que de ir em busca dos sonhos e assim como eu, terão entusiasmo e muita vontade de seguir em frente. Amo vocês!

## *Agradecimentos*

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), particularmente ao Programa RENORBIO, aos professores e funcionários pela realização do curso de pós-graduação.

À Embrapa Algodão pelo suporte do laboratório de Biotecnologia no desenvolvimento desse trabalho e a CAPES pela concessão da bolsa.

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

À Prof. Dra. Liziane Maria de Lima, pela confiança, oportunidade de trabalhar ao seu lado desde minha graduação, pela impecável condução deste trabalho, por ser a maior incentivadora na superação dos meus limites, além da amizade e compreensão em momentos difíceis. Serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim.

À Dra. Roseane Cavalcanti pela infinita disponibilidade, paciência, por todos os conselhos pessoais e profissionais, pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, além da grande amizade.

À minha Tia Côca, pela presença constante em minha vida, valiosos conselhos e pelas frases de otimismo e motivação que sempre chegavam nas horas que mais precisava.

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

Ao meu queridíssimo, que Deus me presenteou, **Ciro Igor Torres Sizenando**, ouvinte atento de minhas dúvidas, inquietações, desânimos. Seu apoio, sorriso, seu abraço e até mesmo sentir sua presença mesmo quando estávamos longe foram imprescindíveis. Essa conquista também é sua, afinal você já faz parte de minha vida. Desde sempre e para sempre.

À Geise, amiga fiel, que esteve ao meu lado em todos os momentos, pela jornada diária no laboratório, por nunca me negar ajuda, pelos desabafos e frases de otimismo: “Vai dá tudo certo, Morgs”! Levarei sua amizade por toda minha vida.

Ao amigo estimável, **Alberto Barbosa**, que sempre me acolheu em sua casa e no seu abraço naqueles dias que em reinava alegrias e principalmente tristezas.

Ao meu amigo **Vandré Guevara**, companheiro eterno de bancada e na vida. Você sempre esteve presente em todos os momentos e o melhor sempre acreditou que eu poderia chegar até aqui. Saiba que desejo o melhor para sua vida. Levarei sua amizade para sempre.

À Família **Arroxelas** (**Antônio, Karen e Alice**), pela adoção, por sempre estarem dispostos a escutarem meus desabafos, pelos conselhos oferecidos e os que ainda estão por vir.

As minhas companheiras, (**Aline Oliveira, Eveline Aratújo, Patricia Lima, Valeska Silva, Milena Silva, Pollyne Borborema e Karen Mastrangeli**) de lutas diárias, saibam que receber o bom dia

de cada uma, as frases de otimismo até nas madrugadas foram importantíssimas para mim. Sem o apoio de cada de vocês uma não estaria aqui erquida para seguir em frente. Adoroooo vocês, minha Lulus.

À minha amiga e irmã, Carliane Rebeca, pelas longas conversas sempre acompanhadas de muitas risadas, pela força, cumplicidade e por não ter me deixado desistir. Percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo. Você faz parte da minha história. Aos meus pais de coração, Eliane Monteiro e Carlos Alberto, que ganhei de presente junto com esta amizade, pelas acolhidas sempre tão calorosas em Recife.

À Pollyne Borborema, mesmo distante, esteve sempre comigo, ensinando-me a viver sempre de forma divertida, apoiando-me e acreditando em meu potencial. Sempre me fez acreditar no lado bom das coisas, mesmo quando tudo parecia desabar. Tenho muito orgulho de ser sua amiga!

À Jean Pierre, pelo sorriso, pelas conversas com desabafos e conselhos, pelo apoio oferecido, pelos momentos de descontração, enfim, pela amizade conquistada e fortalecida a cada dia.

Fábia Suelly pelos conselhos de mãe e ajuda nas horas que tudo dava errado no laboratório. Obrigada pela grande amizade construída e fortalecida a cada dia.

Não poderia deixar de agradecer a Juarez, colega de trabalho da Embrapa Algodão, pelo sorriso contagiante de todas as manhãs e apoio oferecido sempre.

As amigas do LABEG, Kaliny Veiga, Isabel, Jacqueline pelos conhecimentos partilhados, apoio e amizade de longas datas.

Aos colegas que conquistei no Cenargen, principalmente Osmundo Brillhante, Vivian de Jesus, Roberta Ramos, Dijair Júnior, Raquel Sampaio, pela disponibilidade de ajuda sempre e companheirismo.

Aos novos amigos que conquistei na Embrapa Algodão: Taíza, Fátima, Daniela, Alexandre, Géssica, Samara.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

- Figura 1.** Padrão de expressão de genes envolvidos nos botões florais e diferentes órgãos vegetativos de algodoeiro (*G. hirsutum*)..... 28
- Figura 2.** Expressão relativa do RNAm dos seis genes envolvidos no botão floral do algodoeiro *G. hirsutum* em diferentes estádios de desenvolvimento. B1 (botão floral 2-4 mm); B2 (botão floral 6-8 mm); B3 (botão floral 10 mm); B4 (botão floral 12 mm); B5 (botão floral 14-16 mm); B6 (botão floral 18-20 mm); A. *GhASH*; B. *GhGLUC* ( $\beta$ -glucanases); C. *GhOVU*; D. *GhMYB* (fator de transcrição); E. *GhFIB010*; F. *GhUDP* (Uridine diphosphate glycosyltransferase)..... 29
- Figura 3.** Relação filogenética dos genes *GhASH*, *GhMYB* e *GhOVU*. Dendrograma obtido pelo programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) utilizando-se acessos dos genes depositados no NCBI..... 30

### Capítulo III

- Figura 1.** Padrão de expressão de genes envolvidos nos diferentes tecidos do botão floral e durante três fases fenológicas das fibras do algodoeiro (*G. hirsutum*). DPA: dias pós antese..... 48
- Figura 2.** Expressão relativa dos genes envolvidos nos diferentes tecidos do botão floral e nas três fases fenológicas das fibras do algodoeiro *G. hirsutum*. B (Brácteas), S (Sépalas), P (Pétala), O (Óvulos), A (Anteras), 8 DPA (Fibras com 8 dias pós-antese), 10 DPA (Fibras com 10 dias pós-antese), 18 DPA (Fibras com 18 dias pós-antese). *GhMYB* (a), *GhFIB010* (b), *GhOVU* (c), *GhUDP* (d), *GhASH* (e) e *GhGLUC* (f)..... 49

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Genes identificados em estruturas reprodutivas de <i>Gossypium</i> .....	9
---	---

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Principais eventos biológicos relacionados aos estádios de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro.....	24
--	----

<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos de <i>G. hirsutum</i> utilizados para o estudo da expressão por RT-PCR semiquantitativa.....	25
---	----

<b>Tabela 3.</b> Sequência dos oligonucleotídeos de <i>G. hirsutum</i> utilizados para o estudo da expressão relativa dos genes por RT-qPCR.....	27
--	----

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos oligonucleotídeos de <i>G. hirsutum</i> utilizados para o estudo dos genes por RT-PCR semiquantitativa.....	46
---	----

<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos de <i>G. hirsutum</i> utilizados para o estudo da expressão relativa dos genes por RT-qPCR.....	47
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CNPA</b>	Centro Nacional de Pesquisa do Algodão
<b>Contigs</b>	Conjunto de sobreposição de segmentos de DNA
<b>CottonDB</b>	<i>Cotton Genome Database</i>
<b>Ct</b>	Threshold Cycle
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPA</b>	Dias pós antese
<b>ESTs</b>	Expressed Sequence Tags
<b>FT</b>	Fator de Transcrição
<b>GA</b>	Giberelina
<b>GM</b>	Geneticamente Modificadas
<b>IAC</b>	Instituto Agronômico de Campinas
<b>Mpb</b>	Milhões de pares de bases
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCM</b>	Células-Mãe de pólen
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico do tipo mensageiro
<b>RT-PCR</b>	Reação da transcriptase reversa, seguida de cadeia da polimerase
<b>RT-qPCR</b>	Reação da transcriptase reversa, seguida de cadeia da polimerase em tempo real
<b>TAIR</b>	<i>Arabidopsis Information Resource</i>

## RESUMO

É crescente o número de pesquisas que reportam a identificação e caracterização de genes associados ao botão floral, bem como no isolamento de suas regiões regulatórias. Estas vertentes vêm auxiliando na elucidação de várias questões relativas à regulação e das interações celulares, gerando assim um grande impacto no melhoramento de várias espécies vegetais. Em algodão (*Gossypium hirsutum*) estes estudos têm contribuído substancialmente na obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM), detentoras de genes para resistência a herbicidas e lepidópteros, e reveste-se na possibilidade de aumentar a eficiência de controle contra pragas alvo que atuam diretamente em estruturas florais e/ou ainda, potencializar o efeito de expressão na coloração das fibras. Diferentes técnicas estão disponíveis para a análise de genômica funcional, entre as mais adotadas está a construção de bibliotecas de curtas sequências expressas (ESTs) que permite identificar quais RNAs mensageiros estão sendo expressos num organismo em um determinado momento. Com o uso desta metodologia em estudo anterior, foram caracterizados por análises *in silico* genes envolvidos em funções reprodutivas do algodoeiro, alguns dos quais expressos nos gametófitos masculino e feminino. Nesse momento, a partir de ensaios de RT-PCR e qRT-PCR, seis genes (*GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP*) foram investigados quanto à expressão temporal durante a ontogenia do botão floral, nos estádios de 2-4, 6-8, 10, 12, 14-16 e 18-20 mm. Todos os genes investigados apresentaram atividade nos diferentes tamanhos dos botões florais e com níveis diferenciados de expressão, contudo, o maior nível foi observado no tamanho de 10 mm, com exceção do gene *GhASH* que apresentou maior expressão nos botões de 10 a 16 mm. Nestes estádios o botão encontra-se em atividade celular intensa incluindo redução da parede celular, formação dos sacos embrionários completos, surgimento e degeneração das antípodas, sugerindo que esses genes podem estar envolvidos na formação e ou desenvolvimento de óvulos, grãos de pólen, tubo polínico, como também em fibras. O gene *GhASH* também apresentou o maior nível de expressão em todos os estádios do botão floral quando comparado aos demais genes. Em função da regulação desses genes envolverem etapas precursoras, que antecedem a antese e que, possivelmente perpassa o processo final de maturação, procedeu-se adicionalmente um estudo de expressão tissular em órgãos floríferos do algodão (brácteas, sépalas, pétalas, óvulos, anteras e fibras com 8, 10 e 18 DPA) de modo a entender as interrelações dos genes envolvidos na fase reprodutiva e sua atuação durante o desenvolvimento. Verificou-se que todos os genes apresentaram expressão equivalente com suas funcionalidades descritas nos bancos de dados. As análises da atividade gênica para os genes *GhASH*, *GhOVU* e *GhGLUC* propuseram atuações na formação e/ou desenvolvimento de todos os órgãos florais sobretudo em grãos de pólen, tubo polínico e anteras. Para os genes envolvidos nas fibras, *GhMYB*, *GhFIB010*, *GhUDP*, a expressão foi observada para todas as três fases fenológicas estudadas, sugerindo assim que estejam envolvidos diretamente na fase de alongação das fibras, fase que tem sido bastante investigada, uma vez que o comprimento das fibras de algodão é uma característica chave de determinação da qualidade e rendimento. Estudos adicionais para caracterização funcional dos genes promissores e isolamento de suas regiões *upstream* tornam-se necessários a fim de contribuir com os avanços do melhoramento genético e molecular dessa oleaginosa.

**Palavras chave:** *Gossypium hirsutum*, ontogenia, órgãos floríferos, RT-PCR, RT-qPCR

## ABSTRACT

A growing number of studies reports the identification and characterization of genes associated with flower bud and the isolation of its regulatory regions. These strands are helping to unravel a number of issues concerning the regulation and cellular interactions, thus generating a great impact on improving various plant species. In cotton (*Gossypium hirsutum*) these studies have contributed substantially in obtaining of genetically modified GM plants, holders of genes for resistance to herbicides and lepidopteran, and are becoming the possibility of increasing the control efficiency against target pests that act directly in floral structures and / or even enhance the expression of the coloring effect of the fibers. Different techniques are available for functional genomics analysis, among the most adopted is the construction of expressed sequence tags (ESTs) libraries that allows to identify which RNAs are expressed in an organism at a given time. Using this methodology in a previous study, were characterized by *in silico* analyzes genes involved in reproductive functions of cotton, some of whom expressed in male and female gametophytes. At that moment, from RT-PCR assays and qRT-PCR, six genes (*GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* and *GhUDP*) were investigated for the temporal expression during ontogeny flower bud, at stages 2-4 6-8, 10, 12, 14-16, and 18-20 mm. All of the genes investigated were active in floral buds of different sizes and in different expression levels, however, the highest level observed was 10 mm, except for gene *GhASH* with the highest expression in 10 to 16 mm. In these stages the cotton bud is in intense cellular activity including reduced cell wall formation of the complete embryonic sac, appearance and degeneration of the antipodes suggesting that these genes that may be involved in the formation and development of ovules, pollen, pollen tube, as well as on fibers. The gene was *GhASH* which also had the highest level of expression in all stages compared to other genes. Due to the regulation of these genes involved precursor steps, prior to anthesis and possibly runs through the final process of maturation, we proceeded further a study of tissue expression in organs flowering cotton (bracts, sepals, petals, ovules, anthers and fibers with 8, 10 and 18 DPA) to understand the interrelationships of the genes involved in the reproductive phase and its performance during development. It was found that all genes showed equivalent expression with its features, described in the databases. Analyses of gene activity for genes *GhASH*, *GhOVU* and *GhGLUC* proposed performances in training and / or development of all floral organs especially in pollen grains, pollen tube and anthers. For genes involved in fiber *GhMYB*, *GhFIB010*, *GhUDP* expression was observed for all studied growth stage, suggesting that are directly involved in elongation phase of the fibers, this phase has been widely investigated since the length of the cotton fiber is a key feature in determining the quality and yield. Additional studies to functional characterization of promising genes and isolation of their regions upstream become necessary in order to contribute to the progress and molecular breeding of this oilseed.

**Key Words:** *Gossypium hirsutum*, ontogeny, flowering organs, RT-PCR, RT-qPCR

## SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A cultura do algodão: do centro de origem ao cenário nacional.....	3
2.2. Melhoramento genético do algodoeiro: conquistas e perspectivas.....	4
2.3. Contribuição da genômica para o avanço molecular.....	6
2.4. Genômica funcional do algodão.....	8
3. REFERENCIAS.....	12
CAPÍTULO II	
Expressão temporal de genes durante a ontogenia do botão floral de algodoeiro upland.....	19
CAPÍTULO III	
Expressão tissular de genes envolvidos na estrutura floral do algodoeiro <i>Gossypium hirsutum</i> var. <i>latifolium</i> .....	41
ANEXOS	
PLANT MOLECULAR BIOLOGY.....	62
FUNCTIONAL PLANT BIOLOGY.....	68

# CAPÍTULO I

## 1. Introdução

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) é umas das principais culturas agrícolas em nível mundial dada a sua importância econômica e social. O Brasil ocupa a quinta posição no cenário mundial, com produtividade média de 1,5 milhão de toneladas em plumas e 2,3 milhões de tonelada em caroço (CONAB, 2015), graças ao elevado nível tecnológico que se incorpora a cada ano ao setor agrícola e principalmente ao desenvolvimento de cultivares mais produtivas, com elevado rendimento de pluma, adaptadas as mais diversas condições edafoclimáticas e tolerantes a diversos fatores bióticos e abióticos.

Para conseguir tais atributos, os programas de melhoramento das instituições nacionais adotam métodos convencionais, envolvendo as etapas de cruzamentos, focando em caracteres que atendam os requisitos da indústria têxtil e dos produtores. Nesse contexto, a escolha de genitores robustos representa um passo importante à obtenção de novas cultivares. A dificuldade de agregar um maior conjunto de caracteres reside naqueles que não são herdados geneticamente ou, quando são, não há disponibilidade de recurso genético que possa ser utilizado como parental. É o caso, por exemplo, da melhoria de cultivares para resistência a algumas pragas como insetos ou a ervas daninhas. Para tal situação, as barreiras de falta de germoplasma têm sido minimizadas pelo uso de cultivares geneticamente modificadas (GM), as quais detêm em seu genoma genes exógenos que expressam proteínas para o fator genético para o qual foram modificadas (JENKINS et al., 1993; GATEHOUSE e GATEHOUSE, 2000; PANJEKAR et al., 2003; PINTO, et al., 2008). Essa tecnologia tem trazido enormes benefícios para várias lavouras, especialmente as grandes *commodities* que, por terem seus preços atrelados ao mercado internacional, ficam mais vulneráveis quando se deparam com eventos externos, quer seja de natureza biótica ou abiótica. Para continuar avançando nesse segmento, é imprescindível o investimento na descoberta de novos genes e de suas sequências regulatórias, especialmente em tecidos que estejam direta ou indiretamente envolvidos com a produção. Os bancos de genes atualmente disponíveis em bancos de dados oferecem um arsenal de informações que podem servir como norteadores para posteriores estudos de transcriptomas, proteômicas, entre outros, com vistas a contribuir na elucidação de como são regulados e como

estão envolvidos nos diversos processos metabólicos das plantas (MEYERS et al., 2004; ROCHFORT, 2005; PASSOS et al., 2008).

Para o gênero *Gossypium*, que abrange pelo menos duas espécies de importância econômica, *G. hirsutum* e *G. barbadense*, o site *CottonDB* (*Cotton Genome Database*), que disponibiliza várias sequências de genes que envolvem quase todo genoma do gênero. Fazendo um breve relato sobre os genes envolvidos com estruturas reprodutivas do algodão, citam-se alguns que podem ser de grande utilidade para posterior estudo sobre biologia floral, ontogenia da floração e desenvolvimento da fibra. Os genes *GhPME-like1*, *GhβGal-like1* e *GhPL-like1* envolvidos no desenvolvimento do botão floral do algodoeiro (ÁRTICO et al., 2014); *ROXY1*, envolvido com a formação das pétalas (XING et al., 2005); *GhSusA1*, associado com a produtividade e qualidade das fibras (JIANG et al., 2012), além da síntese de flavonoides, cujos metabólitos são responsáveis pela pigmentação da flor e das fibras (KOES et al., 2005; XIAO et al., 2007).

Com isso, tem sido proposto que as novas gerações de plantas transgênicas deverão utilizar promotores tecido-específico, pois permitem o direcionamento da expressão dos genes de interesse (CHEN et al., 2007). O benefício dessas construções em trabalhos de transgenia reveste-se na possibilidade de aumentar a eficiência de controle contra pragas alvo de lavouras que atuam diretamente em estruturas florais ou ainda, no caso de algodão, potencializar o efeito de expressão na coloração das fibras, contribuindo para movimentar um mercado milionário que ainda depende de tingimento artificial para suprir a indústria têxtil mundial.

No presente trabalho apresentam resultados de um estudo envolvendo expressão diferencial de genes durante a ontogenia do botão floral de algodoeiro, por meio de procedimentos moleculares envolvendo PCR-semiquantitativo e em tempo real (qRT-PCR). Em função da regulação desses genes envolverem etapas precursoras, que precedem a ântese e que, possivelmente perpassa o processo final de maturação, procedeu-se adicionalmente um estudo de expressão tissular em órgãos floríferos do algodão de modo a entender as interrelações dos genes envolvidos na fase reprodutiva e sua atuação durante o desenvolvimento.



## 2. Revisão de literatura

### 2.1. A cultura do algodão: do centro de origem ao cenário nacional

O algodão é uma dicotiledônea pertencente à família Malvaceae, composta por 250 gêneros e 4.200 espécies. O gênero *Gossypium* é originário da África Central e está distribuído amplamente pelo continente asiático, africano, americano e oceânico. Segundo Fryxell (1992) e Endrizzi et al. (1985), esse gênero possui 50 espécies descritas algumas das quais tem centro de dispersão no Brasil.

O primeiro relato do algodão data de cerca de oito mil anos AC., embora haja divergências quanto ao centro de origem. Alguns autores atestam ser no continente americano, enquanto outros afirmam ser originário da África Central; a evidência mais adotada, contudo, é a origem na Índia (SAUNDERS, 1961).

