

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM SOJA: UM ESTUDO SOBRE O POSSÍVEL
ENVOLVIMENTO DE AQUAPORINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Mayara Jorgens Prado

Porto Alegre

2013

**TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM SOJA: UM ESTUDO SOBRE O POSSÍVEL
ENVOLVIMENTO DE AQUAPORINAS**

Mayara Jorgens Prado

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientadora: Fernanda Stanisçuaski

Coorientadora: Angela Menegassi

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Fernanda Stanisçuaski pela dedicação, confiança, amparo e pelos valiosos ensinamentos científicos que me foram passados durante o decorrer de toda a minha iniciação científica.

Agradeço a Professora Célila Carlini pela oportunidade dada, pela confiança e auxílio confiados na realização deste trabalho.

Agradeço a doutoranda Angela Menegassi pela disposição e pelo grande auxílio durante a realização do projeto.

Agradeço ao Professor Giancarlo Pasquali e ao Doutor Rafael Arenhart por aceitaram compor a banca deste trabalho para o acrescentar com seus conhecimentos científicos.

Agradeço a “família” Laprotox por todo apoio, alegria e descontração durante todos os dias no laboratórios.

Agradeço as empresas Semente Quati, Laçador Sementes e a Sra. Liege Costa da Fepagro Sementes pela doação das sementes utilizadas neste projeto.

Agradeço as minhas colegas e grandes amigas Amanda, Cristine, Luiza e Thiane pela amizade, apoio, conselhos, risadas e paciência durante os quatro anos de faculdade. Vocês são demais!

Agradeço a minha família pelo amor, dedicação e pelos sábios conselhos que fizeram de mim o que sou hoje. Tenho muito orgulho de fazer parte desta família. Amo vocês!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TETRÂMERO DE AQPS.....	16
FIGURA 2: ESTRUTURA PRIMÁRIA DE UMA AQP.....	17
FIGURA 3: GERMINAÇÃO EM PAPEL FILTRO.....	22
FIGURA 4: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AQPS DA SUBFAMÍLIA TIP QUANDO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM 3 μ M DE ALUMÍNIO POR 6 H E 24 H.	29
FIGURA 5: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AQPS DA SUBFAMÍLIA PIP QUANDO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM 3 μ M DE ALUMÍNIO POR 6 H E 24 H.	30
FIGURA 6: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AQPS DA SUBFAMÍLIA SIP QUANDO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM 3 μ M DE ALUMÍNIO POR 6 H E 24 H.	30
FIGURA 7: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AQPS DA SUBFAMÍLIA NIP QUANDO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM 3 μ M DE ALUMÍNIO POR 6 H E 24 H.	31
FIGURA 9: QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AQPS NA RAIZ DE DOIS CULTIVARES DE SOJA POR QPCR.	33
FIGURA 10: BLAST DO PROTEOMA DE SOJA COM AS PROTEÍNAS PALT1 E VALT DE HORTÊNSIA.....	34
FIGURA 11: MODELAGEM MOLECULAR DA AQP TIP1;9 E ANÁLISE DO PORO.....	35
FIGURA 14: ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS PARA A CLONAGEM DA AQP TIP1;9	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SEQUÊNCIA DOS PRIMERS PARA A CLONAGEM DA AQP TIP1;9.....	24
TABELA 2: PROTOCOLO DA REAÇÃO DA PCR PARA VERIFICAR A INSERÇÃO DO GENE DA AQP TIP1;9 NO VETOR PGEM-T EASY.	25
TABELA 6: LISTA DE PRIMERS PARA AQPS DA SUBFAMÍLIA TIP.	40
TABELA 7: LISTA DE PRIMERS PARA AQPS DA SUBFAMÍLIA PIP.	41
TABELA 8: LISTA DE PRIMERS PARA AQPS DA SUBFAMÍLIA NIP.	42
TABELA 9: LISTA DE PRIMER PARA AQP DA SUBFAMÍLIA SIP.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial hidrogeniônico
pb	Pares de bases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatados
cDNA	DNA complementar
rpm	Rotações por minuto
Taq	Enzima Taq DNA Polimerase
IPTG	Ácido isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídico
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
Δ (gene)	Linhagem com deleção do gene subsequente
(gene)_F	Primer <i>forward</i> para o referido gene
(gene)_R	Primer reverse para o referido gene
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
MIP	<i>Major intrinsic proteins</i>
AQP	Aquaporina
TIP	Proteínas intrínsecas do tonoplasto