A presença do algodão em território brasileiro é bastante remota, anterior à chegada dos portugueses em 1500. A cultura era feita em pequenos locais em volta das habitações e o uso do algodão era bastante difundido entre os indígenas. A planta inteira era aproveitada no cotidiano; os fios eram utilizados na fabricação de redes, o caroço era esmagado, cozido e consumido como mingau e o extrato das folhas era usado como medicamento na cicatrização de ferimentos. Mais tarde começou a ser empregado na confecção de roupas para vestir os índios, os quais já tinham técnicas de colheita, fiação, tintura e tecelagem (NEVES e JUNQUEIRA, 1967).

Em meados do século XVIII e início do século XIX, com a revolução industrial, o algodão foi inserido no mercado têxtil. No Brasil cultivava-se algodão do tipo arbóreo rim-de-boi (*G. barbadense* var. *brasiliense*) que se concentrava predominantemente na região Nordeste como atividade complementar dos agricultores. A partir de 1860 foi introduzida variedade *Gossypium hirsutum* oriunda da Inglaterra (CORRÊA, 2003; BUAINAIN e BATALHA, 2007). A espécie *G. hirsutum* L. originou a maioria das variedades de algodão cultivadas mundialmente e são representadas no Brasil pelas raças: *G. hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch (algodoeiro herbáceo) e *G. hirsutum* var. *marie-galante* (Watt) Hutch (algodoeiro-mocó) (FREIRE, 2000).

O *Gossypium* apresenta dois níveis de ploidia, sendo constituído de espécies diplóides ( $2n = 2x = 26$ ) e alotetraplóides ( $2n = 4x = 52$ ). Entre as espécies, apenas quatro produzem fibra com características que atendem a indústria têxtil: *G. herbaceum* L., *G. arboreum* L., *G.*

*barbadense* L. e *G. hirsutum* L., sendo esta última a de maior destaque no cenário mundial por produzir 95% das fibras comercializadas (FREIRE, 2007; CARVALHO, 2008).

A planta do algodoeiro oferece os mais variados produtos que podem ser utilizados nas indústrias têxteis, de cosmético, de alimento e de óleo. A fibra é o principal produto, com mais de 400 aplicações industriais; as sementes são de grande valor para o mercado agrícola e de beneficiamento. Após extração do óleo, alguns derivados são produzidos para o segmento animal, como torta e o farelo, que são ricos em proteína e utilizados no preparo de rações (BUAINAIN e BATALHA, 2007).

No cenário econômico, a cultura do algodão participa de vários setores da economia, sendo considerada uma das principais *commodities* nacionais. O Brasil ocupa a quinta posição entre os maiores produtores, atrás da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (FAO, 2014; ABRAPA, 2015). Para a safra 2014/15 a produção nacional do algodão em pluma está estimada em 1.5 mil toneladas (CONAB, 2015).

A lavoura é conduzida em várias regiões do Brasil, estando o maior pólo de produção centrado nos Cerrados do Centro-Oeste e do Oeste baiano. As regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste contribuem com 33.5%, 63.7% e 2.8% da produção nacional, respectivamente. Os principais estados produtores são Mato Grosso do Sul (562,7 mil t), Goiás (33,8 mil t) e Bahia (281,1 mil t) (CONAB, 2015).

A cotonicultura hoje se encontra com extensas lavouras e um aprimorado sistema de mecanização e beneficiamento. Os altos investimentos e um arsenal de novas tecnologias tem proporcionado o surgimento de novas variedades com ciclo definido, alta produtividade, maior rendimento de pluma e resistentes a diversos fatores bióticos e abióticos.

## **2.2. Melhoramento genético do algodoeiro: conquistas e perspectivas**

As pesquisas agronômicas envolvendo a cultura do algodão datam no início do século XX, mais precisamente em 1924, quando se iniciaram os trabalhos nas linhas de melhoramento genético e de experimentação, cujos os principais objetivos eram voltados para obtenção de cultivares precoces e de ciclo determinado, de alta produtividade e qualidade da fibra (FREIRE et al., 2007). Em 1926, como resultado das primeiras seleções de plantas, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou e distribuiu os primeiros lotes de sementes melhoradas. Anos depois os esforços continuaram e em 1976 a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) iniciou as pesquisas com a cultura, com a criação do Centro

Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPQ), em Campina Grande, PB, dando início aos trabalhos de melhoramento, com a espécie herbácea, *G. hirsutum* L.

As primeiras variedades obtidas foram: BR1, CNPA 3H, CNPA 6H, CNPA 7H e CNPA Precoce 1, entre os anos de 1976 e 1994 (FREIRE, 1978). Depois da entrada do bicudo do algodoeiro no Brasil, no ano de 1983, a cadeia produtiva cotonícola sofreu grande impacto levando o país a passar do paramar de grande exportador para importador. Tal evento promoveu um desencadeamento total no agronegócio da cultura que se refletiu por mais de uma década, levando todos os atores da cadeia produtiva a reestudar o processo do agronegócio de modo a restabelecer o soerguimento da cultura (RAMALHO et al., 2000; BASTOS et al., 2006). Isso levou a mudança de cenário, estabelecendo-se novo celeiro de produção, centrado na região Centro Oeste, que adotou tecnologias de ponta para ser o principal expoente do cinturão branco nacional (COSTA e BUENO, 2004).

Nos últimos anos, o programa de melhoramento do algodoeiro conduzido pela Embrapa focaliza suas atividades para atender as demandas dos grandes produtores, que adotam um manejo altamente tecnificado e para os pequenos produtores, que lidam com agricultura de base familiar, sendo atendidos, mais prioritariamente com as novas cultivares coloridas de demandam menor exigência em termos tecnológicos (NASCIMENTO e SILVA, 2010).

Um salto expressivo que também colaborou com a competitividade da cotonicultura nacional foi à adoção das lavouras GM, detentoras de genes para resistência a herbicidas e lepidópteros, os quais têm minimizando os custos de produção, mantendo melhor patamar de produtividade (RAJASEKARAN et al., 2000; MARTINS et al., 2008; JAMES, 2014).

Atualmente, encontram-se disponíveis para comercialização os seguintes eventos de algodão: Bollgard®, que contém a proteína Cry1Ac, de *Bacillus thuringiensis* (Bt), desenvolvido pela Monsanto; *Liberty Link*, desenvolvida pela Bayer CropScience, com resistência ao glufosinato de amônio; *Roundup Ready*, desenvolvida pela Monsanto, com resistência ao glifosato; *WideStrike*, desenvolvida pela Dow AgroSciences, que contém as proteínas Cry1Ac e Cry1F, para controle de lepidópteros; *Bollgard II* da Monsanto, que contém as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 para controle de lepidópteros; *MON 531 x MON 1445*, com resistência a insetos e tolerante à herbicida (glifosato), da Monsanto (CTNBio, 2014). Para 2015, a Monsanto estará lançando a *Bollgard III* (COT102 x MON15985), cujo evento possui os genes *cry* (*Cry1Ac* e *Cry2Ab*) e *vip* (*Vip3A*) ambos de Bt. Essa cultivar oferecerá resistência contra as duas principais espécies de lepidópteros *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa punctigera* (ISAAA, 2015).

A obtenção de plantas geneticamente modificadas gerou um grande impacto no melhoramento de várias espécies vegetais, notadamente na cotinocultura, isto graças a grande quantidade de genes que têm sido isolados e caracterizados. Esta vertente tem contribuído para a elucidação de várias questões relativas à regulação e das interações celulares.

### **2.3. Contribuição da genômica para o avanço molecular**

O significado para o termo “gene” evoluiu e se tornou mais complexo desde sua primeira postulação, datada do início do século XX. Após muitas controvérsias sobre a definição deste termo, atualmente o conceito de gene é: “região localizável de sequência genômica, a qual corresponde a uma unidade de herança e que está associada a regiões regulatórias, regiões transcritas e/ou outras regiões funcionais” (PEARSON, 2006; GERSTEIN et al., 2007). Neste mesmo contexto, o termo genoma pode ser definido como o armazenamento de informações biológicas ou simplesmente o conjunto de genes de todo e qualquer organismo (GRIFFITHS, 2006).

A grande maioria dos genomas é formada de DNA, com exceção dos vírus que apresentam o seu genoma constituído de RNA. A utilização desta informação requer a atividade de enzimas e outras proteínas, que participam de uma complexa série de reações bioquímicas, referidas como expressão do genoma. O transcriptoma (conjunto completo de genes transcritos sob certas condições) seguido da proteoma (conjunto completo das proteínas) são os produtos gerados por este tipo de expressão (BINNECK, 2004; ROBERTSON, 2005).

É crescente o número de depósitos de sequências nos bancos em dados públicos. No *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics>) encontra-se cerca de 174 bilhões de sequências disponíveis para quase 260.000 espécies, obtidas principalmente a partir de laboratórios individuais e submissões de lotes de projetos de sequenciamento em larga escala.

Algumas espécies vegetais já tiveram seus genomas inteiramente sequenciados, tais como *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative*), que possui 120 Mbp e apresenta, no geral, uma cópia de cada gene e menos de 10% de sequências repetitivas (MAHALAKSHMI e ORTIZ, 2001), por ser considerado um genoma pequeno, quando comparado a outras espécies vegetais, é utilizada como planta modelo para estudos moleculares; arroz (*Oryza sativa* - *International Rice Genome Sequence Program*) (GOFF et al., 2002); milho (*Zea mays* - *Maize Genome Project*) (SCHNABLE et al., 2009); mamona

(*Ricinus communis*) (CHAN et al., 2010); soja (*Glycine max* - Glycine max Genome Genome) (SCHMUTZ et al., 2010); feijão mungo (*Vigna radiata*) (ALVERSON et al., 2011); tomate (*Solanum lycopersicum*) (SATO et al., 2012); eucalipto (*Eucalyptus grandis* - Eucalyptus Genome Network) (MYBURG et al., 2014); café (*Coffea canéfora*) (DENOEUDE et al., 2014); algodão (*Gossypium arboreum*) (LI et al., 2014) e amendoim (*Arachis hypogaea* L - Peanut Genome Project) (VALENTINE et al., 2014)

A elucidação dos genomas e os programas de bioinformática têm permitido na área molecular o total aproveitamento dessas informações por pesquisadores que atuam nas áreas de regulação gênica, expressão de transcritos, geração de sondas, engenharia de genes, entre outras. Desde a época da descoberta do DNA recombinante, vários benefícios têm sido gerados por meio dos avanços moleculares, especialmente nas áreas médica e biológica, com o desenvolvimento de vacinas, hormônios e, na agricultura, as lavouras GM, que tem contribuído expressivamente com o produto interno bruto (PIB) agropecuário dos países que adotam tal tecnologia.

A identificação de novos genes, embora envolva um processo laborioso e oneroso, só terá aproveitamento completo pela comunidade científica se estiver atrelada a sua funcionalidade. Vários depósitos são feitos diariamente nos bancos de gene, contudo, grande parte são de sequências incompletas ou retiradas de bibliotecas, cuja função não foi definida ou elucidada. O entendimento completo da função do gene permite avançar nos estudos para áreas posteriores, do transcriptoma até a metaboloma, tornando possível estimar a expressão de transcritos ou de precursores de metabólitos em nível celular ou durante a ontogenia, dependendo do organismo que esteja sendo estudado.

Existem genes denominados de constitutivos ou *housekeeping genes*, que são aqueles presentes em todas as células do organismo e que são continuamente expressos independentes dos tecidos e do ambiente de crescimento, gerando produtos essenciais para a manutenção da vida, normalmente envolvidos em processos básicos como geração de energia, replicação e manutenção do material genético (SUZUKI et al., 2000). Muitos desses genes já foram isolados e identificados como *ACTINA* (ACT), *POLIUBIQUITINA* (UBQ), *TUBULINA* (TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e um fator de alongação 1 $\beta$  (EF1b), estes são comumente utilizados como referência em estudos de expressão gênica em diversos tipos de organismos (GUTIERREZ et al., 2008; HU et al., 2009; MIRANDA et al., 2013).

Outros genes, também chamados de específicos ou induzidos, são regulados e expressos em alguns tecidos, cuja ação está diretamente relacionada à função do órgão/ tecido, como exemplos: *GhPME-like1*, *Gh $\beta$ Gal-like1* e *GhPL-like1* envolvidos no desenvolvimento do botão

floral do algodoeiro (ÁRTICO et al., 2014); gene *ROXY1*, envolvido na formação das pétalas em algodão (XING et al., 2005); genes *NCED* e *LEA* envolvidos nas respostas ao déficit hídrico em *Arabidopsis thaliana* (IUCHI et al., 2001; SHIH, et al., 2008), entre outros. Para que esta especificidade ocorra devidamente, vários mecanismos de regulação necessitam estar ativados, permitindo assim que os produtos gênicos sejam gerados por células “específicas”, nos momentos “determinados” e em quantidades apropriadas. Desta forma, conclui-se que na regulação gênica estão presentes genes com características espaciais (local no qual ocorrerá a expressão), temporais (momento em que ocorrerá a expressão) e quantitativas (quantidades do produto que deverá ser expresso).

Diferentes técnicas estão disponíveis para a análise da genômica funcional, entre as mais adotadas, citam-se: i) construção de bibliotecas de ESTs, que permite identificar quais RNAs mensageiros (RNAm) estão sendo expressos num organismo, em um determinado momento (MEYERS et al., 2004); ii) hibridização *in situ*, que permite avaliar a distribuição espacial de um transcrito a partir da hibridização de uma sonda de ácido nucléico marcada (SCHAFFER et al., 2000); iii) RT-PCR, que consiste numa reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase, sendo muito utilizada para estimar a expressão gênica (LIANG e PARDEE, 1992); iv) *Northern blot*, que detecta o transcrito através de sonda específica (MEYERS et al., 2004); e v) PCR em tempo real, que quantifica o nível de transcrição no ato em que os produtos estão sendo expressos (GACHON et al., 2004).

## **2.4 Genômica funcional do algodão**

Os trabalhos na área molecular com a cultura do algodão remontam há mais de duas décadas, porém, tiveram um salto quantitativo a partir do desenvolvimento das cultivares GM, em função de possíveis interações epigenéticas ou peliotrópicas advindas com a inclusão dos transgenes. Com a necessidade de se entender mais sobre a fisiologia da cultura nos aspectos bióticos e abióticos e as consequentes interações relacionadas com os processos de defesa, o impulso das pesquisas moleculares promoveu uma busca para isolamento de novos genes e o entendimento de suas funções para posterior uso de tais informações em trabalhos associados à expressão gênica ou transgenia, todos com o mesmo fim de auxiliar as demandas primárias estabelecidas nos programas de melhoramento.

Focalizando em genes envolvidos na fase reprodutiva, vários deles têm sido reportados, alguns dos quais tem sua função descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Genes identificados em estruturas reprodutivas de *Gossypium*.

<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
<i>Pectina metilesterase</i>	Processos de modificação de parede celular durante o desenvolvimento do pólen	ARTICO et al., 2008
<i>Mio-inositol oxigenase</i>	Síntese de precursores de matrix extracelular em flores	ARTICO et al., 2008
<i>ARF6</i>	Desenvolvimento da flor e óvulo	NAQPAL et al., 2005
<i>ATFYPP3</i>	Regulação negativa do desenvolvimento da flor	KIM et al., 2002
<i>ATRAB,</i> <i>SEUSS</i> e <i>CDKC2</i>	Crescimento do tubo polínico Desenvolvimento da flor	JOSHUA et al., 2004 VANIYAMBADI et al., 2006; CUI et al., 2007
<i>BOP2</i>	Morfogênese da flor e abscisão do órgão floral	MCKIM et al., 2008
<i>HEN1</i>	Regulação do desenvolvimento da flor e formação da pétala	SUZUKI et al., 2002
<i>ROXY1</i>	Desenvolvimento da antera e pétala	XING et al., 2005

Outros genes, denominados fatores transcricionais MADS-box, estão envolvidos em vários aspectos da diferenciação dos tecidos vegetais. São bastante estudados devido a sua importância na elucidação da identidade de órgãos florais por meio do modelo “ABCE” que explica as classes de genes relacionados ao surgimento dos quatro verticilos florais (pétalas, sépalas, carpelos e estames) (THEIBEN e BECKER, 2000; THEIBEN, 2001). Alguns exemplos de genes agrupados na classe dos genes MADS-box incluem: AGAMOUS (AG) (YANOFSKY et al., 1990), *GhSQUA-like1* e *GhSQUA-like 2*, relacionados ao desenvolvimento floral;

*APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILATTA*, *SEPALLATA3* e *SEPALLATA4* todos estes envolvidos com os eventos tardios do desenvolvimento dos quatro verticilos florais (YANOFSKY et al., 1990; VANIYAMBADI et al., 2006). Outro estudo revelou o gene *GhMADS22* envolvido na promoção da floração além de retardar senescência de algodão e, portanto, pode ser um alvo candidato para promover a maturação precoce (ZHANG et al., 2013). Estudos com o *G. barbadense* revelaram que o gene *GbAGLI* está envolvido no desenvolvimento do óvulo podendo também participar no desenvolvimento de fibras (LIU et al., 2010).

Com relação às fibras do algodão, estas são botanicamente conhecidas por tricomas, que são apêndices da epiderme. Morfologicamente, cada fibra é uma célula única que se desenvolve a partir da diferenciação da epiderme celular do tegumento do óvulo, que originará o fruto (SONG e ALLEN, 1997). O desenvolvimento das fibras consiste em quatro fases que se sobrepõem: a fase de iniciação ocorre de  $(-3 \pm 3)$  dias após a antese (DPA), embora todas as células da epiderme tenham potencial para se tornarem fibras apenas cerca de 30% começam a aumentar e alongar-se rapidamente; no período de alongação  $(5 \pm 25)$  DPA, as células apresentam vigorosa expansão, com picos de crescimento maiores que 2 mm/dia; a terceira fase compreende a formação da parede celular secundária,  $(20 \pm 45)$  DPA, no qual ocorre principalmente a biossíntese e deposição de celulose, quando totalmente madura a fibra é constituída por mais de 95% de celulose; o estágio final de maturação/desidratação,  $(40 \pm 50)$  DPA, está associado ao acúmulo de minerais e decréscimo no teor de água, resultando na fibra madura (LEE et al., 2007). O comprimento das fibras é classificado como inferior, abaixo de 22 mm; curto, variando entre 22 e 28 mm; médio, de 28 à 34 mm e longo, com comprimento superior a 34 mm (BELTRÃO, 2007).

Um grande número de genes expressos durante a ontogenia das fibras tem sido descrito e outros estudos se encontram em andamento. Li et al. (2005) identificaram o gene *ACTIN1* que desempenha papel importante no processo de alongação, embora não faça parte do processo de formação inicial da fibra. Neste mesmo segmento, os genes *GhACO1* e *GhACO3* também foram reportados por Shi et al. (2006). Em outro estudo, Luo et al. (2007) identificaram o gene *GhDET2* como sendo expresso em ambas as fases do desenvolvimento da fibra.

Com relação à qualidade da fibra, Jiang et al. (2012) reportaram o gene *sacarose sintase* (*SusAI*) que, quando superexpresso, atua aumentando o comprimento e a resistência das fibras. Segundo os autores, quando a ação do *SusAI* é suprimida, contudo, há redução na qualidade da fibra. Esse gene também revela alguma expressão na embriogenese porque sua repressão afeta o tamanho das sementes.



Focalizando em enzimas envolvidas nas atividades de alongação, Haigler et al. (2012) identificaram genes relacionados à atividade da *hidrolase*, uma enzima envolvida no desenvolvimento da fibra. Wang et al. (2010) caracterizaram genes envolvidos na síntese de *celulose*, *fosfatase* e *desidrogenase*, os quais estão envolvidos no desenvolvimento de células de fibras de algodão.