PIP	Proteínas intrínsecas de membrana plasmática
SIP	Proteínas intrínsecas pequenas
NIP	Proteínas intrínsecas do tipo Nodulina 26
XIP	Proteínas intrínsecas X

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
SOLOS ÁCIDOS	12
<i>A presença de alumínio no solo</i>	<i>12</i>
<i>Mecanismo de defesa de planta</i>	<i>13</i>
SOJA (GLYCINE MAX)	14
<i>Estabelecimento da cultura de soja no Brasil</i>	<i>14</i>
<i>Estudos relacionados com o alumínio</i>	<i>14</i>
AQUAPORINAS	15
<i>Função e estrutura</i>	<i>15</i>
<i>AQPs de plantas</i>	<i>17</i>
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GENES DE AQPs	21
<i>Análise genômica e desenho de primers</i>	<i>21</i>
<i>Germinação e tratamento dos diferentes cultivares de soja</i>	<i>21</i>
<i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	<i>22</i>
<i>Deteção de transcritos de AQPs presentes na raiz dos cultivares</i>	<i>23</i>
<i>Quantificação de transcritos gênicos de AQPs</i>	<i>23</i>
ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DO GENE DA AQP TIP1;9	24
<i>Desenho de primers</i>	<i>24</i>
<i>Subclonagem em vetor de expressão em leveduras (pYES2)</i>	<i>25</i>
<i>Avaliação do transporte de diferentes moléculas</i>	<i>26</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
<i>Identificação das AQPs presentes nas raízes das diferentes cultivares</i>	<i>28</i>
<i>Quantificação dos transcritos dos genes de AQP por qPCR</i>	<i>32</i>
<i>Caracterização funcional e estrutural da AQP TIP1;9</i>	<i>35</i>
CONCLUSÃO	38

PRÓXIMOS PASSOS E PERSPECTIVAS	39
APÊNDICE	40
APÊNDICE B – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS PARA CLONAGEM	44
APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA O PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> (LINHAGEM DH5A).....	45
APÊNDICE D – MEIO E SOLUÇÕES UTILIZADOS	46
ANEXO	47
ANEXO A – MAPA DO VETOR pGEM-T EASY	47
ANEXO B – MAPA DO VETOR pYES2	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

A acidez do solo, relacionada principalmente aos níveis de alumínio, afeta o rendimento da produção agrícola, com o efeito principal sendo a redução do crescimento da raiz da planta. A tolerância ao alumínio varia entre diferentes espécies vegetais, podendo estas serem classificadas como tolerantes, intermediárias ou sensíveis. O mecanismo molecular envolvido nessa tolerância diferencial ao alumínio ainda não foi totalmente esclarecido. Dados obtidos em centeio indicaram a possibilidade de haver uma relação entre a expressão de aquaporinas (AQPs) nas raízes das plantas e a tolerância à toxidez do alumínio. AQPs são proteínas de membrana envolvidas no transporte de água e pequenos solutos através da membrana. Em plantas, as AQPs estão envolvidas, além do transporte de água, na absorção de nutrientes e na fixação de carbono e nitrogênio. AQPs são altamente expressas durante o processo de alongamento celular, provocando o rápido influxo de água no vacúolo, gerando a pressão de turgor que direciona o alongamento celular. Análises do genoma de soja (*Glycine max*) indicaram a presença de pelo menos 58 genes de AQPs diferentes. Este projeto tem como objetivo identificar a expressão dos genes de AQPs presentes na raiz de cultivares de soja com tolerância distinta ao alumínio, e estabelecer uma relação entre os níveis de expressão dos genes que codificam AQPs e a tolerância diferencial ao alumínio. Sementes de duas cultivares tolerantes (Conquista e Williams) e duas sensíveis (IAS-5 e ENGOPA 313) foram germinadas em papel filtro e, após 3-4 dias, as plântulas foram transferidas para tubos contendo solução nutritiva. Após 96 h na solução, as plântulas foram tratadas com 3 μ M de alumínio e mantidas por 6 ou 24 h. Após o tratamento com alumínio, as plantas foram coletadas e o RNA foi extraído da raiz, seguido pela síntese de cDNA. O mesmo procedimento foi realizado com as plantas não tratadas (controle). A técnica de RT-PCR foi usada para identificar os genes de AQPs presentes na raiz dos diferentes cultivares. Em um primeiro momento, foram desenhados primers para 40 genes de AQPs e usados no RT-PCR. Os genes de AQP que apresentaram perfil de expressão distinto comparado com o controle foram analisados por qPCR. Cinco AQPs mostraram diferença significativa após o tratamento com alumínio. A caracterização funcional destes genes foi iniciada e a análise do gene TIP1;9 mostrou se tratar de uma aquagliceroporina. Os resultados obtidos neste estudo podem servir como ponto inicial para o