Apesar do genoma do algodoeiro, constituído de 1,7 Mpb, já ter sido decifrado, há ainda várias oportunidades para estudar e elucidar o funcionamento e atividade de vários genes depositados em bancos de genes, especialmente os oriundos de bibliotecas. Considerando-se que a planta é de hábito indeterminado, tem ciclo médio de 150 dias e que a fase reprodutiva se inicia a partir dos 45 dias, é de se supor que o investimento em estudos de genômica na fase reprodutiva ainda ofereça um manancial de oportunidades para contribuir com os avanços do melhoramento genético e molecular dessa oleaginosa.

### 3. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE ALGODÃO – ABRAPA. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>. Acesso em Abril de 2015.

ALVERSON AJ, ZHUO S, RICE DW, SLOAN DB, PALMER JD. The mitochondrial genome of the legume *Vigna radiata* and the analysis of recombination across short mitochondrial repeats. *Plos One*, v. 6 n.1, 2011.

Ártico, S.; Lambret, F. J.; Nardeli, S. M. Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 630–643, 2013.

ÁRTICO, S; RIBEIRO-ALVES, M.; OLIVEIRA-NETO O. B. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. **BMC Genomics**, v. 15, 854p, 2014.

BASTOS, C. S.; SUINAGA, F. A.; DA SILVA, M. N. B.; ALMEIDA, R. P. **Cultivo Agroecológico do Algodoeiro e a Convivência com Insetos Fitófagos: Possibilidade ou Realidade?** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2006. 50p. (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 163).

BELTRÃO, N. E. M. EMBRAPA ALGODÃO - FISILOGIA DO ALGODOEIRO: **Aspectos fisiológicos na produção e na qualidade da fibra do algodoeiro**, V Congresso Brasileiro de Algodão, 2007. Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/322.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/322.pdf): Acesso em 02 de Abril de 2015.

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

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.

CARVALHO, L. P. de. 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.

CHAN, A.P. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 9, pp. 951-955, 2010.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, v.2 - Safra 2014/15, n.6 - Sexto Levantamento, Brasília, p. 1-106, Março 2015.**

CORRÊA, S. T.; COUTO, E. P. **A História do algodão no Brasil e seu desenvolvimento no Estado do Mato Grosso, o atual maior produtor do país.** Disponível:<[http://www.propp.ufu.br/revistaelectronica/humanas2003/a\\_historia.pdf](http://www.propp.ufu.br/revistaelectronica/humanas2003/a_historia.pdf)>. Acesso em: 10 Julho de 2014.

COSTA, S. R.; BUENO, M. G. **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC.** Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004. 143p.

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.

DENOEUDE, F. O genoma do café fornece insights sobre a evolução convergente de cafeína biossíntese. **Ciência**. 2014.

ENDRIZZI, J. E.; TURCOTTE, E. L.; KOHEL, R. J. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. **Advances in Genetics**, New York, v. 23, p. 271–375, 1985.

FAO. **Food and Agricultural commodities production** - production - countries by commodity - cottonseed - 2014- value. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15 de setembro de 2014.

FREIRE, E. C. **Variedades de algodão.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 1978. 40p.

FREIRE, E. C. **Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 2000. 28p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 78).

FREIRE, E.C. **Algodão no Cerrado do Brasil.** ABRAPA: Brasília, DF. 2007.

FRYXELL, P. A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). **Rhedeia.Calicut**, v.2, p. 108–165, 1992.

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

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

GERSTEIN M. B., BRUCE C., ROZOWSKY J. S., ZHENG D., DU J., KORBEL J. O. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. **Genome Research**, v. 17, p. 669–681, 2007.

GOFF, S. A. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, p.92-100, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T. LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução a genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2206. 764 p.

GUTIERREZ, L., MAURIAT, M., GUÉNIN, S., PELLOUX, J., LEFEBVRE, J.-F., LOUVER, R., RUSTERUCCI, C., MORITZ, T., GUERINEAU, F., BELLINI, C., AND VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, n.6, p. 609-18 2008.

HAIGLER, C. H.; BETANCUR, L.; STIFF, M. R.; TUTTLE, J. R. Cotton fiber: a powerful single-cell model for cell wall and cellulose research. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012, 12p.

HU, R.; FAN, C.; LI, H.; ZHANG, Q.; FU, Y.F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 93, p. 1-12, 2009.

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (**ISAAA**). Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=372>. Acesso em Abril de 2014.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI M.; KATO, T; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; SHINOZAKI, K. Y.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 27, n. 4, p. 325-333, 2001.

JAMES C (2014) EXECUTIVE SUMMARY, brief 49. **Global status of commercialized biotech/GM crops:** 2014  
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp/>. Accessed 03 April 2015.

JENKINS, J.N.; PARROT, W.L.; McCARTY, J.C.; DEATON, W.R. Growth and survival of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic containing a truncated form of the delta endotoxin gene *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**, v. 86, p.181-185, 1993.

JIANG, Y.; GUO, W.; ZHU, H. Overexpression of GhSusA1 increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality. **Plant Biotech Journal**, v.10, p. 301–312, 2012.

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.

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.

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.

LI, X. B., X. P. FAN, X. L. WANG, L. CAI AND W. C. YANG. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. **Plant Cell**, v. 17, p. 859–875, 2005.

LI, F. Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*. **Nature Genetics**, v.46, n. 6, pp. 567-571, 2014.

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

LIU, X. ; ZUO, K. ; XU, J. ; LI, Y.; ZHANG, F.; YAO, H.; WANG, Y.; CHEN, Y.; QIU, C.; SUN, X.; TANG, K. Functional analysis of GbAGL1, a D-lineage gene from cotton (*Gossypium barbadense*). **Journal of Experimental Botany**, vol. 61, n. 4, pp. 1193–1203, 2010.

LUO, M.; XIAO, Y.; LI, X.; LU, X.; DENG, W.; LI, D.; HOU, L.; HU, M.; LI, Y.; PEI, Y. GhDET2, a steroid 5 $\alpha$ -reductase, plays an important role in cotton fiber cell initiation and elongation. **The Plant Journal**, v. 51, p. 419–430, 2007.

MAHALAKSHMI, V.; ORTIZ, R. Plant genomics and agriculture: From model organisms to crops, the role of data mining for gene discovery. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.4, p.1-10, 2001.

MARTINS, É.S; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R. Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1363–1371, 2008.

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

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

MIRANDA, V.J.; COELHO, R. R.; VIANA, A.A. B.; OLIVEIRA NETO OS. B.; CARNEIRO, R. M. D. G.; ROCHA, T. L.; GROSSI DE SA, M.F.; FRAGOSO, R. R. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 196, 2013, 10p.

MYBURG, A. A. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, pp. 356-362, 2014.

NASCIMENTO, A. F.; SILVA, J.C. MELHORAMENTO GENÉTICO DO ALGODOEIRO NO BRASIL: BREVES CONSIDERAÇÕES. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 6, n. 11, 2010. 11p.

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.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics>. Acesso em: 20 de Setembro de 2014.

NEVES, O. S.; JUNQUEIRA, A.A.B. O algodão no Brasil In: **Cultura e Adubação do algodoeiro**. São Paulo, SP, Instituto Brasileiro de Potassa, 1967.

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

PANJEKAR, P.K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J.KUMAR, P.A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, v.84, p.321-329, 2003.

PEARSON, H. What is a gene? *Nature*, v. 441, p. 399-401, 2006.

PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Cry genes from *Bacillus thuringiensis* applied to crop genetic engineer, for insect resistance improvement. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, p. 159-168, 2008.

RAMALHO, F.S.; MEDEIROS, R.S.; LEMOS, W.P. **Bicudo-do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)**. In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. Pragas introduzidas no Brasil. São Paulo: Holos, 2000. p. 113-119.

RAJASEKARAN, K.; HUDSPETH, R.L.; CARY, J.W.; ANDERSON, D.M.; JACKS, T.J.; STROMBERG, K.; CLEVELAND, T.E. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. **Plant Cell Report.**, v.19, p.539-545, 2000.

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

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

SATO, S. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution (The Tomato Genome Consortium). **Nature**, v. 485, pp. 635-641, 2012.

SCHNABLE, P.S.; WARE, D. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, p. 1112-1115, 2009.

SAUNDERS, J.H. 1961. **The wild species of Gossypium and their evolutionary history**. London: Oxford University Press.

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

SCHMUTZ, J. Genome sequence of the palaeopolyploid *Soybean*. **Nature**, v. 463, pp.178-183, 2010.

SHIH, M-D.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y-I. Late Embryogenesis Abundant Proteins. **Advances in botanical Research**, v.48, P.212-255, 2008.

SHI, Y.H.; ZHU, S.W.; MAO, X.Z.; FENG, J.X.; QIN, Y.M.; ZHANG, L.; CHENG, J.; WEI, L.P.; WANG, Z.Y.; ZHU, Y.X. Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. **Plant Cell**, v. 18, p. 651–664, 2006.

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.

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.

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.

VALENTINE, H. **The Peanut Genome Consortium. Peanut Genome Project (PGP)**. Disponível em: <http://www.peanutbioscience.com/peanutgenomeproject.html>. Acesso em 03 de Abril de 2014.

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.

WANG, Q. Q.; LIU, F.; CHEN, X. S.; MA, X. J.I.E; ZENG, H. Q.; YANG,Z. M. Transcriptome profiling of early developing cotton fiber by deep-sequencing reveals significantly differential expression of genes in a fuzzless/lintless mutante. **Genomics**, v. 96, p. 369–376, 2010.

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, W.; FAN, S.; PANG,C.; WEI, H.; MA, J.; SONG, M.; YU, S. Molecular cloning and function analysis of two SQUAMOSA-Like MADS-Box genes from *Gossypium hirsutum L.* **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, n. 7, pp. 597–607, 2013.



## **Capítulo II**

### **EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES DURANTE A ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL DE ALGODOEIRO UPLAND**

Submetido a Revista: Plant Molecular Biology

**De:** "Plant Molecular Biology (PLAN)" <em@editorialmanager.com>  
**Para:** "Liziane Maria de Lima" liziane.lima@embrapa.br  
**Enviadas:** Segunda-feira, 27 de abril de 2015 21:49:37  
**Assunto:** PLAN - Submission Confirmation

Dear Dr. Lima,

Thank you for submitting your manuscript, TEMPORAL EXPRESSION OF GENES DURING ONTOGENY OF UPLAND COTTON FLOWER BUDS, to Plant Molecular Biology.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://plan.edmgr.com/>

Your username is: liziane.lima

Your password is:

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Plant Molecular Biology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

## EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES DURANTE A ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL DE ALGODOEIRO UPLAND

PINHEIRO, M.P.N. <sup>(1)</sup>; MELO FILHO, P.A. <sup>(2)</sup>; BATISTA, V.G.L. <sup>(1)</sup>; OLIVEIRA NETO, O.B. <sup>(3)</sup>; GROSSI DE SÁ, M.F. <sup>(4)</sup>; SANTOS, R.C. <sup>(5)</sup>; LIMA, L.M. <sup>(5\*)</sup>

- (1) Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brazil, E-mail: morgannapollynne@yahoo.com.br, vanguarda@gmail.com
- (2) Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil, E-mail: pericles@depa.ufrpe.br
- (3) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Medicina, FACIPLAC, SIGA AE2, Brasília, DF, CEP: 72460-000, Brasil. Email: osmundobrilhante@gmail.com
- (4) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB - Av. W5 Norte (final) Caixa Postal 02372, CEP: 70770-900 Brasília, DF, Brasil. Email: fatima.grossi@embrapa.br
- (5) Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, nº 1143, Centenário, CEP: 58428-095, Campina Grande-PB, Brasil, +55 83 3182-4300, Email: liziane.lima@embrapa.br\*; roseane.santos@embrapa.br

\* Autor correspondente

**RESUMO** - O uso de ferramentas biotecnológicas tem trazido enormes benefícios para várias lavouras, especialmente as grandes commodities. Muitos estudos contribuíram para um importante avanço do melhoramento genético do algodoeiro, e outros se encontram em andamento, cujos principais objetivos focalizam na descoberta de novos genes e de suas sequências regulatórias, especialmente em tecidos que estejam direta ou indiretamente envolvidos com a produção. Vários desses genes possuem rotas que iniciam desde o desenvolvimento meristemático floral e perpassam todo ciclo de iniciação, alongação e maturação da fibra. Neste estudo, a expressão de genes envolvidos com a ontogenia do botão floral do algodão foi investigada objetivando identificar fases que possam ser selecionadas para posteriores estudos de isolamento de sequências regulatórias. Oligonucleotídeos dos genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* foram desenhados e utilizados em análises de RT-PCR e RT-qPCR a partir de RNAs extraídos de botões florais coletados com 2-4, 6-8, 10, 12, 14-16 e 18-20 mm. Todos os genes investigados apresentaram atividade nos diferentes tamanhos dos botões florais selecionados, contudo, o maior nível de expressão foi

visto no tamanho de 10 mm. A exceção foi vista para o gene *GhASH* com maior expressão nos tamanhos de 10 a 16 mm. Nestes estádios o botão encontra-se em atividade celular intensa incluindo redução da parede celular, formação dos sacos embrionários completos, surgimento e degeneração das antípodas, podendo elucidar que todos os genes podem estar envolvidos na formação e ou desenvolvimento de óvulos, grãos de pólen, tubo polínico, como também em fibras. O gene *GhASH* foi o que também apresentou o maior nível de expressão em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral quanto comparado aos demais genes. Como fortes candidatos para o isolamento de regiões regulatórias destacaram-se os genes *GhASH*, *GhGLUC* e *GhOVU*, visto que a expressão foi estável em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral.

Key words - *Gossypium hirsutum*; RT-qPCR; gametófitos

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um dos segmentos tecnológicos que tem trazido alto retorno econômico para o segmento agroindustrial. Na agricultura, desde que as ferramentas da biologia molecular se uniram ao melhoramento clássico, vários benefícios foram gerados, a começar pelas lavouras GM que detêm mercado bilionário, na ordem de US\$ 133,3 bilhões (James 2014).

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) é uma grande commodity mundial. Segundo relatório da ICAC - *International Cotton Advisory Committee* (2015), estima-se que a produção mundial de fibra totalizará 26,55 milhões toneladas na safra 2015/2016 movimentando cerca de US\$ 12 bilhões. Trata-se de um agronegócio altamente competitivo, exigindo dos produtores alto investimento tecnológico, não apenas no manejo da lavoura, mas também nas etapas pós-colheita.

As atuais cultivares disponíveis no mercado contribuem expressivamente para o sucesso da lavoura por apresentarem características que atendem as exigências da indústria têxtil e as demandas agrícolas dos produtores. Apesar disso, o sistema de produção do algodoeiro é um dos mais caros entre as principais commodities agrícolas devido aos elevados custos com maquinários para as etapas de manejo e com pesticidas para o controle de pragas da lavoura (Barroso e Hoffmann 2007; Hashemi et al. 2009). A contribuição das cultivares GM foi expressiva para a redução dos custos de produção, embora essa tecnologia ainda esteja limitada ao controle de ervas daninhas e lepidópteros (James 2014). Outras pragas chave, que atuam diretamente em sementes e estruturas floríferas, como os coleópteros, provocam danos incalculáveis por atuarem em órgãos diretamente envolvidos com a produção. A estratégia de

controle para tais pragas, via transgenia, deve considerar não apenas a potencialidade do gene inseticida mas também a robustez de um efetivo promotor, com capacidade de guiar a expressão gênica nos tecidos alvo do inseto.

A maioria das lavouras GM comerciais contem a sequência codante regulada pelo promotor constitutivo 35S, que tem forte expressão em vários tecidos da parte aérea da planta, porém apresenta ação limitada em estruturas reprodutivas (Wilkinson et al. 1997; Benfey e Chua 1989). A literatura dispõe de vários trabalhos reportando sobre o isolamento e a caracterização de promotores tecido-específicos em várias culturas, como o *Brittle2* de endosperma de milho (Chen et al. 2007), o *OsGEX2* de pólen de arroz (Cook e Thilmony 2012), o *IFSI* de raízes na soja (Subramanian et al. 2004), entre outros.

Em algodão, os trabalhos mais relevantes focalizam no isolamento e caracterização de promotores que comandam a expressão de genes nas estruturas reprodutivas, como o *GhACT1*, que comanda a alongação das fibras (Li et al. 2005); o *FAD*, que atua elevando a atividade do ácido graxo oléico na semente (Sunilkumar et al. 2004); os *GhPRP3* e *GhCHS1* que comandam a expressão de genes na parede do fruto, fibras e pétalas (Lightfoot et al. 2013).

De acordo com a literatura, vários desses genes possuem rotas que iniciam desde o desenvolvimento meristemático da gema floral e perpassam todo ciclo de iniciação, alongação e síntese da fibra. Entre os trabalhos relacionados com genes expressos em estrutura reprodutiva citam-se Ártico et al. (2014), que identificaram os genes *GhPME-like1*, *GhβGal-like1* e *GhPL-like1*, envolvidos no desenvolvimento do botão floral do algodoeiro, sobretudo nos estádios de 4 a 12 mm; Xing et al. (2005), isolaram o gene *ROXY1* em *Arabidopsis thaliana*, predominantemente expresso em primórdios florais, incluindo as células precursoras de pétala; Mckim et al. (2008), que caracterizaram o gene *BOP2*, envolvido com a morfogênese da flor e abscisão do órgão floral em *A. thaliana*; Jiang et al. (2012), que identificaram o gene *GhSusA1*, associado com a produtividade e qualidade das fibras. De acordo com os trabalhos de Koes et al. (2005) e Xiao et al. (2007), *GhSusA1* também está envolvido na síntese de flavonoides, responsáveis pela pigmentação da flor e das fibras.

As bibliotecas subtrativas são atraentes mananciais para identificar genes úteis para auxiliar posteriores trabalhos de engenharia genética ou melhoramento de plantas, via seleção assistida. Esta metodologia foi utilizada em trabalho anterior, visando identificar genes específicos de botão floral, focalizando nas fases iniciais de desenvolvimento até antes da antese. Vários *contigs* envolvidos em funções reprodutivas foram encontrados, alguns dos quais expressos nos gametófitos masculino e feminino (Pinheiro et al. 2013), abrindo oportunidades para isolamento de regiões regulatórias visando posterior uso em construções guiadas para

defesa de plantas contra insetos-praga de botões florais. No presente estudo foram investigados seis genes identificados no trabalho de Pinheiro et al. (2013) para estimar a expressão temporal durante a ontogenia do botão floral, por meio de PCR semiquantitativo e em tempo real.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração de RNA total e síntese de cDNA

Plantas da cultivar precoce BRS 8H, desenvolvida pela Embrapa, foram cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo natural, em Campina Grande-PB, Brasil (7°13'50"S, 35°52'52"W e 551 m). As plantas foram mantidas em vasos (10 L), contendo solo previamente fertilizado. As regas foram mantidas diariamente, mantendo-se a capacidade de campo. Aos 45 dias de cultivo, botões florais foram coletados com 2- 4, 6-8, 10, 12, 14-16, 18-20 mm de comprimento, para coleta de RNA total. Os principais eventos biológicos relacionados à ontogenia do botão floral se encontram na Tabela 1. Com o objetivo de atestar a especificidade dos genes selecionados para este estudo, RNA de tecidos de folhas jovens, haste e raízes também foram coletados na mesma data da coleta dos botões florais.

**Tabela 1.** Principais eventos biológicos relacionados aos estádios de desenvolvimento do botão floral do algodoeiro.

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

Fonte: Quintanilha et al. (1962).

O RNA total foi extraído utilizando o *Invisorb Spin Plant RNA Mini kit* (Invitec), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese

em gel de agarose 0.8% e a concentração e pureza por espectrofotometria. Uma alíquota de 4 µg de RNA foi tratada com *DNase I* (Kit *DNase Amplification Grade*- Invitrogen) conforme instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total de cada tecido, utilizando o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* for RT-qPCR (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A *transcriptase reversa* foi inativada a 85°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2 U de RNase H e a reação foi incubada a 37°C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C.

### Estudo de expressão de genes por RT-PCR semiquantitativa

Os genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* previamente identificados por Pinheiro et al. (2013), por meio de biblioteca subtrativa de botões florais de algodoeiro foram usados para os estudos de expressão semiquantitativa. Os oligonucleotídeos dos respectivos genes foram desenhados por meio do programa software Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) e analisados quanto a presença de hetero e homodímeros pelo Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com/>). Como controle endógeno foi adotado o gene da *GhUBQ14* (poliubiquitina) (Ártico et al. 2014). As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 2. Cada reação foi conduzida em 20 µL, contendo 1 µL de cDNA (1 µg); 0.2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador *forward* e *reverse*, 0.04 U *Taq* Polimerase (*Invitrogen*), 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X do tampão de reação. As condições das RT-PCRs foram: pré-desnaturação a 95 °C/5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento por 1 min, extensão à 72 °C/2 min e extensão final a 72 °C/5 min. Os amplicons foram analisados em gel de agarose (0,8%), fotodocumentados pelo programa Kodak MI SE (*Molecular Image Software*) e para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100 pb (Ludwig).

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos de *G. hirsutum* utilizados para o estudo da expressão por RT-PCR semiquantitativa.

Gene	Sequência (5'→3')	Fragmento (pb)	Tm
<i>GhGLUC</i>	F-CCGGGGAGCAAAAGAAGAAG R-GCAGCAATCCTGTCAATGGT	532	54°
<i>GhOVU</i>	F-CCATCCGCAAAGTTTCAACT R-CCTGACTCAACCAATTCCAGA	405	54°
<i>GhMYB</i>	F-GGGGGAGTTGTTCTGAAGAA	401	52°

	R-CCACACTGGTACTGTGGCTC		
<i>GhFIB010</i>	F-GGACAACCATAAGCAGTGG R-GGCACCACCAGTAGTGAAG	304	47°
<i>GhUDP</i>	F-TTCTTCACTCCGATAGCTCACA R-TTAGCATGGACTCCCCAGAC	268	54°
<i>GhASH</i>	F-AGCACTTCAAATCCTGAACCA R-ACAATTGGCCAGAACCAGA	271	52°

---

### **Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

Os oligonucleotídeos dos respectivos genes foram desenhados por meio do programa software Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) e analisados quanto a presença de hetero e homodímeros pelo Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com/>). Como controle endógeno foram utilizados os genes da *GhACT* (Actina), *GhUBQ14* (poliubiquitina) e *GhPP2A* (subunidade catalítica de fosfatase 2A) (Ártico et al. 2014). As sequências dos oligonucleotídeos específicos utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 3. As análises quantitativas em tempo real foram feitas no termociclador Applied Biosystems 7500 e conduzidas com a seguinte reação: *Syber Green Rox Plus Master Mix 2X* (LGC), 200 nM de cada oligonucleotídeo e 2 µL do cDNA (1:20). Todas as reações foram feitas em triplicata experimental e duplicata biológica. O programa adotado foi: 95 °C por 15 min, 95 °C por 20 seg, 60 °C por 20 seg e 72 °C por 20 seg, repetidos por 40 ciclos. 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 15 seg, 60°C por 15 seg, subindo dois graus por minuto até chegar a 95°C.

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). 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 duplicatas biológicas e o valor de eficiência de cada gene, gerado pelo software *Miner*, foram usados para estimar a expressão relativa dos genes estudados. O gene de referência mais estável foi



indicado para a normalização, baseando-se na análise de estabilidade gerada pelo software *geNormPLUS*.

### Análise Filogenética

O alinhamento das sequências foi realizado pela web site CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) seguindo os parâmetros predefinidos pelo programa. Sequências de nucleotídeos dos genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* foram usadas para análise filogenética e as árvores foram geradas pelo programa The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, versão 6.0 (Tamura et al. 2000) pelo método UPGMA com distâncias de Poisson (Saitou and Nei, 1987).

**Tabela 3.** Sequência dos oligonucleotídeos de *G. hirsutum* utilizados para o estudo da expressão relativa dos genes por RT-qPCR.

Gene	Sequência (5' → 3')
<i>GhASH</i>	R - CGCCAATTGTTACAGACACACCTCTC F - CAAAGATTGGGTCCCTTGTTGATGTT
<i>GhFIB010</i>	R CCACCAAACAGGTAATCCAAGGAAGA F – CCAGAATTGTGGCAACTTTCTTACGG
<i>GhGLUC</i>	R - GGCCCAGATTATGGTGTCTTAGCTG F – GGCCTTCCATGGTTTAACTGAATCAA
<i>GhMYB</i>	R - AGCTGATCATTGAACTCCATGCAAAG F – GCCCTTTATCCAATGCATTAACCACA
<i>GhOVU</i>	R - TTGGAAAGTAGTGGAGGCCTAGATGG F – CATCCCTGTTTCTCACTTTGTGTTGC
<i>GhUDP</i>	R - TTCACTCCGATAGCTCACAACCTCTCAA F – TTTGTGGTAGGGTTGTCAATGGTGTC

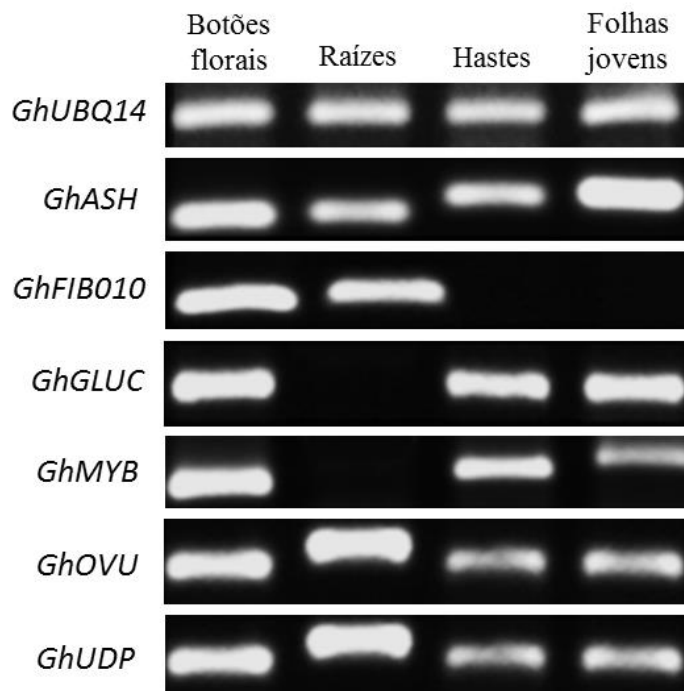
## RESULTADOS

A expressão semiquantitativa dos seis genes de botão floral em diferentes tecidos da planta de algodão se encontra na Figura 1. Verifica-se que, embora os genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* tenham sido identificados em botões florais de 2 a 20 mm, a maioria deles revelou forte expressão também em outros tecidos, indicando

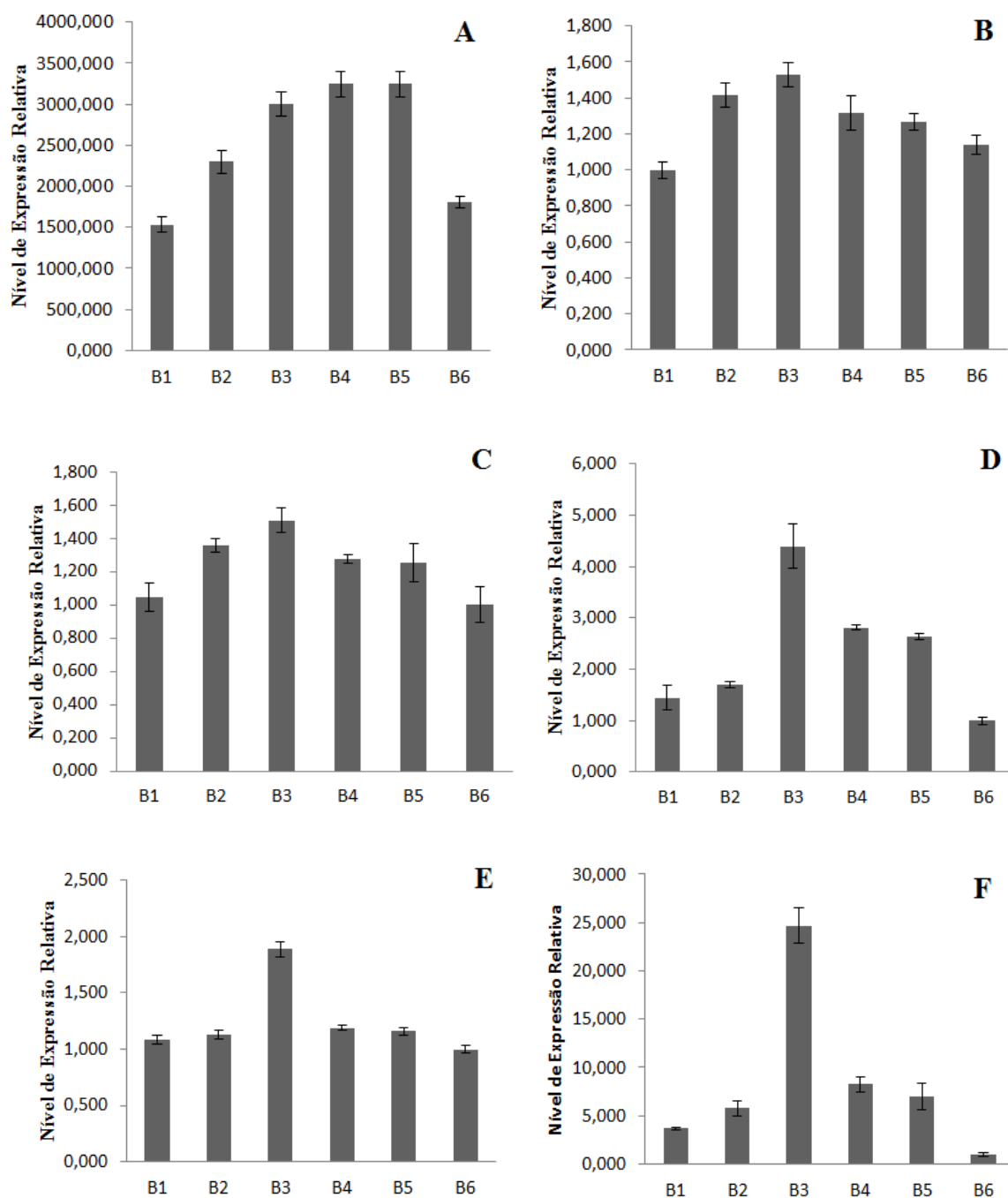
que a especificidade não é restrita à estrutura reprodutiva. Os genes *GhASH*, *GhOVU* e *GhUDP* foram identificados em todos os tecidos estudados, sendo *GhASH* mais fortemente expresso em botões florais e folhas jovens, enquanto que *GhOVU* e *GhUDP* revelaram elevada expressão em botões florais e raízes. Os genes *GhGLUC* e *GhMYB* não apresentaram expressão nas raízes, o contrário de *GhFIB010*, que revelou expressão nos botões florais e raízes jovens.

Apesar dos genes de botão floral terem revelado expressão compartilhada em outros tecidos da fase vegetativa, as análises de expressão relativa por meio quantitativo (qRT-PCR) foram focalizadas apenas nos cDNAs de botões florais nos diferentes estágios de desenvolvimento, de modo a investigar em qual fase ontogenética esses genes revelam maior atividade.

Todos os genes revelaram uma tendência de função polinomial, ou seja, quando a expressão torna-se crescente nos primeiros estágios do desenvolvimento, atinge um limiar de expressão e por seguinte é observado um decréscimo de sua atividade gênica. Para a maioria dos genes o maior pico de expressão foi atingindo aos 10 mm (Figura 2), fase que coincide com o início da degeneração do tapete da antera que são estruturas produtoras de nutrientes, substâncias regulatórias e precursores da esporoderme (Pacini e Franchis 1993).

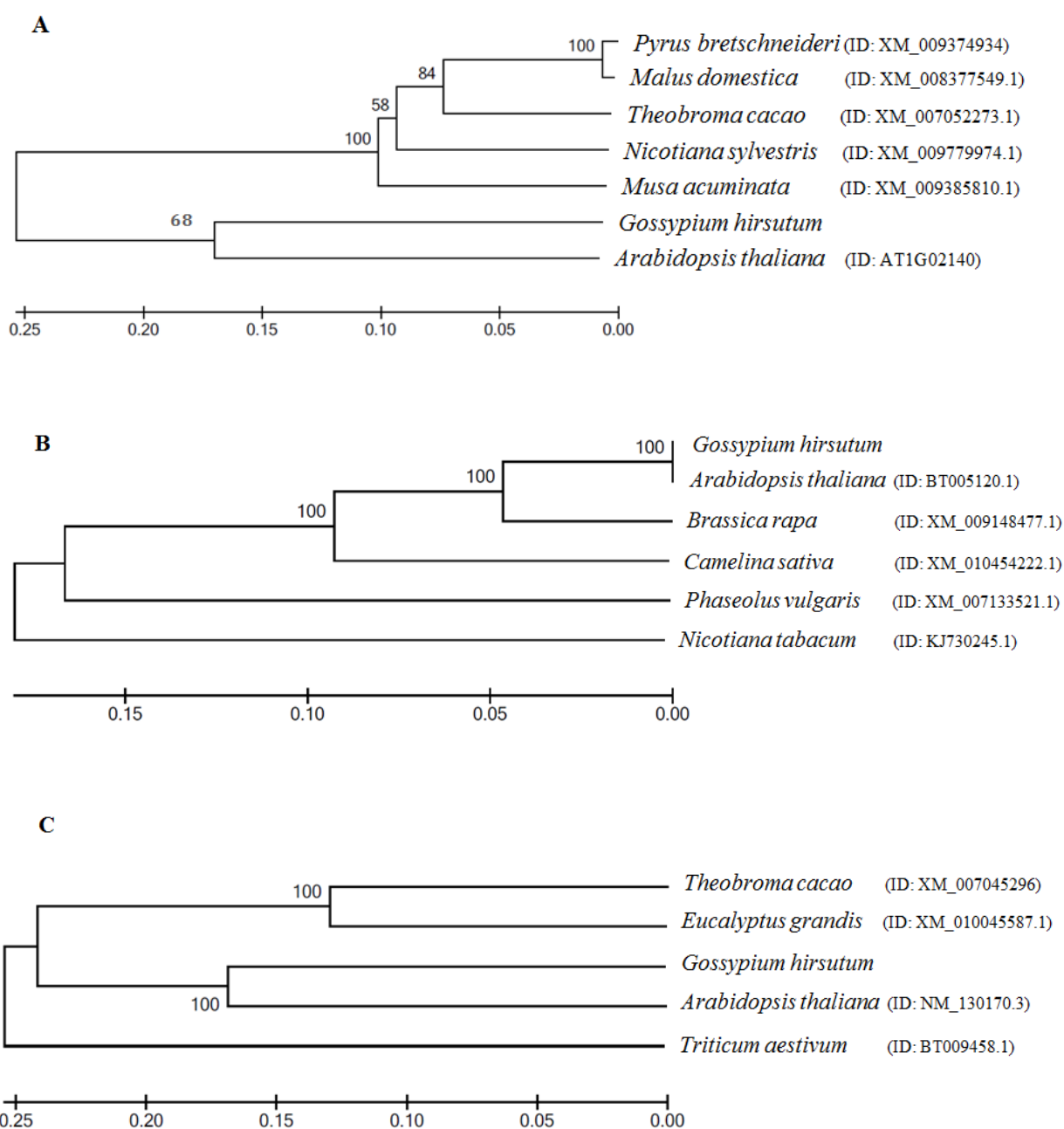


**Figura 1.** Padrão de expressão de genes envolvidos nos botões florais e diferentes órgãos vegetativos de algodoeiro (*G. hirsutum*).



**Figura 2. Expressão relativa do RNAm dos seis genes envolvidos no botão floral do algodoeiro *G. hirsutum* em diferentes estádios de desenvolvimento.** B1 (botão floral 2-4 mm); B2 (botão floral 6-8 mm); B3 (botão floral 10 mm); B4 (botão floral 12 mm); B5 (botão floral 14-16 mm); B6 (botão floral 18-20 mm); A. *GhASH*; B. *GhGLUC* ( $\beta$ -glucanases); C. *GhOVU*; D. *GhMYB* (fator de transcrição); E. *GhFIB10*; F. *GhUDP* (Uridine diphosphate glycosyltransferase).

Entre os seis genes de botão floral estudados, três deles tem estreita relação filogenética com *A. thaliana*, *GhASH* (68%), *GhMYB* (100%) e *GhOVU* (100%) (Figura 3), indicando que o genoma dessa espécie pode contribuir para identificar outros genes relacionados com a fase reprodutiva de algodoeiro envolvendo a pós-antese. Os demais genes estudados *GhFIB010*, *GhUDP* e *GhGLUC*, foram exclusivos para o algodão, contudo, é possível que exista relação com outras espécies, no entanto os depósitos de seqüências relacionadas a esses genes ainda são bastante limitados.



**Figura 3.** Relação filogenética dos genes *GhASH*, *GhMYB* e *GhOVU*. Dendrograma obtido pelo programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) utilizando-se acessos dos genes depositados no NCBI.

## Discussão

Estudos moleculares de estruturas reprodutivas têm sido alvo de pesquisas em várias angiospermas por se tratar de um conjunto de tecidos com relações intrínsecas e responsáveis pela perpetuação das espécies. Por se tratar de uma cadeia de eventos fisiológicos que inicia com a diferenciação dos primórdios florais, culminando com o desenvolvimento da semente, várias linhas de estudo podem ser estabelecidas, contudo, para auxiliar nas questões relacionadas com os procedimentos de seleção no melhoramento genético, os conhecimentos gerados com a ontogenia do botão floral, especialmente o desenvolvimento dos gametas, são os mais contributivos. Em algodão, várias informações envolvendo os aspectos moleculares da reprodução têm contribuído para o avanço biotecnológico da cultura uma vez que, várias ferramentas envolvendo seleção assistida e a transgenia dependem de informações de sequências gênicas depositadas em bancos de genes públicos (Liu et al. 2014; Zhang et al. 2014).

A fase que compreende a ontogenia do botão floral é caracterizada por uma série de processos fisiológicos e bioquímicos, todos inter-relacionados para promover o desenvolvimento da semente. Em algodão, os passos vão além, porque envolvem ainda a formação e alongação dos tricomas, que posteriormente formarão as fibras. A literatura dispõe de vários trabalhos relatando sobre novos genes identificados em botões florais (Koes et al. 2005; Xing et al. 2005; Xiao et al. 2007; Mckim et al. 2008; Ártico et al. 2014). Considerando-se a complexidade que envolve todo processo reprodutivo, acredita-se que esse tema ainda demanda investimento em pesquisa.

Os genes identificados por Pinheiro et al. (2013) por meio de biblioteca subtrativa de botão floral do algodoeiro indicam que, apesar da robustez da técnica e dos procedimentos adotados pelos autores, não tem expressão restrita em botões florais uma vez que foram detectados em outros tecidos não relacionados com a reprodução, em especial *GhASH*, *GhUDP* e *GhOVU* que estiveram presentes em diferentes órgãos vegetativos (Figura 1). O *GhASH* codifica para uma classe de proteínas envolvida no desenvolvimento das anteras, estames e

grãos de pólen (Thorstensen et al. 2008; Grini et al. 2009; Xu et al. 2010). O gene *GhUDP* codifica para enzimas envolvidas no crescimento radicular e indução de respostas de defesa (Burn et al. 2002; Nishimura et al. 2003), enquanto que o gene *GhOVU* está envolvido no desenvolvimento de óvulos em *A. thaliana* (Nain et al. 2008) além de outras funções em diferentes tecidos, como folhas, hastes, raízes e embriões (Tioni et al. 2003), com níveis de expressão diferenciado, como observado neste trabalho. Em algodão, Qi et al. (2010) verificaram regulação positiva do gene *GhOVU* em raízes, hipocótilos e cotilédones, sugerindo que estes podem funcionar no desenvolvimento inicial da plântula e em resposta à sinalização de giberelina.