desenvolvimento de abordagens para melhoramento de cultivares de plantas, especialmente de soja, uma planta com grande importância econômica mundial.

ABSTRACT

The acidity in the soil, mainly related to the levels of aluminum, affects the yield in agricultural production, with the main effect being the reduction of the plant root growth. Aluminum tolerance varies between different plant cultivars, which can be classified as tolerant, intermediate or sensitive. The molecular mechanisms involved in the differential tolerance to aluminum are not yet fully understood. Data obtained with rye indicate a possible relationship between the expression of aquaporins (AQPs) in plant roots and the tolerance to aluminum toxicity. AQPs are membrane proteins involved in the transport of water and small solutes across the membrane. In plants AQPs are involved, in addition to the transport water, in nutrient absorption, and fixation of carbon and nitrogen. AQPs are highly expressed during the cell elongation process, allowing the rapid influx of water into the vacuole, generating the turgor pressure that directs the cell elongation. Analysis of the soybean (*Glycine max*) genome indicates the presence of at least 58 different AQP genes. This project aims to identify AQPs that are present in the roots of soybean cultivars with distinct tolerance to aluminum, and establish a relationship between the expression levels of genes encoding AQPs and the difference in the tolerance to aluminum toxicity. Seeds from two tolerant soybean cultivars (Conquista and Williams) and two sensitive (IAS-5 and ENGOPA 313) were germinated on filter paper and, after 3-4 days, the seedlings were transferred to tubes containing a nutrient solution. After 96 h in the solution, plants were treated with Al 3 μ M and maintained for another 6 or 24 h. After the aluminum treatment, plants were collected and RNA was isolated from the roots, followed by cDNA synthesis. The same procedure was performed with plants that were maintained in the nutrient solution without aluminum (control). The RT-PCR technique was used to identify the AQPs present in the roots of the different cultivars. In this first approach, primers for 40 AQPs were designed and used for the RT-PCR. Aquaporin genes that showed a distinct expression profile compared to the controls were further analyzed by real time PCR. From those AQPs analyzed, five showed relevant differences after the aluminum treatment. The functional characterization of these genes is under way, and the analysis of TIP1;9 gene indicated this is an aquaglyceroporin. The results obtained in this study may serve as the initial point for the development of new approaches to improve plant cultivars, especially soybean, a plant with high economic importance worldwide.

INTRODUÇÃO

SOLOS ÁCIDOS

A presença de alumínio no solo

Os solos ácidos representam entre 30 e 40 % dos solos aráveis mundiais (Kochian, Hoekenga e Pineros, 2004), sendo mais difundidos na América do Sul, principalmente no Brasil, além de ocupar também grandes territórios na região oeste da África, no leste da América do Norte, no norte da Europa e no sudeste da Ásia. A aplicação de calcário, composto por magnesita ($MgCO_3$), calcita ($CaCO_3$) e dolomita [$CaMg(CO_3)_2$], é o principal método para a correção do pH do solo (Hede, Skovmand e López-Cesati, 2003). No entanto, essa correção possui uma efetividade limitada, uma vez que trata apenas os primeiros centímetros da camada superficial do solo, sendo assim, dependente do tipo de solo e das condições climáticas (Whitten, Wong e Rate, 2000). Um dos principais fatores da acidez do solo para as plantações é a presença de alumínio fitotóxico.