Os ensaios de expressão relativa, focalizado apenas na ontogenia dos botões florais, foram de grande relevância no entendimento dos genes estudados visto que a expressão foi mais acentuada na fase mediana do botão floral, quando o mesmo encontra-se com 10 mm. Com exceção do *GhASH* onde o maior nível de expressão estendeu-se até o botão com 16 mm (Figura 2A). Estes resultados corroboram com o estudo de Quintanilha et al. (1962), que afirmam que nestes estádios o botão floral encontra-se em atividade celular intensa incluindo divisões mitóticas nos grãos de pólen dando início à degeneração das células do tapete da antera, redução da parede celular, formação dos sacos embrionários completos, surgimento e degeneração das antípodas. Isso deve justificar os picos de expressão visualizados especialmente com *GhMYB*, *GhUDP* e *GhFIB010*. Ártico et al. (2014), em estudos de expressão relativa em algodão observaram que os genes *GhPME-like1*, *GhβGal-like1* e *GhPL-like1* apresentaram alto nível de expressão em botões florais de algodoeiro com 12 mm, confirmando também a alta atividade celular nestes estádios.

Muitos genes têm sido reportados quanto a sua função no desenvolvimento floral, como o gene da *Pectina metilesterase*, envolvido nos processos de modificação de parede celular durante o desenvolvimento do pólen e o gene da *Mio-inositol oxigenase* envolvido na síntese de precursores de matriz extracelular em flores (Ártico et al. 2013). Outros genes comumente investigados neste mesmo contexto são os genes que codificam as proteínas *ASH*. Em nosso estudo, o gene *GhASH* apresenta uma superexpressão em todas as fases do botão floral comparado aos demais genes estudados (Figura 2A), este fato pode ser correlacionado à função que as proteínas *ASH* exercem nos vegetais. Estudos em *A. thaliana* sugerem que a classe de proteínas *ASH* apresenta 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; Xu et al. 2010). Devido a essa especificidade que sua atividade foi mais expressiva

e prolongada, nos botões de 10 até 16 mm, período este inteiramente envolto no desenvolvimento dos tecidos reprodutivos.

As *glucanases* são abundantes em plantas e têm sido caracterizadas a partir de uma vasta gama de espécies, sendo importantes em diversos processos biológicos, tais como: caracterização da parede celular (Bisaria e Mishra 1989; Beguin 1990; Beguin e Aubert 1994); divisão celular (Fulcher et al. 1996); microsporogênese (Worrall et al. 1992); germinação de pólen e crescimento do tubo polínico (Loetan et al. 1989; Meikle et al. 1991); amadurecimento de frutos e germinação de sementes (Vögeli-Lange et al. 1994; Leubner-Metzger et al. 1995). Algumas destas funções das *glucanases* podem ser relacionadas à atividade do gene *GhGLUC* em nosso estudo, apresentando uma expressão predominante em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral e em órgãos vegetativos (Figura 2B). Em algodoeiro, as  *$\beta$ -glucanases* possuem várias atividades, das quais algumas são necessárias para a síntese de celulose ( *$\beta$ -1,3-glucanase*;  *$\beta$ -1,4-glucanase*) atuando no desenvolvimento da fibra (Li et al. 2014; Shu et al. 2008; Wang et al. 2009) e outras (*exo- $\beta$ -glucanases*) contribuem para o crescimento do tubo polínico e regulação da germinação de pólen (Loetan et al. 1989; Meikle et al. 1991).

O gene *OVU*, envolvido no desenvolvimento de óvulos em *A. thaliana* (Nain et al. 2008), investigado neste trabalho teve sua expressão relativa em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral (Figura 2C). Este gene está relacionado como fator de transcrição da classe de genes homeobox que também atuam no desenvolvimento dos óvulos, muitos já foram identificados e caracterizados funcionalmente como: *FBP7* em *Petunia hybrida* (Cheng et al. 2000), *PHABULOSA (PHB)* e *AGL11* em *A. thaliana* (Nain et al. 2008). Outros genes que codificam os fatores de transcrição frequentemente estudados é a classe MADS-box, que desempenham um papel importante em vários processos celulares, principalmente na formação das estruturas florais, incluindo *AGAMOUS (AG)* em *A. thaliana* (Yanofsky et al. 1990), *DEFICIENS (DEF)* em *Antirrhinum majus* (Schwarz et al. 1992), *GhSQUA-like1* e *GhSQUA-like 2* em *G. hirsutum* (Ártico et al. 2013). Genes envolvidos no desenvolvimento dos órgãos florais são rotineiramente estudados dada a 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) (Theiben e Becker 2000; Theissen 2001).

Em plantas, os genes *MYB* compreendem uma das maiores famílias de fatores de transcrição (FT) conhecidas (Stracke et al. 2011), nas quais desempenham a regulação de importantes processos, incluindo a defesa contra fatores bióticos e abióticos (Dubos et al.

2010). Genes *MYB* do tipo *R2R3* codificam proteínas que estão relacionadas ao desenvolvimento celular, ação mediada por hormônios e regulação do metabolismo dos fenilpropanóides, precursores de polímeros naturais, que atuam nas interações planta-polinizador por pigmentação e compostos de aroma floral (Kranz et al. 1998; Stracke et al. 2011). Outros estudos revelam ainda que os genes *MYB33* e *MYB65* estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de anteras e grãos de pólen em *A. thaliana* (Millar et al. 2005). Em algodão, sabe-se que o fator de transcrição MYB é um importante regulador no desenvolvimento dos tricomas, sendo predominantemente expresso no início do desenvolvimento das fibras (Suo et al. 2003; Hsu et al. 2005; Pu et al. 2008). Os eventos relatados justificam o padrão no qual o gene *GhMYB* se expressou em nossos estudos, sendo observada sua atividade em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral, entretanto nos botões com tamanho entre 10 a 14 mm o nível de expressão foi mais acentuado (Figura 2D), o que pode ser atribuído aos eventos que ocorrem para o desenvolvimento dos grãos de pólen e diferenciação da antera.

O resultado envolvendo o gene *GhFIB010* relevou expressão em todos os estádios do botão floral (Figura 2E). O gene *GhFIB010* é homólogo aos genes da classe *MAP Kinases* em *A. thaliana*. As proteínas quinases (MAPK) estão presentes em todos os eucariotos e em plantas são essenciais em vias de transdução de sinal, estando envolvidas no processo de regulação da divisão celular, desenvolvimento de alguns órgãos reprodutivos, e em vias hormonais (Hirt 2000; Tena et al. 2001). Bögre et al. (1999) avaliaram os genes *MMK3* e *MMK1* em diferentes tamanhos de botões florais (1, 2 e 4 mm) de *Medicago sativa* e evidenciaram sua função no processo de divisão celular. Horda et al. (2008) sugerem que os genes *MPK3* e *MPK6* participam do desenvolvimento de anteras bem como na diferenciação celular. Em *A. thaliana* outros estudos indicam que o NEVERSHED (NEV), identificado como um receptor quinase, participa da modulação dos órgãos florais (Leslie et al. 2010). Já estudos com *Solanum chacoense*, demonstraram que o gene *FRK1* da classe *MAP Kinases*, participa do desenvolvimento dos sacos embrionários e dos grãos de pólen (Lafleur et al. 2015).

As *UDP-glicosiltransferases* (UGT) (Difosfato Glicosiltransferase de Uridina) são enzimas envolvidas no crescimento e desenvolvimento de células, além de participar da biossíntese e remodelagem de polímeros de carboidratos da parede celular durante diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, regulam ainda várias funções como a homeostase hormonal, desintoxicação de xenobióticos, biossíntese e armazenamento de metabólitos secundários (Aspeborg et al. 2005; Yin et al. 2010; Barvkar et al. 2012). Em *Arabidopsis* o gene *AtCSLA7*, codificador da *glicosiltransferase*, está relacionado com o desenvolvimento do



grão de pólen (Goubet et al. 2003). Em algodão, Li et al. (2014) identificou que o gene *GhGT43A1* como preferencialmente expresso em fibras com 15 e 20 dpa, e evidenciou que a superexpressão observada está diretamente relacionada com a alta deposição de celulose, participando na síntese do xilano durante o desenvolvimento da fibra. Em nosso estudo, o gene *UDP* foi expresso em todos os estádios do botão floral corroborando assim com a função das *glicosiltransferases* no crescimento e desenvolvimento de células, bem como na deposição da celulose, havendo um aumento da expressão no botão com 10 mm (Figura 2F).

Todos os genes investigados neste trabalho apresentaram atividade nos diferentes tamanhos dos botões florais selecionados, contudo, o maior nível de expressão foi observado no tamanho de 10 mm. O gene *GhASH* foi o que também apresentou o maior nível de expressão em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral quando comparado aos demais genes. Como fortes candidatos para o isolamento de regiões regulatórias destacaram-se os genes *GhASH*, *GhGLUC* e *GhOVU*, visto que a expressão foi estável em todos os estádios de desenvolvimento do botão floral. Embora o presente estudo tenha investigado a expressão de seis genes relacionados a botão floral de algodoeiro, outros estudos serão necessários para identificar a exata localização da expressão nos órgãos florais bem como a função de cada gene.

## AGRADECIMENTOS

Monsanto e Embrapa Algodão pelo suporte financeiro e a CAPES pela bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

Ártico S, Lambret Frotté J, Nardeli SM et al (2013) Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. *Plant Mol Biol Rep* 32:630–643. Doi: 10.1007/s11105-013-0674-0

Ártico S, Ribeiro-Alves M, Oliveira-Neto OB et al (2014) Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics* 15:854. Doi: 10.1186/1471-2164-15-854

Aspeborg H, Schrader J, Coutinho PM et al (2005) Carbohydrate-active enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid Aspen. *Plant Physiol* 137:983-997. Doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104>

Barvkar VT, Pardeshi VC, Kale SM et al (2012) Phylogenomic analysis of UDP glycosyltransferase 1 multigene family in *Linum usitatissimum* identified genes with varied expression patterns. *BMC Genomics* 13:1-13. Doi: 10.1186/1471-2164-13-175

Barroso PAV, Hoffmann LV (2007) Algodoeiros geneticamente modificados. In: FREIRE, E. C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, p.918.

Beguín P (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol* 44:219-248.

Beguín P and Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13:25-58. Doi: 10.1128/AEM.00876-07

Benfey PN, Ren L, Chua NH (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J*, 9: 1677–1684. Doi: 10.1126/science.250.4983.959

Bisaria VS and Mishra S (1989) Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Crit Rev Biotechnol* 9:61-103. Doi: 10.1590/S1415-47572013000300015

Bögre L, Calderini O, Binarova P (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11:101–113. Doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.11.1.101>

Burn JE, Hocart CH, Birch RJ et al (2002) Functional analysis of the cellulose synthase genes *CesA1*, *CesA2*, and *CesA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:797-807. Doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010931>

Chen X, Wang Z, Wang J, Wang M, Zhao L, Wang G (2007) 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* 88:11-20. Doi: 10.1007/s11240-006-9165-4

Cheng XF, Wittich PE, Kieft H et al (2000) Temporal and spatial expression of MADS box genes, *FBP7* and *FBP11*, during initiation and early development of ovules in wild type and mutant *Petunia* hybrid. *Plant Biol* 2:693-702. Doi: 10.1055/s-2000-16640

Cook M, Thilmony R (2012) The *OsgEX2* gene promoter confers sperm cell expression in transgenic rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 1138–1148: Doi: 10.1007/s11105-012-0429-3

Dubos C, Stracke R, Growold E et al (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 15:573-581. Doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.005.

Fulcher RG, Cully MC Setterfield G et al (1996)  $\beta$ -1,3-Glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. *Can J Bot* 54:459-542. Doi: 10.1139/b76-051

Goubet F, Misrahi A, Park SK et al (2003) *AtCSLA7*, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:547-557. Doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.014555>

Grini PE, Thorstensen T, Alm V et al (2009) The *ASH1 HOMOLOG 2* (*ASHH2*) Histone H3 methyltransferase is required for ovule and anther development in *Arabidopsis*. *Plos One* 4:1-15. Doi: 10.1371/journal.pone.0007817

Hashemi SM, Hosseini SM, Damalas CA (2009). Farmers competence and training needs on pest management practices: participation in extension workshops. *Crop Prot* 28: 934-939. Doi: doi:10.1016/j.cropro.2009.07.007

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8:R19. Doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19

Hirt H (2000) Results and problems in cell differentiation: MAP kinases in plant signal transduction. Heidelberg: Springer.

Horda CLH, Suna YJ, Pillitterie LJ et al (2008) Regulation of Arabidopsis early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Mol Plant* 1:645-658. Doi: 10.1093/mp/ssn029

Hsu C, Jenkins JN, Saha S et al (2005) Transcriptional regulation of the lipid transfer protein gene LTP3 in cotton fibers by a novel MYB protein. *Plant Sci* 168:167-181. Doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.033

International Cotton Advisory Committee (ICAC). Cotton Price Gains Attractiveness. <https://www.icac.org/Press-Release/2015/PR-8-Cotton-Price-Gains-Attractiveness>. Accessed 09 Jan 2015.

James C (2014) EXECUTIVE SUMMARY, brief 49. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014 <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp/>. Accessed 03 April 2015.

Jiang Y, Guo W, Zhu H et al (2012) Overexpression of GhSusA1 increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality. *Plant Biotech J* 10:301–312. Doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00662.x

Kranz HD, Denekamp M, Greco R et al (1998) Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:263-276. Doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00278.x

Lafleur E, Kapfer C, Joly V et al (2015) The FRK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) from *Solanum chacoense* is involved in embryo sac and pollen development. *J Exp Bot* 11p. Doi: 10.1093/jxb/eru524

Leslie ME, Lewis MW, Youn JY, Daniels MJ, Liljegren (2010) The EVERSLED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in *Arabidopsis*. *Development*. 137: 467–476. Doi: 10.1242/dev.041335

Leubner-Metzger G, Fründt C, Vögeli-Lange R et al (1995) Class I  $\beta$ -1,3- glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 109:751-759. Doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.3.751>

- Li B, Yang Y, Hu W-R et al (2014) Over-expression of GhUGP1 in upland cotton improves fibre quality and reduces fibre sugar content. *Plant Breeding* 1-6. Doi: doi:10.1111/pbr.12247
- Li L, Huang J, Qin L et al (2014) Two cotton fiber-associated glycosyltransferases, GhGT43A1 and GhGT43C1, function in hemicellulose glucuronoxylan biosynthesis during plant development. *Physiol Plant* 152:367–379. Doi: 10.1111/ppl.12190
- Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L, Yang WC (2005) The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell* 3:859-75. Doi: 10.1105/tpc.104.029629
- Lightfoot DJ, Orford SJ, Timmis JN (2013) Identification and Characterisation of Cotton Boll Wall-Specific Gene Promoters for Future Transgenic Cotton Varieties. *Plant Mol Biol Rep* 31:174. Doi: 10.1007/s11105-012-0484-9
- Liu J, Pang C, Wei H et al (2014) Proteomic analysis of anthers from wild-type and photosensitive genetic male sterile mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol* 14:1-16. Doi: 0.1186/s12870-014-0390-4
- Loetan T, Ori N, Fluhr R (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1:881-887. Doi: 10.1105/tpc.1.9.881
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10: 236-42. Doi: 10.1371/journal.pone.0072364
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ et al (1991) The location of (1-3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1-3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185:1-8. Doi: 10.1007/BF00194507
- Mckim SM, Stenvik GE, Butenko MA, Kristiansen W, Cho SK, Hepworth SR, Alen RB, Haughn GW (2008) The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* 135:1537-1543. Doi: 10.1242/dev.012807
- Millar AA, Gubler F (2005) The *Arabidopsis* GAMYB-Like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *The Plant Cell* 17:705–721. Doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104>.
- Nain V, Verna A, Kumar N et al (2008) Cloning of an ovule specific promoter from *Arabidopsis thaliana* and expression of  $\beta$ -glucuronidase. *Indian J Exp Biol* 46:207-211. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/4454/1/IJEB%2046%284%29%20207-211.pdf>
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH et al (2003) Loss of callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301:969-972. Doi: 10.1126/science.1086716
- Pacini, E. and Franchi, G.G. (1993). Role of tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant. Syst. Evol.* 7: 1-11. Doi: 10.1007%2F978-3-7091-6661

- Pinheiro MPN, Batista VGL, Martins NF et al (2013) Genes expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) buds isolated by wit subtractive library. *Genet Mol Res* 12:10.4238/2013-43. Doi: 10.4238/2013.January.16.7
- Pu L, Li Q, Fan, X et al (2008) The R2R3 MYB transcription factor GhMYB109 is required for cotton fiber development. *Genetics* 180: 811-820. Doi: 10.1534/genetics.108.093070
- Qin YF, Li DD, Wu YJ et al (2010) Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signaling. *Plant Cell Rep* 29:1147-1156. Doi: 10.1007/s00299-010-0901-1
- Quintanilha A, D'êça LS, Cabral A (1962) Desenvolvimento do botão floral do algodoeiro em função do tempo. Instituto do Algodão de Moçambique. Coimbra
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-25. Doi: 10.1093/molbev/msm092
- Schwarz SZ, Hue I, Huijser P et al (1992) Characterization of the Antirrhinum floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J* 11:251-263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556446/pdf/emboj00086-0249.pdf>
- Shu HM, Wang YH, Zhang WJ, Zhou ZG (2008) Activity Changes for Enzymes Associated with Fiber Development and Relation to Fiber Strength in Two Cotton Cultivars. *Acta Agronomica Sinica* 34:437-446. Doi: 10.3724/SP.J.1006.2008.00437
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2011) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4:447-456. Doi: 10.1016/S1369-5266(00)00199-0
- Subramanian S, Hu X, Lu G, Odelland JT, Yu O (2004) The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots. *Plant Molecular Biology*, 54: 623–639. Doi: 10.1023/B:PLAN.0000040814.28507.35
- Suo J, Xiaoe L, Pu L (2003) Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochim Biophys Acta* 1630:25-34. Doi: 10.1016/j.bbaexp.2003.08.009
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729. Doi: 10.1093/molbev/mst197
- Tena G, Asai T, Chiu WL et al (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* 4:392–400. Doi: 10.1016/S1369-5266(00)00191-6
- Theiben G, Becker A, Di Rosa A et al (2000) A short history of MADS-genes in plants. *Plant Mol Biol* 42:115-149. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-4221-2\\_6#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-4221-2_6#page-1)
- Theissen G (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4:75-85. Doi: 10.1016/S1369-5266(00)00139-4

- Thorstensen T, Grini PE, Mercy IS et al (2008) The Arabidopsis SET-domain protein ASHR3 is involved in stamen development and interacts with the bHLH transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS). *Plant Mol Biol* 66:47-59. Doi: 10.1007/s11103-007-9251-y
- Tioni MF, Gonçalves DH, Raquel LC (2003) Knotted1-like genes are strongly expressed in differentiated cell types in sunflower. *J Exp Bot* 54:681- 690. Doi: 10.1093/jxb/erg077
- Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM et al (1994) Evidence for a role of  $\beta$ -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J* 5:273-278. <http://www.seedbiology.de/pdf/plantphysiol95.pdf>
- Wang Y, Feng Y, Xu N et al (2009) Response of the enzymes to nitrogen applications in cotton fiber (*Gossypium hirsutum* L.) and their relationships with fiber strength. *Sci China C Life Sci* 52:1065-1072. Doi: 10.1007/s11427-009-0147-8
- Wilkinson JE, Twell D, Lindsey K (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 48: 265-275. Doi: 10.1093/jxb/48.2.265
- Worrall D, Hird DL, Hodge R et al (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4:759-771. Doi: 10.1105/tpc.4.7.759
- Xiao YH, Zhang ZS, Yin MH et al (2007) Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 358:73-78. Doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.084
- Xing S, Rosso MG, Zachgo S (2005) *ROXY1*, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **132**, 1555-1565.
- Xu J, Yang C, Yuan Z (2010) The *ABORTED MICROSPORES* regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **22**, 91–107.
- Yanofsky MF, Bowman JL, Drews GN et al (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346:35-39. Doi: 10.1038/346035a0
- Yin Y, Chen H, Hahn MG et al (2010) Evolution and function of the plant cell wall synthesis-related glycosyltransferase family 8. *Plant Physiol* 153:1729–1746. Doi: 10.1104/pp.110.154229
- Zhang H, Wan Q, Ye W (2013) Genome-wide analysis of small RNA and novel microRNA discovery during fiber and seed initial development in *Gossypium hirsutum*. *Plos One* 8:e69743-. Doi: 10.1371/journal.pone.0069743
- Zhang J, Zou D, Li Y et al (2014) GhMPK17, a cotton mitogen-activated protein kinase, is involved in plant response to high salinity and osmotic stresses and ABA signaling. *Plos One* 9:e95642. Doi: 10.1371/journal.pone.0095642.

Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. J Comput Biol 12: 1047-1064, 2005. Website: PCR Miner. Doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047

### **Capítulo III**

## **EXPRESSÃO TISSULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA ESTRUTURA FLORAL DO ALGODOEIRO *Gossypium hirsutum* var. *latifolium***

Submetido a Revista: Functional Plant Biology



## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Functional Plant Biology*.

Manuscript ID: FP15139

Title: TISSULAR EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE FLORAL STRUCTURE  
OF COTTON PLANT *Gossypium hirsutum* var. *Latifolium*

Pinheiro, Morganna  
Batista, Vandré  
Authors: Melo Filho, Péricles  
Santos, Roseane  
Lima, Liziane

Date Submitted: 23-May-2015



# EXPRESSÃO TISSULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA ESTRUTURA FLORAL DO ALGODOEIRO *Gossypium hirsutum* var. *latifolium*

PINHEIRO, M.P.N.<sup>(1)</sup>; BATISTA, V.G.L.<sup>(1)</sup>; MELO FILHO, P.A.<sup>(2)</sup>; SANTOS, R.C.<sup>(3)</sup>; LIMA, L.M.<sup>(3)</sup>

- (1) Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE  
(2) Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.  
(3) Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

Autor correspondente - Liziane Maria de Lima, Rua Oswaldo Cruz, nº 1143, Centenário, CEP 58428-095, Brasil, 55 83 3182-4300, liziane.lima@embrapa.br.

**RESUMO** - Estudos de genômica na fase reprodutiva do algodoeiro oferecem um manancial de oportunidades para contribuir com os avanços do melhoramento genético e molecular dessa oleaginosa. No presente estudo seis genes identificados em estudos prévios a partir de uma biblioteca subtrativa de botão floral do algodoeiro foram avaliados quanto à expressão tissular de modo a entender suas atuações nos órgãos floríferos do algodoeiro. Oligonucleotídeos para os genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* foram desenhados e utilizados em análises de RT-PCR semiquantitativa e RT-qPCR a partir de RNAs extraídos de brácteas, sépalas, pétalas, anteras e óvulos coletados de botões florais de 10 mm, e ainda fibras de algodão a partir de botões florais com 8, 10 e 18 dias pós-antese. De maneira geral, a expressão dos genes nos botões florais foi mais acentuada nos gametófitos, especialmente o masculino. Nas fibras, o maior nível de expressão foi encontrado na fase de 18 DPA que corresponde a fase de alongação, que precede a formação da parede secundária da fibra. Esta fase tem sido bastante investigada, uma vez que o comprimento das fibras de algodão é uma característica determinante da qualidade e rendimento. Como fortes candidatos para a obtenção de promotores tecido- específico e assim contribuir com o programa de melhoramento genético do algodão visando principalmente resistência a pragas, qualidade e coloração das fibras, destacaram-se os genes *GhOVU* (óvulos), *GhUDP* (anteras), *GhGLUC* (fibras) e *GhFIB010* (fibras) visto que a expressão foi mais diferenciada nos respectivos tecidos, quando comparado aos demais genes

Keywords - órgãos floríferos; fibras; RT-PCR semiquantitativa; RT-qPCR

## INTRODUÇÃO

O agronegócio mundial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é um dos segmentos agrícola que tem gerado uma volumosa soma de recursos devido a importância da matéria prima para as indústrias têxtil e oleoquímica. Isso tem permitido um robusto avanço nos investimentos de pesquisa nas áreas agrária e biotecnológica, que tem contribuído

expressivamente para o desenvolvimento de novas tecnologias, a exemplo das cultivares GM que permitem manejo com redução de pesticidas e, conseqüentemente, menor custo de produção (James, 2014). Apesar das várias qualidades que as cultivares GM detêm, os transgenes inseridos nas cultivares comerciais são limitados apenas a defesa contra ervas daninhas e lepidópteros (James, 2014). Há necessidade de investimento na identificação e isolamento de novos transgenes que possam contribuir com a melhoria agrônômica e têxtil da cultura, especialmente em caracteres que não podem ser atendidos pelo melhoramento genético convencional.

Com o advento da biotecnologia e a manipulação genética do algodoeiro, um novo arsenal de estratégias para obtenção de cultivares melhoradas estão sendo disponibilizadas. As informações disponíveis na área genômica têm possibilitado o acesso de vários genes que têm sido utilizados como recurso para auxiliar o melhoramento da cultura, nas áreas biológica e molecular.

Genes envolvidos na fase reprodutiva de algodoeiro é tema de estudo de vários pesquisadores porque as estruturas que compõem especialmente os órgãos florais são vulneráveis a vários problemas de origem biótica e abiótica que conseqüentemente afetam a produção de sementes e de fibras. A fase reprodutiva leva entre 105 a 200 dias, dependendo da cultivar e do local de cultivo, e durante esse período vários eventos fisiológicos acontecem isolados ou simultaneamente no processo de desenvolvimento da flor até a maturação dos tricomas e síntese das fibras. Intercorrências durante a fertilização até o estabelecimento da semente irão comprometer substancialmente a formação e a qualidade das fibras, o que resultará na rejeição pelo mercado têxtil.

Vários genes envolvidos com a estrutura floral do algodoeiro encontram-se descritos, entre eles, citam-se *GhPGFS1* e *GhPGFS2* envolvidos no desenvolvimento da flor (Ártico et al. 2014); *GhPS1*, no desenvolvimento de pétala e senescência (Shi et al., 2009); *ROXY1*, no desenvolvimento de antera e pétala (Xing et al., 2005); *GhSusA1*, associado com a produtividade e qualidade das fibras (Jiang et al. 2012) e ainda envolvido com a síntese de flavonoides, que conferem pigmentação da flor e das fibras (Koes et al. 2005; Xiao et al. 2007). Vários outros genes encontram-se disponíveis no Cotton DB (*Cotton Genome Database* - <http://www.cottondb.org/wwwroot/cdbhome.php>) alguns dos quais sem esclarecimento de sua função ou regulação durante a ontogenia do processo de reprodução. Em comparação com outros bancos de dados, é possível constatar situações em que seqüências gênicas são filogeneticamente conservadas podendo ser utilizadas como ferramentas para estudos de identificação e validação de novos genes. Neste âmbito as classes *MADS-box* e *Homeobox*

atuam em estruturas florais e são bastante investigados devido a sua importância no esclarecimento da identidade de órgãos florais através do modelo “ABCE” que explica as classes de genes relacionados ao surgimento dos quatro verticilos florais (carpelos, estames, pétalas, sépalas) (Theiben e Becker, 2000; Theiben, 2001), tais como na classe *MAD-Box*: *AGAMOUS* (AG), *DEFICIENS* (DEF), *SEPALLATA* (SEP), *APETALA* (AP3) (Yanofsky et al., 1990; Schwarz-Sommer et al., 1992; Vaniyambadi et al., 2006) e na classe *Homeobox*: *HD-ZIP I* até *IV*, *KNOX*, *SAWADEE*, *WOX* (Mukherjee et al., 2009; Bhattacharjee et al., 2015).

Apesar do genoma do algodoeiro, constituído de 1,7 Mpb, já ter sido decifrado, há ainda várias oportunidades para estudar e elucidar o funcionamento e atividade de vários genes depositados em bancos de genes, especialmente os oriundos de bibliotecas. Pinheiro et al. (2013) fizeram uso dessa metodologia e identificaram vários genes envolvidos em funções reprodutivas do algodoeiro, alguns dos quais expressos nos gametófitos masculino e feminino. No presente estudo, seis desses genes foram utilizados para aprofundar os conhecimentos a respeito da expressão em diferentes tecidos reprodutivos dessa espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

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

Plantas da cultivar precoce BRS 8H foram cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo natural, em Campina Grande-PB, Brasil (7°13'50"S, 35°52'52"W e 551 m). As plantas foram mantidas em vasos (10 L), contendo solo previamente fertilizado. As regas foram mantidas diariamente, mantendo-se a capacidade de campo.

A partir do início da floração, aos 45 dias, foram coletados tecidos reprodutivos de botões florais com 10 mm, representados por: brácteas, sépalas, pétalas, anteras e óvulos; e ainda fibras com 8, 10 e 18 DPA (dias pós-antese).

O RNA total foi extraído utilizando o *Invisorb Spin Plant RNA Mini kit (Invitec)*, a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0.8% e a concentração e pureza por espectrofotometria. Uma alíquota de 4 µg de RNA foi tratado com *DNase I (Kit DNase Amplification Grade- Invitrogen)* e a síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando oligo (dT)<sub>15</sub> e o *kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)*. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante.

## Análise de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa

As reações foram conduzidas utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores dos genes (*GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP*), selecionados a partir de uma biblioteca subtrativa de botão floral de algodoeiro (Pinheiro et al., 2013), e desenhados utilizando o software Primer 3 e analisados quanto a presença de hetero e homodímeros pelo Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com/>). As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 1. Como controle endógeno foi utilizado o gene da *poliubiquitina* (*GhUBQ14*) (Ártico et al., 2014). Para cada reação de PCR foram utilizados: 1 µL de cDNA; 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador *forward* e *reverse* (0,2 µM); 0,2 µL de *Taq Polimerase* (0,04 U/ µL); 0,5 µL de dNTP (0,2 mM); 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (2 mM) e 2,5 µL de tampão 1X, para um volume final de 25 µL. As condições das PCRs foram: pré-desnaturação a 95 °C/1 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento por 1 min, extensão à 72 °C/2 min e extensão final a 72 °C/5 min. Os amplicons foram analisados em gel de agarose (0,8%), fotodocumentados pelo programa Kodak MI SE (*Molecular Image Software*) e para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador 100 pb (Ludwig).

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos de *G. hirsutum* utilizados para o estudo dos genes por RT-PCR semiquantitativa.

Gene	Sequência (5'→3')	Fragmento (pb)	Tm
<i>GhGLUC</i>	F-CCGGGGAGCAAAGAAGAAG R-GCAGCAATCCTGTCAATGGT	532	54°
<i>GhOVU</i>	F-CCATCCGCAAAGTTTCAACT R-CCTGACTCAACCAATTCCAGA	405	54°
<i>GhMYB</i>	F-GGGGGAGTTGTTCTGAAGAA R-CCACACTGGTACTGTGGCTC	401	52°
<i>GhMYB</i>	F-GGGGGAGTTGTTCTGAAGAA R-CCACACTGGTACTGTGGCTC	401	52°
<i>GhFIB010</i>	F-GGACAACCATAAGCAGTGG R-GGCACCACCAGTAGTGAAG	304	47°
<i>GhUDP</i>	F-TTCTTCACTCCGATAGCTCACA R-TTAGCATGGACTCCCCAGAC	268	54°
<i>GhASH</i>	F-AGCACTTCAAATCCTGAACCA R-ACAATTGGCCAGAACCAGA	271	52°

## Análise da expressão gênica por RT-qPCR

As análises quantitativas em tempo real (RT-qPCR) foram feitas no termociclador *Eco™ Real-Time PCR System* (Illumina) para amplificar fragmentos com aproximadamente 200 pb e em temperatura de anelamento de 60°C. Os oligonucleotídeos dos respectivos genes foram desenhados por meio do programa software Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) e analisados quanto a presença de hetero e homodímeros pelo Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com/>). Como controle endógeno foram utilizados os genes da *GhACT* (Actina), *GhUBQ14* (poliubiquitina) e *GhPP2A* (subunidade catalítica de fosfatase 2A) (Ártico et al. 2014). As sequências dos oligonucleotídeos específicos utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 2. Para cada reação foram utilizados: *Fast EvaGreen qPCR Master Mix 2X* (Biotium), 200 nM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2) e 1 µL do cDNA diluído (1:5), de todos os tecidos vegetais. Todas as reações foram feitas em triplicata experimental e duplicata biológica. Os dados brutos de fluorescência para determinação da curva de Melt, valores de Cts e os gráficos foram gerados automaticamente pelo termociclador 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.

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos de *G. hirsutum* utilizados para o estudo da expressão relativa dos genes por RT-qPCR.

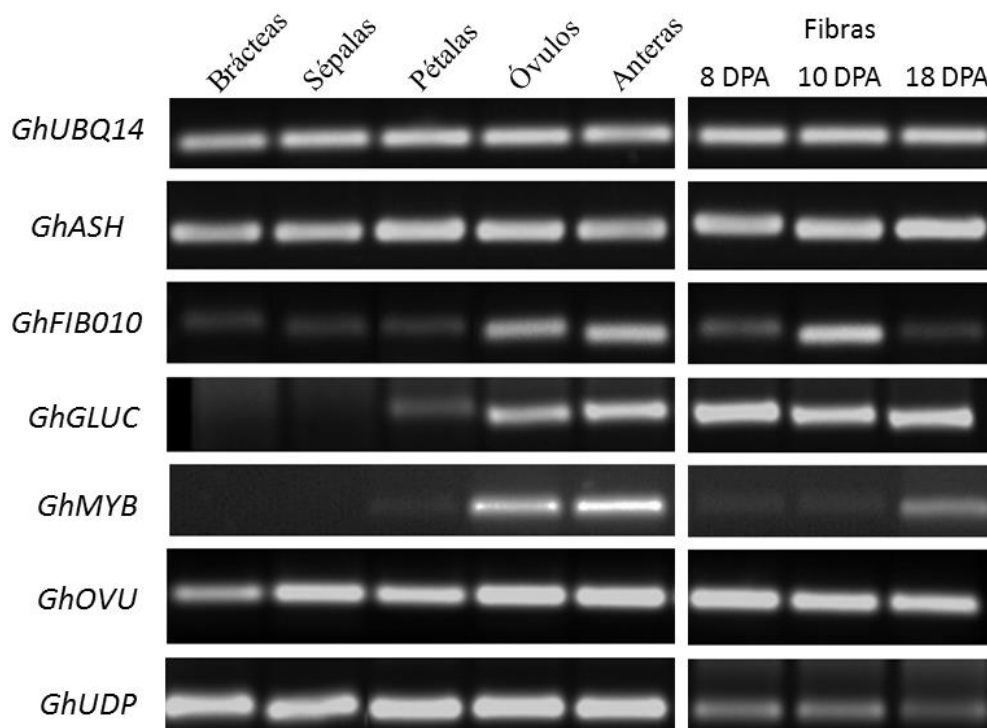
Gene	Sequência (5' → 3')
<i>GhASH</i>	R - CGCCAATTGTTACAGACACACCTCTC F - CAAAGATTGGGTCCCTTGTGATGTT
<i>GhFIB010</i>	R - CCACCAAACAGGTAATCCAAGGAAGA F - CCAGAATTGTGGCAACTTTCTTACGG
<i>GhGLUC</i>	R - GGCCCAGATTATGGTGTCTTAGCTG F - GGCCTTCCATGGTTTAACTGAATCAA
<i>GhMYB</i>	R - AGCTGATCATTGAACTCCATGCAAAG F - GCCCTTATCCAATGCATTAACCACA
<i>GhOVU</i>	R - TTGGAAAGTAGTGGAGGCCTAGATGG F - CATCCCTGTTTCTCACTTTGTGTTGC
<i>GhUDP</i>	R - TTCACTCCGATAGCTCACAACCTCTCAA F - TTTGTGGTAGGGTTGTCAATGGTGTC

## RESULTADOS

### Análise dos transcritos por RT-PCR semiquantitativa

O padrão de expressão dos genes nos vários tecidos de botão floral encontra-se na figura 1. Verificou-se que os genes *GhASH* e *GhUDP* apresentaram elevado nível de expressão em todos os tecidos estudados, superior ao padrão encontrado com o gene constitutivo (*GhUBQ14*). Perfil similar foi observado para o gene *GhOVU*, embora com padrão menos acentuado nas brácteas. Os genes *GhFIB010*, *GhGLUC* e *GhMYB*, na análise semiquantitativa demonstraram especificidade com os gametófitos masculino e feminino, representados pelos óvulos e anteras.

Na pós-antese, fase em que as fibras foram avaliadas, verificou-se que *GhASH*, *GhGLUC* e *GhOVU* se expressam forte e continuamente, ao contrário de *GhMYB* que inicia a expressão a partir dos 18 DPA e *GhUDP* que, aparentemente, decresce a expressão nessa fase. O gene *GhFIB010* pareceu ser específico do processo ontogenético da fibra, uma vez que revelou expressão acentuada na fase 10 DPA (Figura 1).



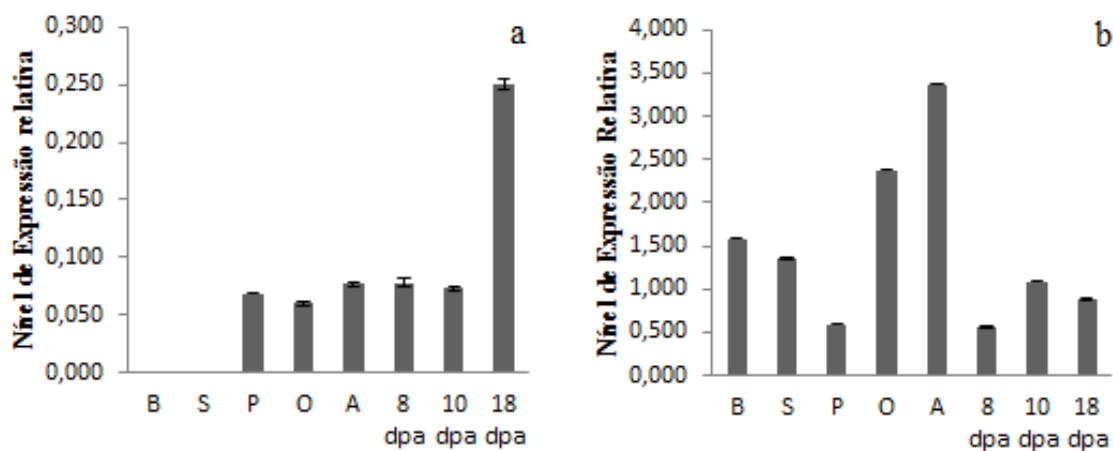
**Figura 1.** Padrão de expressão de genes envolvidos nos diferentes tecidos do botão floral e durante três fases fenológicas das fibras do algodoeiro (*G. hirsutum*). DPA: dias pós-antese.