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre, compondo 7 % da mesma. Em solos com pH neutro ou alcalino, o alumínio se encontra nas suas formas insolúveis e inofensivas para plantas, $Al(OH)_3$ em solos com pH próximo do neutro e $Al(OH)_4^-$ com pH alcalino (Cai *et al.*, 2011; Delhaize & Ryan, 1995). Já em solos com pH ácido, principalmente abaixo de 5 (Poschenrieder *et al.* 2008; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2011), o alumínio está presente nas suas formas solúveis, $[Al(H_2O)_6]^{3+}$, $Al(OH)^{2+}$ e $Al(OH)_2^+$ (Panda, Baluska e Matsumoto, 2009), que prejudicam o desenvolvimento da planta, tornando-se um empecilho para a expansão do cultivo de plantas destinadas a alimentos, fibras e combustíveis.

A região mais afetada pela toxicidade do alumínio é a raiz da planta, que apresenta inibição de crescimento (Matsumoto, 2000; Poschenrieder *et al.*, 2008; Panda *et al.*, 2009). Isso ocorre, pois o alumínio inibe a mitose nas células do meristema apical da raiz (Clarkson, 1965; Morimura *et al.*, 1978). Como consequência, a raiz fica atrofiada e fragilizada, o número de raízes secundárias é menor e as raízes axiais ficam inchadas e danificadas (Clarkson, 1965). O alumínio também (I) altera a função da membrana plasmática pela interação com lipídios, induzindo a peroxidação lipídica; (II) medeia a interferência com lipídeos de membrana, aumentando os radicais livres tóxicos do oxigênio; (III) altera o potencial da membrana que está diretamente relacionado com o potencial da superfície da membrana (Panda, Baluska e

Matsumoto, 2009; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2012); (IV) provoca distúrbios enzimáticos e perturbações na síntese do DNA (Meriga *et al.*, 2004; Valadez-González *et al.*, 2007); (V) induz o acúmulo de calose no plasmodema de células da raiz, o que bloqueia o tráfego célula-célula; (VI) rompe a estrutura do citoesqueleto (Panda, Baluska e Matsumoto, 2009); (VII) diminui o armazenamento de clorofila e a taxa de fotossíntese (Rengel e Elliott, 1992).

Mecanismo de defesa de planta

Genótipos de plantas apresentam diferentes graus de tolerância à toxicidade do alumínio, podendo ser classificados como tolerantes, intermediários ou sensíveis (Menosso *et al.*, 2000). Os mecanismos de tolerância utilizados pelas plantas podem ser classificados como externos e internos. O mecanismo externo de tolerância ao alumínio envolve secreção de ânions de ácidos orgânicos, mediada por canais de ânions na membrana plasmática (Ma, Ryan e Delhaize, 2001). A secreção desses ânions ocorre nas pontas das raízes, que são altamente sensíveis à toxicidade do alumínio (Mossor-Pietraszewska, 2001), e sua quantidade é variável entre espécies, variedades e genótipos (Yang *et al.*, 2008). As maiores taxas de secreção de ânions de ácidos orgânicos ocorrem nos genótipos tolerantes e é pouca nos sensíveis (Delhaize e Ryan, 1995). Já o mecanismo interno de tolerância ao alumínio envolve a internalização do alumínio na parte aérea da planta. Plantas que empregam esse mecanismo são chamadas de hiperacumuladoras de alumínio e podem armazenar mais de um grama de alumínio por quilo (Jansen, Watanabe e Smets, 2002). Em *Fagopyrum esculentum*, o alumínio internalizado pela raiz é quelado, formando o complexo alumínio-oxalato, que não é fitotóxico (Ma, Ryan e Delhaize, 2001). No xilema, esse complexo é convertido em alumínio-citrato (Ma e Hiradate, 2000), permanecendo nessa forma até chegar às folhas, onde novamente é convertido em alumínio-oxalato e armazenado nos vacúolos celulares (Shen *et al.*, 2002).