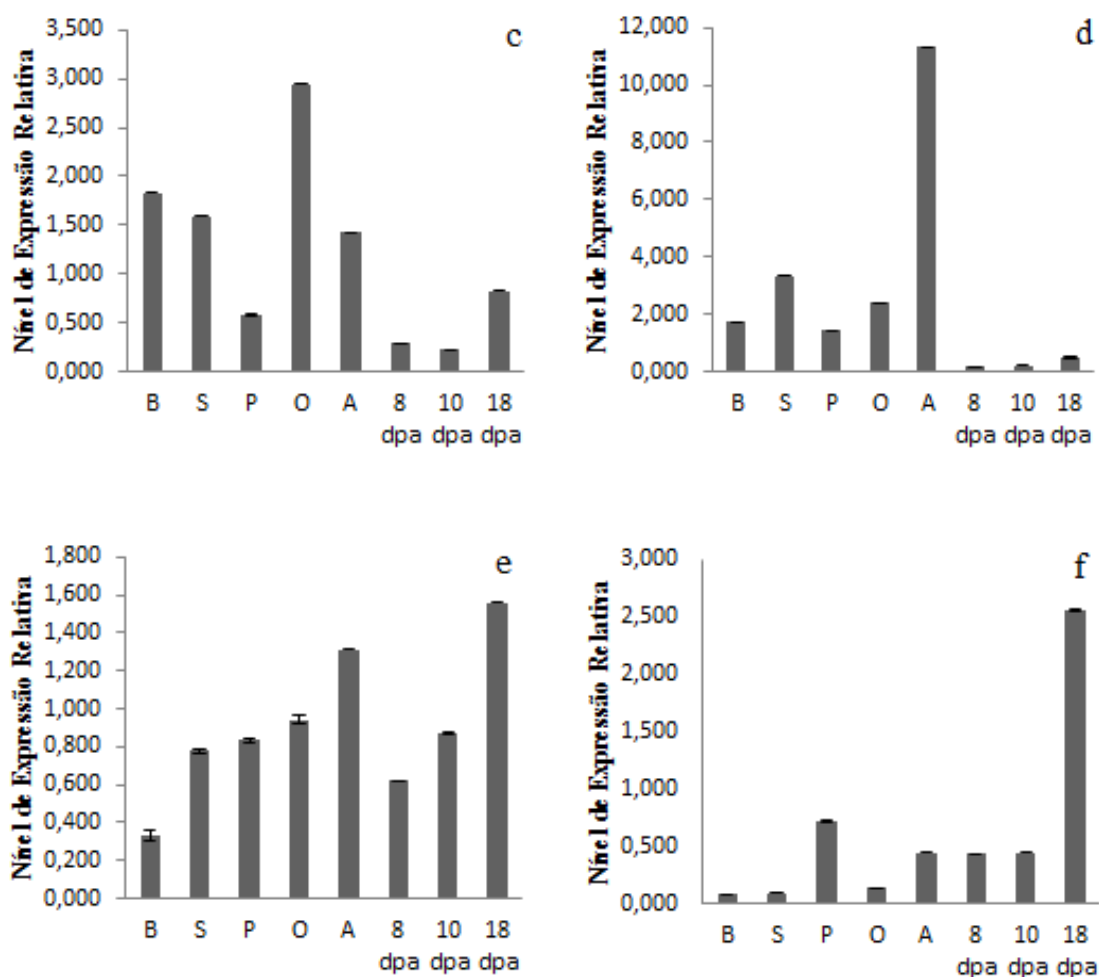
## Análise da expressão gênica por RT-qPCR

É compreendido que muitas vezes em estudos de análises por RT-qPCR semiquantitativa não é possível observar diferenças reais no nível de expressão gênica. Então, a fim de validar em níveis quantitativos a expressão dos genes *GhASH*, *GhFIB010*, *GhGLUC*, *GhMYB*, *GhOVU* e *GhUDP* foram conduzidos ensaios de PCR em tempo real. Os resultados obtidos mostraram que todos os genes apresentaram expressão relativa equivalente com suas funcionalidades.

A expressão relativa dos genes estudados em tecidos do botão floral e fibras encontra-se na figura 2. Observou-se que o padrão de expressão verificado por RT-qPCR foi próximo aos obtidos na análise semiquantitativa na pré-antese (Figura 1), enquanto que para fibras, o padrão mais dissonante foi com o gene *GhUDP* que revelou baixa expressão em todas as fases estudadas. De maneira geral, a expressão dos genes nos botões florais foi mais acentuada nos gametófitos, especialmente o masculino. Nas fibras, o maior nível de expressão foi encontrado na fase de 18 DPA que corresponde a fase de alongação, que precede a formação da parede secundária da fibra.

Considerando-se, contudo, os valores relativos da expressão de cada gene disponibilizados na Figura 2, verificou-se que o gene *GhMYB* se expressa quase que basalmente nos tecidos estudados, enquanto que *GhUDP* e *GhGLUC* revelaram picos de expressão acentuados em anteras e fibras aos 18 DPA, respectivamente.





**Figura 2.** Expressão relativa dos genes envolvidos nos diferentes tecidos do botão floral e nas três fases fenológicas das fibras do algodoeiro *G. hirsutum*. B (Brácteas), S (Sépalas), P (Pétalas), O (Óvulos), A (Anteras), 8 DPA (Fibras com 8 dias pós-antese), 10 DPA (Fibras com 10 dias pós-antese), 18 DPA (Fibras com 18 dias pós-antese). *GhMYB* (a), *GhFIB010* (b), *GhOVU* (c), *GhUDP* (d), *GhASH* (e) e *GhGLUC* (f).

## DISCUSSÃO

Os estudos de transcriptoma a partir de genes de interesse em espécies cultivadas tem possibilitado aos melhoristas utilizá-los como ferramentas em procedimentos de seleção assistida, além e criar oportunidades para identificação e isolamento de regiões regulatórias para servirem como guias de genes de interesse em trabalhos de transgenia.



O programa de melhoramento de algodão conduzido pela Embrapa tem possibilitado a geração de cultivares competitivas para o agronegócio mundial, por meio das metodologias disponíveis no melhoramento convencional. Com os emergentes problemas que a lavoura enfrenta decorrentes de estresses bióticos e abióticos, cada vez mais se torna necessário associar as técnicas do melhoramento convencional com as atuais ferramentas disponíveis por meio dos processos biotecnológicos.

Na linha de transgenia, cada vez mais se demanda informações sobre novos genes com potencial de contribuir para a melhoria da lavoura, ou no processo de defesa contra agentes bióticos ou na melhoria da fibra, cuja matéria prima é a de maior valor comercial do algodão. Genes expressos em estruturas reprodutivas e os reguladores de sua expressão são valiosos ativos biotecnológicos, devido ao largo benefício econômico que podem agregar às cultivares comerciais.

A equipe de Biotecnologia da Embrapa tem focalizado nesse segmento, investindo em pesquisas e conhecimentos da função de novos genes envolvidos na fase reprodutiva para serem posteriormente utilizados nos trabalhos de biotecnologia da cultura. Pinheiro et al. (2013) construíram uma biblioteca visando identificar genes específicos de botão floral de algodão (cv. BRS 8H), focalizando nas fases iniciais de desenvolvimento até antes da antese. Vários *contigs* envolvidos em funções reprodutivas foram encontrados, alguns dos quais expressos nos gametófitos masculino e feminino. A expressão de seis desses genes foi explorada nesse trabalho, por meio de RT-PCR semiquantitativa e RT-qPCR, usando tecidos de botões florais jovens e fibras, nos estágios de 8,10 e 18 dias pós-antese.

Verificou-se que os genes estudados em botão floral estão presentes em todos os tecidos, porém expressos em níveis diferenciados, especialmente nas brácteas que, embora seja identificadas a partir do desenvolvimento dos primórdios florais, trata-se de uma folha modificada e, portanto, tem regulação bioquímica diferente dos demais tecidos envolvidos propriamente com a estrutura floral (Penin et al., 2007). Apesar disso, conforme foi investigado por Pinheiro et al. (2013), a maioria dos genes em estudo tem maior nível de expressão nos gametófitos, em especial no masculino. Os genes *GhASH*, *GhOVU* e *GhGLUC* cujas funções estão descritas nos bancos de dados de *A. thaliana* (TAIR), atuam no desenvolvimento de todos os órgãos florais ou de forma mais específica, envolvidos na formação do grão de pólen, tubo polínico e anteras.

Em relação às fibras, devido à importância econômica desse produto na indústria têxtil, os estudos ontogenéticos têm sido largamente investigados (Huang et al., 2013; Shan et al., 2014; Fang et al., 2014; Liu et al., 2015). As fases estudadas neste trabalho consideraram o

início de diferenciação dos tricomas até a fase de alongação que precede a formação da parede secundária das fibras. De acordo com Lee et al. (2007), vários genes desse tecido são ativamente expressos durante toda ontogenia, enquanto que outros são diferencialmente expressos em fases distintas, tais como iniciação (-3 a 3 DPA), alongação (5 a 25 DPA), formação da parede celular secundária (20 a 45 DPA) e maturação (45 a 50 DPA). Estas fases envolvem os processos biomecânicos de rápida divisão celular, diferenciação e expansão, indicando que um grande número de genes participa do processo regulatório do desenvolvimento da fibra (Ji et al., 2003).

Baseado nos resultados deste trabalho, verificou-se a larga expressividade dos genes *GhUDP* em antera. Na literatura, as *UDP-glicosiltransferases (UGT) (Difosfato Glicosiltransferase de Uridina)* codificam para enzimas envolvidas no crescimento e desenvolvimento de células, além de participar da biossíntese e remodelagem de polímeros de carboidratos da parede celular durante diferentes estágios de desenvolvimento das plantas (Aspeborg et al. 2005; Barvkar et al. 2012). Estudos em *Pisum sativum* indicaram que uma *UDP-glicosiltransferase (PsUGT1)* é essencial para o desenvolvimento da planta sugerindo que esta enzima participa na regulação do ciclo de divisão celular (Wooa et al., 2007). Outros estudos evidenciam o papel que as *glycosyltransferases* desempenham no desenvolvimento da flor, como o gene *UGT87A2* investigado em *A. thaliana* (Wang et al., 2012). Estas enzimas ainda estão envolvidas na biossíntese de flavonoides que constituem a maior classe de fenólicos vegetais (Sakakibara et al., 2012). Os flavonoides, incluindo antocianinas, flavonóis e flavonas são alguns dos metabólitos secundários mais estudados nos vegetais (Xiao et al., 2007; Feng et al., 2013) e participam de diversas atividades biológicas, como pigmentação de flores, fibras, frutos e sementes (Koes et al., 2005). Em *A. thaliana* foram identificados dois genes da classe *glycosyltransferases*, *UGT79B1* e *UGT84A2*, envolvidos na biossíntese da antocianina (Sakakibara et al., 2012). Em *Oryza sativa* foi examinado o papel da *Glycosyltransferase1(OsGT1)* na parede de pólen e foi detectado que esta é essencial para formação da parede celular dos grãos de pólen (Moon et al., 2013). Os eventos relatados conduzem a um entendimento do padrão de expressão do gene *GhUDP* em nossos estudos, sendo observada sua atividade em todos os tecidos avaliados (Figura 1 e 2d).

Em algodão, os estudos envolvendo as *glicosiltransferases* estão diretamente relacionados às fibras. Ji et al. (2013), a partir de estudos de proteômica revelaram várias proteínas diferencialmente expressas (DEPs) das quais algumas, como a *UDP-L-rhamnose synthase*, atuam na regulação funcional de numerosas vias metabólicas, incluindo a fosforilação, podendo assim desempenhar papéis importantes no alongamento de fibras de

algodão. As *endotransglycosylases/hydrolases (XTH)*, outra classe da *glicosiltransferases*, são codificados por relativamente grandes famílias de genes que são regulados em padrões espaciais e temporais específicos (Lee et al., 2010). Em algodão foi investigado o gene *GhXTH1* e sua atividade foi expressa em fibras durante toda a fase de alongação, resultado similar foi observado em nossos estudos onde o *GhUDP* foi expresso em todas as fases de alongação das fibras (8, 10 e 18 DPA), contudo o nível de expressão foi inferior aos demais tecidos (Figura 1 e 2d).

O perfil transcriptômico do gene *GhGLUC* corrobora com a descrição na literatura, visto que está associado as *glucanases* e estas se caracterizam por participarem de diversos processos biológicos como caracterização da parede celular (Bisaria e Mishra 1989; Beguin 1990; Beguin e Aubert 1994), divisão celular (Fulcher et al. 1996) germinação de pólen e crescimento do tubo polínico (Loetan et al. 1989; Meikle et al. 1991) e microsporogênese (Worrall et al. 1992). Takeda et al. (2004) investigando a expressão de duas exo-beta-glucanases *LP-ExoI* e *LP-ExoII* por RT-PCR mostrou que as transcrições foram abundantes em grãos de pólen e que podem estar envolvidos na regulação do alongamento do tubo polínico. Nossos resultados mostraram maior expressão em pétalas e anteras (Figura 1 e 2f). Estudos em *Petunia* revelaram que o gene *PhEXPA1*, homólogo a  $\beta$ -1,3-glucanase, foi preferencialmente expresso em pétalas (Santo et al., 2011), corroborando com os resultados de RT-qPCR (Figura 2f). Em algodão genes referidos as *glucanases* têm sido reportados e elucidam sua atuação em fibras, como por exemplo, as  $\beta$ -glucanases ( $\beta$ -1,3-glucanase;  $\beta$ -1,4-glucanase) necessárias para a síntese de celulose, atuando no desenvolvimento de fibras na fase de alongação (Wang et al., 2009; Yang et al., 2013).

As proteínas MYB constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição (FT) presentes em plantas nas quais desempenham a regulação de importantes processos, incluindo o desenvolvimento de anteras e grãos de pólen em *A. thaliana* (Millar et al., 2005) (Figura 1 e 2a). Yang et al. (2013) a partir de uma biblioteca subtrativa de flores de algodão isolaram e caracterizaram o gene *GhMYB24*, a análise por *Northern blot* revelou que os transcritos foram detectados predominantemente em anteras e pólen. Os genes *MYB* ainda participam da regulação do metabolismo dos fenilpropanóides, os quais fornecem defesa contra herbívoros, patógenos e proteção contra a luz ultravioleta, atuando ainda nas interações planta-polinizadores por pigmentação e compostos de aroma floral (Kranz et al., 1998; Stracke et al., 2001), função esta que pode estar correlacionada com a expressão do *GhMYB* em pétalas e sua ausência em brácteas e sépalas (Figura 1 e 2a). Em fibras, foi observada expressão em todas as fases fenológicas, sobretudo em fibras com 18 DPA (Figura 1 e 2a). O MYB é um importante

regulador no desenvolvimento dos tricomas e atua no início do desenvolvimento das fibras em algodão (Suo et al. 2003; Hsu et al. 2005; Pu et al. 2008). Estudo recente realizado com o gene *GhCPC*, o qual faz parte da classe do fator de transcrição *R3-MYB*, sugere a atuação no desenvolvimento inicial e na alongação das fibras de algodão (Liu et al., 2015).

Para o gene *GhFIB010* o nível de expressão foi maior para óvulos e anteras (Figura 1 e 2b), correspondendo com a função descrita na literatura para genes homólogos da classe *Kinases (MAPK)*. Em *A. thaliana*, estes genes estão envolvidos no desenvolvimento de alguns órgãos reprodutivos (Stanko et al., 2014). Horda et al. (2008) sugerem que os genes *MPK3* e *MPK6* participam do desenvolvimento de anteras bem como na diferenciação celular em *A. thaliana*. Outro estudo revelou a atividade dos genes *AtMPK3* e *AtMPK6* no desenvolvimento do embrião, anteras, bem como na inflorescência (Bush et al., 2007). Em fibras, este gene está diretamente envolvido na fase de alongação (10 DPA) (Figura 1 e 2b). Alguns estudos já foram reportados sobre a função das *MAP Kinases* na iniciação e diferenciação de fibras em algodão (Gao et al., 2012). Ji et al. (2003) estudando o transcriptoma do desenvolvimento de fibra de algodão mutante, verificaram que a expressão da *MAPK* foi mais evidenciada em fibras de 10 DPA e sugeriram que a *MAPK* juntamente com serina/treonina fosfatases (PPs) constituem uma cascata de sinalização que regula muitos eventos bioquímicos, e podem ser responsáveis pela iniciação e alongação da fibra.

O gene *GhOVU* nos bancos de dados de *A. thaliana* está relacionado com genes da superfamília homeobox (HB) envolvidos diretamente com o desenvolvimento de óvulos (Nain et al. 2008) e ainda codificam fatores de transcrição cruciais para o crescimento da planta, desenvolvimento de órgãos, em especial na flor (Haecker et al., 2004; Costanzo et al., 2014). Funções estas que podem estar relacionadas com o padrão de expressão do gene *GhOVU* nas análises por RT-PCR e RT-qPCR (Figura 1 e 2c), revelando expressão em todos os tecidos avaliados. Análises com outros genes da classe *knotted-like homeobox (KNOX)* em *G. hirsutum* caracterizou o gene *GhKNL1* na regulação do desenvolvimento de fibras de algodão, na fase de deposição da parede celular secundária (Gong et al., 2014). Shant et al. (2014) relataram que *GhHOX3* (fator de transcrição *homeobox-leucine zipper*) controla a alongação da fibra de algodão. Esses relatos sugerem um envolvimento do gene *GhOVU* em todas as fases avaliadas de desenvolvimento das fibras (Figura 1 e 2c), no entanto no resultado de RT-qPCR a expressão foi mais elevada na fase 18 DPA (Figura 2c).

Estudos em *A. thaliana* sugerem que a classe de proteínas *ASH* são essenciais para determinação da identidade dos órgãos florais, desenvolvimento das anteras, estames e grãos de pólen (Thorstensen et al., 2008; Grini et al., 2009; Xu et al., 2010), validando assim a expressão

do *GhASH* nesse estudo, onde em antera o nível de expressão foi mais acentuado quando comparado com os demais verticilos florais protetores (Figura 2e). O *GhASH*, no banco de dados de *A. thaliana* (TAIR), apresenta homologia com a proteína heterocromatina 1 (HP1). Estudos realizados por Kotake et al. (2003) com *TFL2* (TERMINAL FLOWER 2) indicaram que este gene pode funcionar como o HP1 em *A. thaliana* atuando na regulação positiva dos genes homeóticos florais como *APETALA3*, *PISTILLATA*, *AGAMOUS* e *SEPALLATA3*, todos estes envolvidos com os eventos do desenvolvimento dos quatro verticilos florais: sépalas, pétala, estames e carpelo (Yanofsky et al., 1990; Honma et al., 2000; Vaniyambadi et al., 2006), o que corrobora com os padrões de expressões obtidos neste estudo (Figuras 1 e 2e). O gene *GhASH*, quando analisado no *CottonDB*, apresentou relação com óvulos e com o período de alongação das fibras. A função do *GhASH* nas fibras não está bem esclarecida na literatura, tornando necessário estudos futuros para validação da atividade gênica em todos os eventos do desenvolvimento da fibra.

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações relevantes sobre a expressão dos diferentes genes investigados nos tecidos florais, a partir dos quais se sugere a participação em diversos processos de formação e /ou desenvolvimento dos órgãos floríferos sobretudo em grãos de pólen, anteras e fibras. Como fortes candidatos para a obtenção de promotores tecido-específico e assim contribuir com o programa de melhoramento genético do algodão visando principalmente resistência a pragas, qualidade e coloração das fibras, destacaram-se os genes *GhOVU* (óvulos), *GhUDP* (anteras), *GhGLUC* (fibras) e *GhFIB010* (fibras) visto que a expressão foi mais diferenciada nos respectivos tecidos, quando comparado aos demais genes.

## AGRADECIMENTOS

Monsanto e Embrapa Algodão pelo suporte financeiro e a CAPES pela bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

Ártico S, Ribeiro-Alves M, Oliveira-Neto OB, Macedo L L P, Silveira S, Grossi-de-Sa M F, Martinelli A P, Alves-Ferreira M (2014) Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larve. *BMC Genomics* **15**, 1-24.

Aspeborg H, Schrader, Coutinho PM, Stam M, Kallas A, Djerbi S, Nilsson P, Denman S, Amini B, Sterky F, Master E, Sandberg G, Mellerowicz E, Sundberg B, Henrissat B, Teeri TT (2005) Carbohydrate-active enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid Aspen. *Plant Physiology* **137**, 983-997.

Barvkar VT, Pardeshi VC, Kale SM, Kadoo NY, Gupt VS (2012) Phylogenomic analysis of UDP glycosyltransferase 1 multigene family in *Linum usitatissimum* identified genes with varied expression patterns. *BMC Genomics* **13**, 1-13.

Beguín P (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *The Annual Review of Microbiology* **44**, 219-248.

Beguín P and Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology* **13**, 25-58.

Bhattacharjee A, Ghangal R, Garg R, Jain M (2015) Genome-Wide Analysis of Homeobox Gene Family in Legumes: Identification, Gene Duplication and Expression Profiling. *Plos One* **10**, 1-22.

Bisaria VS, Mishra S (1989) Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Critical Reviews in Biotechnology* **9**, 61-103.

Bush, SM, Krysan PJ (2007). Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2181–2191.

Costanzo E, Trehin C, Vandebussche M (2014) The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany* **114**, 1545–1553.

Fang L, Tian R, Li X, Chen J, Wang S, Wang P, Zhang T (2014) Cotton fiber elongation network revealed by expression profiling of longer fiber lines introgressed with different *Gossypium barbadense* chromosome segments. *BMC Genomics* **15**, 838.

Feng H, Tian X, Liu Y, Li Y, Zhang X, Jones BJ, Sun Y, Sun J (2013) Analysis of Flavonoids and the Flavonoid Structural Genes in Brown Fiber of Upland Cotton. *Plos One* **8**, 58820.

Fulcher RG, McCully ME, Setterfield G, Sutherland J (1996)  $\beta$ -1,3-Glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. *Canadian Journal of Botany* **54**, 459-542.

Gao W, Saha S, Ma DP, Guo Y, Jenkins JN, Stelly DM (2012) A Cotton-Fiber-Associated Cyclin-Dependent Kinase A Gene: Characterization and Chromosomal Location. *International Journal of Plant Genomics* **2012**, 1-10.

- Gong SY, Huang GQ, Sun X, Qin LX, Li Y, Zhou L, Li XB (2014) Cotton *KNL1*, encoding a class II KNOX transcription factor, is involved in regulation of fibre development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4133-47.
- Grini PE, Thorstensen T, Alm V (2009) The *ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2) Histone H3 methyltransferase* is required for ovule and anther development in Arabidopsis. *Plos One* **4**, 1-15.
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 657-68.
- Horda CL, Sun YJ, Pillitteri LJ, Torii KU, Wang H, Zhang S, Ma H (2008) Regulation of Arabidopsis early anther development by the mitogen-activated protein kinases, *MPK3* and *MPK6*, and the *ERECTA* and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* **1**, 645-658.
- Hsu C, Jenkins JN, Sahab S, Maa DP et al (2005) Transcriptional regulation of the lipid transfer protein gene *LTP3* in cotton fibers by a novel *MYB* protein. *Plant Science* **168**, 167-181.
- Huang GQ, Gong SY, Xu WL, Peng W L L, Zhang CJ, Li DD, Zheng Y, Li FG, Li XB (2013) A fasciclin-like arabinogalactan protein, *GhFLA1*, is involved in fiber initiation and elongation of cotton. *Plant Physiology* **161**, 1278-1290.
- James C (2014) EXECUTIVE SUMMARY, brief 49. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014 <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp/>. Accessed 03 April 2015.
- Ji SJ, Lu YC, Feng JX, Wei G, Li J, Shi YH, Fu Q, Liu D, Luo JC, Zhu Y (2003) Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. *Nucleic Acids Research* **10**, 2534-2543.
- Jiang Y1, Guo W, Zhu H, Ruan YL, Zhang T (2012) Overexpression of *GhSusA1* increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality. *Plant Biotech Journal* **10**, 301-312.
- Jin SH, Ma XM, Han P, Wang B, Sun YG, Zhang GZ, Li YJ, Hou BK (2013) UGT74D1 Is a Novel Auxin Glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* **8**, 1-11.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Science* **10**, 236-42.
- Kotake T, Takada S, Nakahigashi K, Ohto M, Goto K (2003) *Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2* Gene Encodes a Heterochromatin Protein 1 Homolog and Represses both *FLOWERING LOCUS T* to Regulate Flowering Time and Several Floral Homeotic Genes. *Plant Cell Physiology* **44**, 555-564.

- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B (1998) Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 263-276.
- Lee J, Burns TH, Light G, Sun Y, Fokar M, Kasukabe Y, Fujisawa K, Maekawa Y, Allen R D (2010) Xyloglucan *endotransglycosylase/hydrolase* genes in cotton and their role in fiber elongation. *Planta* **232**, 1191-1205.
- Lee JJ, Woodward AW, Chen ZJ (2007) Gene expression changes and early events in cotton fibre development. *Annals of Botany* **100**, 1391–1401.
- Liu B, Zhu Y, Zhang T (2015) The *R3-MYB* Gene *GhCPC* Negatively Regulates Cotton Fiber Elongation. *PLos One* **3**, 1-17.
- Loetan T, Ori N, Fluhr R (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* **1**, 881-887.
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE, Stone BA (1991) The location of (1-3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1-3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* **185**,1-8.
- Millar AA, Gubler F (2005) The *Arabidopsis* *GAMYB-Like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *The Plant Cell* **17**, 705–721.
- Moon S, Kim SR, Zhao G, Yi J, Yoo Y, Jin P, Lee SW, Jung K, Zhang D, An G (2013) Rice *GLYCOSYLTRANSFERASE1* Encodes a Glycosyltransferase Essential for Pollen Wall Formation. *Plant Physiology* **161**, 663–675.
- Mukherjee K, Brocchieri L, Bürglin TR (2009) A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 2775–2794.
- Nain V, Verma A, Kumar N, Sharma P, Ramesh B, Kumar PA (2008) Cloning of an ovule specific promoter from *Arabidopsis thaliana* and expression of  $\beta$ -glucosidase. *Indian Journal of Experimental Biology* **46**, 207-211.
- Penin A A, Budaev RA, Ezhova TA (2007) Interaction of the *BRACTEA* gene with the *TERMINAL FLOWER1*, *LEAFY*, and *APETALA1* genes during inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Genetics* **43**, 287-293.



Pinheiro MPN, Batista VGL, Martins NF, Santos R C, Melo Filho PA, Silva CRC, Lima LM (2013) Genes expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) buds isolated by wit subtractive library. *Genetics and Molecular Research* **12**, 1-10.

Pu L, Li Q, Fan X, Yang W, Xue Y (2008) The R2R3 MYB transcription factor GhMYB109 is required for cotton fiber development. *Genetics* **180**, 811-820.

Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-25.

Sakakibara KY, Fukushima A, Nakabayashi R, Hanada K, Matsuda F, Sugawara S, Inoue E, Kuromori T, Ito T, Shinozaki K, Wangwattana B, Yamazaki M, Saito K (2012) Two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification delineated by transcriptome independent component analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **69**, 154-67.

Santo SD, Fasoli M, Cavallini E, Tornielli GB, Pezzotti M, Zenoni S (2011) *PhEXPA1*, a *Petunia hybrida* expansin, is involved in cell wall metabolism and in plant architecture specification. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 2031-2034.

Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor PJ, Hansen R, Tetens F, Lönnig WE, Saedler H, Sommer H (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic *MADS-box* gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO Journal* **11**, 251-263.

Shan CM, Shanguan XX, Zhao B, Zhang XF, Chao L, Yang CQ, Wang LJ, Zhu HY, Zeng YD, Guo WZ, Zhou BL, Hu GJ, Guan XY, Chen Z J, Wendel JF, Zhang TZ, Chen XY (2014) Control of cotton fibre elongation by a homeodomain transcription factor GhHOX3. *Nature Communications* **5**, 19-55.

Shi H, Zhu L, Zhou Y, Li G, Chen L, Li X (2009) A cotton gene encoding a polygalacturonase inhibitor-like protein is specifically expressed in petals. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **41**, 316-24.

Stanko V, Giuliani C, Retzer K (2014) Timing is everything: highly specific and transient expression of a MAP kinase determines auxin-induced leaf venation patterns in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **1**, 1637-52.

Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2011) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 447-456.

Suo J, Liang X, Pu L, Zhang Y, Xue Y (2003) Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* **1630**, 25-34.

- Takeda H, Yoshikawa T, Liu XZ, Nakagawa N, Li YQ, Sakurai N (2004) Molecular Cloning of Two Exo- $\beta$ -glucanases and their in vivo substrates in the cell walls of lily pollen tubes. *Plant Cell Physiology* **45**, 436–444.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) *MEGA6*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Münster T, Winter KU, Saedler H (2000) A short history of *MADS*-genes in plants. *Plant Molecular Biology* **42**, 115–149.
- Theissen G (2001) Development of floral organ identity: stories from the *MADS* house. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 75–85.
- Thorstensen T, Grini PE, Mercy IS, Alm V, Erdal S, Aasland R, Aalen RB (2008) The *Arabidopsis* SET-domain protein ASHR3 is involved in stamen development and interacts with the bHLH transcription factor *ABORTED MICROSPORES* (*AMS*). *Plant Molecular Biology*, **66**, 47–59.
- Vaniyambadi V, Sridhar AS, Zhongchi L (2006) *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact with *SEUSS* to mediate transcription repression during flower development. *Development*, **133**, 3159–3166.
- Wang B, Jin SH, Hu HQ, Sun YG, Wang YW, Han P, Hou BK (2012) *UGT87A2*, an *Arabidopsis* glycosyltransferase, regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *New Phytologist*, **194**, 666–675.
- Wang Y, Feng Y, Xu N, Chen B, Ma R, Zhou Z (2009) Response of the enzymes to nitrogen applications in cotton fiber (*Gossypium hirsutum* L.) and their relationships with fiber strength. *Science China Life Sciences*, **52**, 1065–1072.
- Wooa HH, Jeongb BR, Koob KB, Choib JW, Hirschc AM, Hawes MC (2007) Modifying expression of closely related UDP-glycosyltransferases from pea and *Arabidopsis* results in altered root development and function. *Physiologia Plantarum*, **130**, 250–260.
- Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell*, **4**, 759–771.
- Xiao YH, Zhang ZS, Yin MH, Luo M, Li XB, Hou L, Pei Y (2007) Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358**, 73–78.
- Xing S, Rosso MG, Zachgo S (2005) *ROXY1*, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **132**, 1555–1565.

Xu J, Yang C, Yuan Z (2010) The *ABORTED MICROSPORES* regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**, 91–107.

Yang Z, Peng Z, Wei S, Yu Y (2013) Cloning and characterization of endo 1,4-gluconase genes in the common wheat line three pistils. *Genetics and Molecular Biology*, **36**, 400-407.

Yanofsky MF, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz, EM (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature*, **346**, 35-39.

## **ANEXOS**

### **PLANT MOLECULAR BIOLOGY**

#### **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

##### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### **Online Submission**

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

##### **Title Page**

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address (es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

##### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

##### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

#### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.

Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

#### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

#### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## Scientific Style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC

Genus and species names should be in italics.

## References

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article: Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI: Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi: 10.1007/s001090000086

Book: South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter: Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document: Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation: Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

## TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.



Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ADDITIONAL REQUESTS

#### Author Contributions Statement

Authors are expected to provide a short description of the contributions made by each listed author.

#### Conflict of Interest Disclosure

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization or research funder that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

## **FUNCTIONAL PLANT BIOLOGY**

### **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

#### **Journal policy**

FPB publishes original research papers, critical review articles, and perspectives; it does not publish technical and research notes, or short communications. Review articles should indicate fruitful areas of further research. Perspectives provide a means for authors to explore contemporary issues with more freedom than in the conventional review paper. If you are interested in preparing a Review article or Perspective, please discuss the subject matter with the Editor-in-Chief or the appropriate Associate Editor.

All papers are peer-reviewed. Submission of a paper is taken to mean that the results reported have not been published and are not being considered for publication elsewhere. The journal assumes that all authors of a multi-authored paper agree to its submission. The journal will use its best endeavours to ensure that work published is that of the named authors except where acknowledged. The journal takes no responsibility for fraud or inaccuracy on the part of its contributors.

There are no page charges, or charges for colour illustrations published on-line and in the PDF. If colour is required in the printed copy, a charge is made to cover the extra costs of printing.

#### **Editorial procedures for Comments**

Comments on recently published papers will be published in a special section of the Journal as soon as practicable after receiving the comments. Comments must be concise, impersonal and contribute to knowledge in order to be acceptable. Each comment should have a short abstract which may contain a few dot points. The total length of the Comment should not exceed 3000 words. In this way we can encourage informed debate on topics raised in articles published in FPB. The procedures for handling them will be as follows:

On receipt of a Comment, the Editor-in-Chief or Associate Editor will arrange for two referees, who will be provided with a PDF file of the published paper on which the Comment is based. All reviewers' reports and correspondence will be confidential.

The Editor will consider the referees' assessments and decide whether the Comment should be accepted, modified or rejected.

If the Comment is negative, or is critical of the methods used or interpretation of data published, it will also be sent to the corresponding author of the original paper inviting a short reply. This should be less than one published page (about 300-500 words). If the corresponding author of the original paper declines to reply, one or more of the senior authors will be approached. If there is still no reply then the Comment will be published on its own. Authors will have about 4 weeks in which to respond.

If the authors provide a reply, then the Editor will arrange for it to be reviewed by at least one referee. Again, the Editor will decide whether the reply should be accepted, modified or rejected.

If the reply is accepted, then both the Comment and the Reply will be published in the next available issue of the Journal under a special section labeled 'Comment and Reply'.

Both the original Comment and the Reply should be supported by appropriate references and both will contribute to our Impact Factor.

### **General presentation guidelines**

Manuscripts should be concise and use simple language. Research articles should be about 6000-8000 words, with 6-8 display items (Figures or Tables) and a modest citation list (~25 references). Review papers may be longer (~8000-10,000 words with ~50 references) but will have fewer display items. Associate Editors can provide advice about reducing excessive length while the manuscript is being revised. Extra material may be submitted as supplementary files, which will appear automatically to readers of the article online via a link on the page. These may take the form of large tables, figures, confocal stacks, and videos.

Summary Text for the Table of Contents. This is a three-sentence paragraph of 50 to 80 words written for interested non-experts, such as journalists, teachers, government workers, etc. The text should be free from scientific jargon, and written at the level of an article in a science magazine. Your first sentence should engage the reader, convincing them that this is an important area. The second sentence should introduce the problem addressed in the paper, and state your main discovery. The final sentence should describe how the results fit into the bigger picture (i.e. implications or impact of the discovery).

The Abstract should be fewer than 200 words. The Introduction should present the reason for the work and its essential background. The Methods should contain sufficient experimental detail to enable the work to be repeated. The Results section should be separate from the Discussion. The Results section should present and elaborate on the results. Quantitative information should be given as data not as photographs only. The Discussion should set the results in the context of the international literature, and explain the significance of the results.

Place tables and figures after the text and references, and number all pages of the manuscript consecutively. Start each table and figure on a new page. It is helpful to reviewers to place each figure caption on the same page as the figure.

Please refer to the sample issue, to note details of layout.

## **References**

At the end of the paper, list references in alphabetical order. Do not add the DOI; this is added by the Production Editor after acceptance. Do not include papers that have not been accepted for publication; cite them either as 'unpublished data' or 'pers. comm.' if they must be included at all. Authors must provide written proof of acceptance for any papers cited as 'in press'.

In the Reference list, use italic type for the journal name and use bold type for the journal volume number. Give full journal and book titles, and provide first and last page numbers for all entries.

In the text, use 'and' to link the names of two co-authors in the text, and use 'et al.' where there are more than two. Do not use a comma between the author's name and the date. Italicise a, b, c etc. where several references are the same year. Where giving two or more references together, list them in chronological order separated by semi-colons.

## **Tables**

Please use Table Formatting (i.e. use table cells); do not use tabs, spaces or hard returns when setting up columns. Place each table on a new page, using a Page Break command.

Avoid footnotes where possible; use them only to refer to specific data points in the body of the table. Use A and B etc. for footnotes; use \*, \*\*, \*\*\* only to define probability levels.

Insert horizontal rules above and below the column headings and across the bottom of the table; do not use vertical rules. The first letter only of headings of rows and columns should be capitalised. Include the symbols for the units of measurement in parentheses below the column heading. Use standard SI prefixes with units in the column headings.

Avoid an excessive number of digits in the body of the table. The number of numerals should be appropriate to the statistical significance of the data. For example a value of  $23.72 \pm 5.24$  (mean  $\pm$  standard error) contains meaningless numerals. The value should be presented as  $24 \pm 5$ .

DNA sequences and primers should be specified in the following manner, using the ' (prime) sign in preference to a ^ (single quotation mark):

5'-GGGATGACGCACAATCCC-3'.

## Figures

Prepare figures with symbols and letters appropriate for the size reduction intended. Prepare the shape of the figure appropriately for a single column or two-column spread. Make simple figures square or portrait, so they will not be so much reduced when fitting to a single column.

Labelling must be in Helvetica or Arial type 1 font. Refer to sample issue of **FPB**. Thickness of all lines in line diagrams must be no less than 1 point. Use clearly distinct levels of greyscale shading (**not cross-hatching**) in bar graphs.

Legends to figure axes should state the quantity being measured and be followed by the appropriate SI units in parentheses. The **following symbols** are readily available and *should be used*:  $\circ$   $\bullet$   $\square$   $\blacksquare$   $\triangle$   $\blacktriangle$   $\nabla$   $\blacktriangledown$   $\diamond$   $\blacklozenge$ . The symbols + or x should be avoided.

## Units

Use the SI system where appropriate, especially for exact measurement of physical quantities. However, non-SI units such as day and year are acceptable. Use L for litre (hence mL,  $\mu$ L, etc.); abbreviate hour(s) as h, minute(s) as min, second(s) as s, e.g. 4 h, 5 min, 3 s.

Use the negative index system, e.g.  $\text{g m}^{-2}$ ,  $\text{kg ha}^{-1}$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Spell out numbers lower than 10 unless accompanied by a unit, e.g. 2 mm, 15 mm, two plants, 15 plants, but 2 out of 15 plants. **Do not** leave a space between a numeral and %, ‰ or °C.

When using non-standard abbreviations, define the abbreviation where it first occurs in the text.

## Preparation of manuscript for submission

Format your manuscript with 1.5-line spacing throughout, using Times New Roman 12 font. **Word for Windows is preferred**, but most packages (e.g. other versions of Word or WordPerfect) are acceptable. If you have none of these, please submit an RTF (Rich Text Format) file.

Pages **must be numbered**; line numbering will also assist reviewers.

Present the work concisely and clearly in English. If English is not your native language, we recommend that you ask a native English speaker to read over your manuscript before submitting, or employ a professional science editor.

Make the **title** informative. If you include a botanical name in the title, omit the authority, but include it in the Abstract and at first mention in the text. Please also supply an abridged title, for use as a running head that does not exceed 50 characters (including spaces) in length.

List full first name, initial and surnames for all **authors**, and a current institutional mailing address for each. The corresponding author should be indicated, and their email address given.

The **abstract** should be fewer than 200 words. Any references should be listed in full (authors, journal, volume and page numbers). Scientific names of plants should be accompanied by their authority.

Please suggest 3-6 **keywords**, noting that all words in the title and abstract are already considered to be keywords. Keyword should list alternative spellings, e.g. defense for defence, aluminum for aluminium etc.

Include all tables and embedded figures at the end of the main document, and submit the whole as a **single MSWord, RTF or PDF file**. Word and RTF files will be converted to PDF before sending for review. Authors are encouraged to make a PDF file so that any translation problems with symbols or layout can be corrected before submission.

Only upon acceptance of the manuscript will you be asked to provide the original figure files and high resolution photograph.

## **Submission procedure**

To submit your paper, please use our online journal management system ScholarOne Manuscripts, which can be reached directly through this link or from the link on the journal's homepage. If a first-time user, register via the 'Register here' link, or use your existing

username and password to log in. Then click on the 'Author Centre' link and proceed. For papers arising from the work of Honours students, the corresponding author should be the supervisor of the student. This may also be appropriate for papers from PhD students.

During the submission process, you are required to include the names of three reviewers (with email addresses) who are expert in the area of your research and who could be asked to review your manuscript.

Authors of papers arising from theses or reports that are publicly available in an electronic format should clearly state this at the time of submission, and should supply the Editor with the relevant URL.

Authors are asked to declare any competing interests at the time of submission. A competing interest exists when professional judgement concerning a primary interest, such as the validity of research, may be influenced by a secondary interest, such as sponsorship or financial gain. Papers will not be rejected simply on the basis of competing interests, but the Journal may make a declaration that the author(s) has competing interests.

Authors should acknowledge in the manuscript all financial support for the work and other financial or personal connections to the work. Articles will be published with statements declaring:

- Authors' conflicts of interest; and
- Sources of support for the work, including sponsor names along with explanations of the role of those sources if any in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the report; the decision to submit the report for publication; or a statement declaring that the supporting source had no such involvement.

If the manuscripts are intended for a Special Issue you should select the appropriate Special Issue category during submission.