Apesar de se conhecer os métodos de defesa que auxiliam na tolerância ao alumínio em plantas, o mecanismo molecular exato envolvido nessa tolerância diferencial em soja ainda não foi completamente elucidado. Em centeio, já foi demonstrado que os níveis de expressão de genes codificantes de AQPs são reduzidos em plantas tratadas com alumínio em um curto período de exposição (Milla *et al.*, 2002). Outros estudos já mostraram que as AQPs estão presentes em células de alongamento (Chaumont *et al.*, 1998; Fouquet *et al.*, 2008) e, mais recentemente, que podem transportar alumínio (Negishi *et al.*, 2012).

SOJA (*Glycine max*)

Estabelecimento da cultura de soja no Brasil

Entre as espécies vegetais que sofrem com o solo ácido está a soja, uma cultura de grande interesse econômico mundial. A soja tornou-se uma cultura importante no Brasil a partir da década de 1960 com a produção nacional de 206 mil toneladas, passando para uma safra cinco vezes maior em apenas nove anos. Essa cultura foi inicialmente estabelecida no sul do país pela semelhança climática da sua região de origem, o sul dos Estados Unidos. Na década de 70, a soja foi consolidada no agronegócio como a principal cultura brasileira. A partir desse período, a soja começou a ser disseminada em outras regiões do país, principalmente no centro-oeste, com a construção de Brasília, sendo que atualmente o centro-oeste é o local com a maior produtividade desse grão, 60 %, e a safra nacional aumentou mais de 250 vezes nestas últimas cinco décadas.

É previsto que haja futuramente um aumento do consumo mundial de soja, uma vez que a população continuará em crescimento. Além disso, o aumento da criação de suínos e aves, que são alimentados com farelo de soja, e do uso de energias renováveis, como biodiesel, também deverão colaborar para o crescimento da necessidade dessa espécie. Um dos maiores empecilhos para a atual obtenção de um melhor rendimento desse grão é o solo ácido, que prejudica o crescimento da raiz, diminuindo o potencial de desenvolvimento da planta (Souza *et al.*, 1996). Sendo assim, pesquisas para melhorar o rendimento desse grão têm sido amplamente visadas.

Estudos relacionados com o alumínio

Menosso *et al.* (2000) avaliaram a tolerância ao alumínio de 148 cultivares de soja brasileiras e cultivares-padrão norte-americanas. Dessas cultivares, 21 foram classificadas como tolerantes, 73 intermediárias e 54 sensíveis.

Estudo realizado por Duressa *et al.* (2010) buscou identificar as supostas funções de genes de resposta ao alumínio na cultivar de soja PI416937 (tolerante) pelo uso da técnica de microarranjo. Todos os genes com expressão diferencial, 40 no total, foram funcionalmente anotados e as categorias funcionais foram previstas de acordo com as supostas funções celulares. Nesse estudo, o gene do fator de transcrição *Cys2His2* destacou-se dos demais genes

testados por apresentar uma expressão gênica 51 vezes maior que o controle após 48 h de tratamento. O fator de transcrição *ADR6* está envolvido na tolerância ao alumínio. Quando a planta é submetida a uma condição de estresse, há um aumento da expressão gênica de 14 vezes em relação ao controle. Com isso, sugeriu-se que *Cys2His2* e *ADR6* possuem papel essencial na modulação do mecanismo molecular de tolerância ao alumínio na cultivar PI416937. Além disso, o aumento da expressão do gene transportador ABC sugere que, na cultivar testada, ela pode proteger a planta contra o alumínio por exclusão deste para fora da célula ou pela sua compartimentalização no vacúolo.

Análises proteômicas de variedades tolerantes ao alumínio, em arroz (Yang *et al.*, 2007), soja (Zhen *et al.*, 2007) e tomate (Zhou *et al.*, 2009), sugeriram que as enzimas de desintoxicação e antioxidantes desempenham um papel importante no mecanismo de tolerância interna ao alumínio. Duressa *et al.* (2011) demonstraram que a cultivar tolerante PI416937 possui uma melhor capacidade antioxidante e detoxificante do que a cultivar sensível Young, implicando a existência dos mecanismos de tolerância ao alumínio tanto por exclusão como por desintoxicação interna. Em trabalhos anteriores, a cultivar PI416937 já havia mostrado acumular menos alumínio no simploplasto do que a Young (Silva *et al.*, 2000).

AQUAPORINAS

Função e estrutura

Aquaporinas (AQPs) são proteínas transmembranares pertencentes à família das proteínas intrínsecas principais (“*major intrinsic proteins*” - MIPs), sendo encontradas em todos os organismos vivos (Javot e Maurel, 2002). *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, possui 38 genes de AQPs (Maurel, 2007), *Escherichia coli* 2 genes (Maurel *et al.*, 1994) e *Homo sapiens* 13 genes (Magni *et al.*, 2006). As AQPs podem ser divididas em dois grupos: canais de água, chamadas comumente de aquaporinas, ou canais de água e outros substratos pequenos, chamadas de aquagliceroporinas (Hub e De Groot, 2008). Já foi descrito em organismos que as AQPs podem transportar, além de água, glicerol (Maurel *et al.*, 1994), ureia (Bienert G. P. *et al.*, 2011), peróxido de hidrogênio (Hooijmaijers *et al.*, 2012), ácido bórico (Schnurbusch *et al.*, 2010), entre outros.

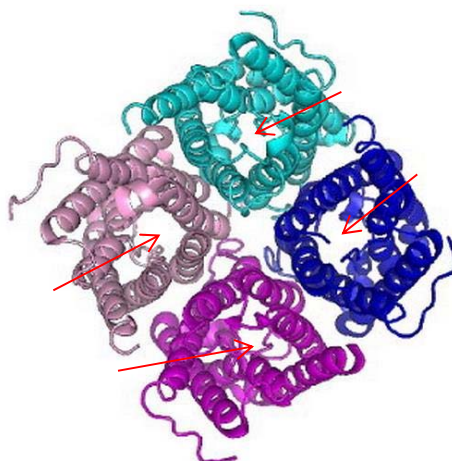


Figura 1: Estrutura tridimensional do tetrâmero de AQPs (Gomes *et al.*, 2009). Flechas em vermelho indicam os canais com transporte independente de cada monômero.

As AQPs estão organizadas em tetrâmeros nas membranas celulares, sendo que cada monômero possui canal independente (Figura 1) (Agre *et al.*, 2009). A AQP é composta por seis hélices transmembranares hidrofóbicas conectadas por cinco *loops* (A - E), sendo que as extremidades N-terminal e C-terminal estão imersas no citoplasma (Figura 2) (Gomes *et al.*, 2009). A primeira e a segunda metade da estrutura da AQP interagem na membrana em orientações opostas, propriedade estrutural básica das AQPs devido a um evento de duplicação do gene ancestral (Beitz *et al.*, 2009). Outra característica das AQPs é a presença dos resíduos de aminoácidos Asparagina-Prolina-Alanina altamente conservados, formando o motivo NPA. Estes três aminoácidos formam uma semi-hélice hidrofóbica em dois *loops* (B e E). Os motivos NPA, que ficam espacialmente próximos e no centro do poro (Park e Saier, 1996), juntamente com quatro outros resíduos de aminoácidos que compõem o filtro seletivo aromático/arginina (ar/R) (Froger *et al.*, 2001) formam duas regiões importantes de estrangulamento do poro e são os principais pontos de seleção, baseando-se na carga, polaridade e tamanho das moléculas transportadas (Fujiyoshi *et al.*, 2002; Hub e De Groot, 2008).

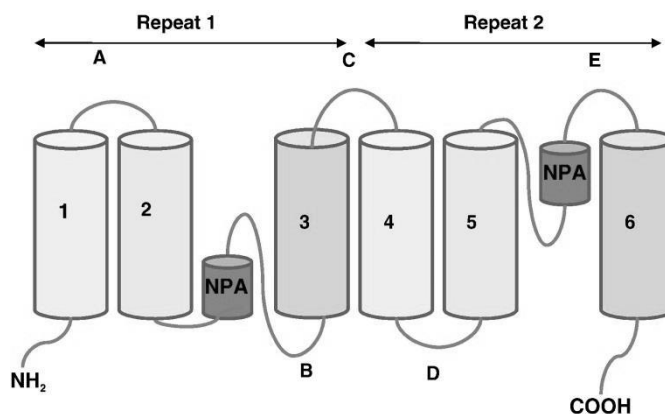


Figura 2: Estrutura primária de uma AQP. Representação dos seis domínios (1-6) conectados por cinco *loops* (A-E). Os motivos NPA (asparagina-prolina-alanina), altamente conservados, estão localizados nos *loops* B e E (Gomes *et al.*, 2009).

AQPs de plantas

A primeira AQP caracterizada em planta foi a γ -TIP de *Arabidopsis*. Vários estudos de identificação e análises funcionais de AQPs em planta têm mostrado que elas apresentam um papel importante no movimento seletivo de passagem de água através da membrana (Gomes *et al.*, 2009). Consequentemente, essas proteínas estão envolvidas em uma gama de processos fisiológicos como no alongamento celular, na germinação da semente e na osmorregulação (Maurel *et al.*, 2007). Além disso, as AQPs de plantas estão envolvidas no transporte transmembranar de pequenos solutos, referido anteriormente, e dos gases amônia e gás carbônico, tendo assim um papel importante no processo de fixação de nitrogênio e carbono (Loqué *et al.*, 2005; Uehlein *et al.*, 2003)

Em plantas, as sequências de aminoácidos das AQPs são homólogas chegando, em alguns casos, a mais de 90 % de identidade. No entanto, apesar da grande similaridade, alterações em determinados pontos-chave são responsáveis pela variação na seletividade de substratos. Baseados na homologia das sequências, as AQPs podem ser subdivididas em cinco subfamílias que, até certo ponto, estão também relacionadas com a localização subcelular: proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas do tipo Nodulina 26 (NIPs), proteínas intrínsecas pequenas (SIPs) e proteínas intrínsecas X (XIPs). As TIPs, encontradas principalmente no vacúolo, e as PIPs são os dois tipos mais abundantes nas plantas, representando a principal via para o transporte de

água na célula (Maurel *et al.*, 2002). As TIPs já foram detectadas no meristema apical e em zonas de alongamento celular, permitindo um rápido fluxo de água para o vacúolo, direcionando o alongamento celular pela pressão de turgor (Chaumont *et al.*, 1998). As NIPs, homólogas da AQP *GmNod26*, são encontradas na membrana plasmática e intracelular de nódulos de raiz (Wallace *et al.*, 2006). No retículo endoplasmático, o tipo mais abundante é SIP. Recentemente, XIPs foram localizadas na membrana plasmática e, diferentemente dos outros quatro tipos, as XIPs parecem transportar apenas solutos através da membrana (Bienert *et al.*, 2011).

JUSTIFICATIVA

A toxicidade do alumínio nos solos ácidos é um grande empecilho para a produtividade agrícola, uma vez que prejudica o rendimento da produção devido à diminuição do crescimento da raiz. O método de calagem, que é o mais utilizado atualmente, é caro e não soluciona completamente o problema. Com isso, a busca por uma solução eficiente tem sido visada em várias espécies vegetais de interesse.

As AQP's de plantas surgem como um grupo de proteínas com alto potencial de envolvimento na resposta a toxicidade do alumínio, uma vez que seus genes são altamente expressos nas células em processo de alongamento, o que permite o rápido influxo de água para os vacúolos e, conseqüentemente, gera um aumento na pressão de turgor. Em razão disso, alterações na expressão desses genes poderiam modificar a pressão de turgor na zona de alongamento celular e, com isso, influenciar o crescimento das raízes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e caracterizar os genes de AQP's expressos nas raízes de diferentes cultivares de soja (*Glycine max*) com resposta distinta à toxicidade do Al e estabelecer uma relação entre os níveis de expressão dos genes que codificam AQP's e a diferença na tolerância destas plantas.

Objetivos específicos

- Identificar os genes de AQP's expressos nas raízes dos cultivares.
- Identificar os genes de AQP's que possuem expressão diferenciada entre cultivares tolerantes e sensíveis ao Al durante o desenvolvimento inicial da planta.
- Analisar quantitativamente a relação entre o nível de expressão dos genes que codificam AQP's e a tolerância diferencial ao Al das cultivares testados.
- Avaliar se a variação do tempo de exposição das plantas com tolerância diferencial altera a expressão de genes de AQP's.
- Caracterizar funcional e estruturalmente as proteínas de AQP's que apresentam expressão gênica diferenciada.

MATERIAIS E MÉTODOS

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GENES DE AQPs

Análise genômica e desenho de primers

Nosso grupo identificou 58 genes que potencialmente codificam AQPs por meio da análise do genoma da soja disponível no site Phytozome (<https://www.phytozome.net>). Baseando-se nas sequências dos genes de AQPs disponíveis no Phytozome, foram desenhados primers específicos (APÊNDICE A). A temperatura de desnaturação (T_m) foi calculada utilizando o programa *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* disponível no site: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>.

Germinação e tratamento dos diferentes cultivares de soja

Duas cultivares de soja sensíveis ao alumínio (IAS-5 e ENGOPA 313) e duas tolerantes (Conquista e Williams) foram selecionadas. As sementes destas cultivares foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 1 % (1 min), álcool 70 % (1 min) e água destilada (1 min). As sementes foram germinadas em papel filtro (Figura 3) no escuro a 28 °C por 3 - 4 dias, tempo necessário para o crescimento das raízes primárias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para tubos de 15 mL contendo solução nutritiva com pH 4,5, composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,4 mM; MgSO_4 0,2 mM; KNO_3 0,4 mM; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 43,5 μM ; MnSO_4 0,2 μM ; CuSO_4 0,03 μM ; ZnSO_4 0,08 μM ; NaCl 3 μM ; Na_2MoO_4 0,01 μM ; H_3BO_3 1 μM e FeCl_3 10 μM , onde permaneceram por 4 dias para a ambientação. Após esse período, foi adicionada à solução nutritiva 3 μM de AlCl_3 . As raízes das plântulas tratadas e não tratadas (controle) foram coletadas após 6 e 24 horas da adição do alumínio.

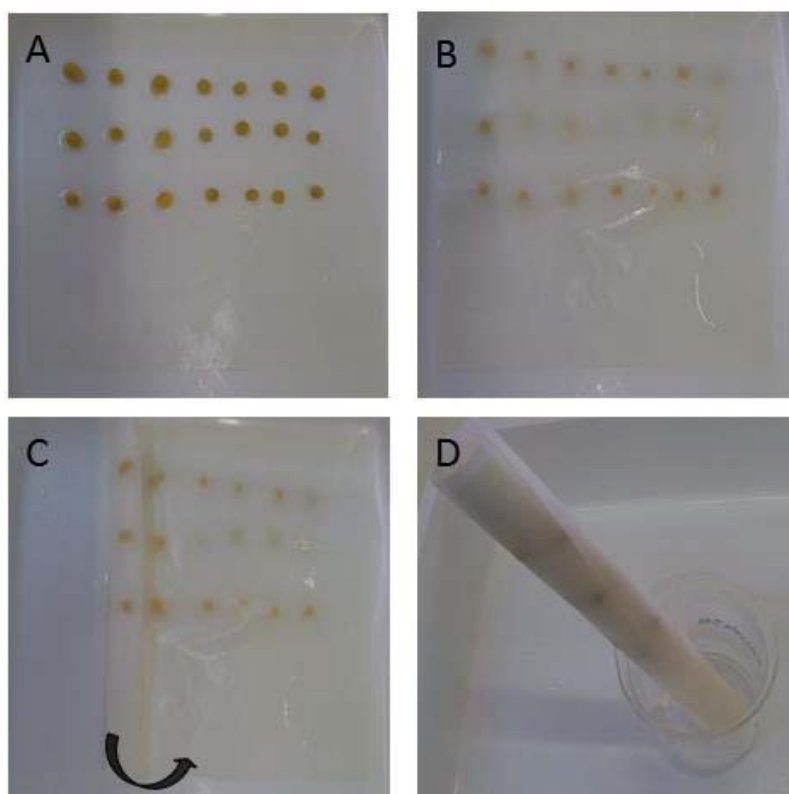


Figura 3: Germinação em papel filtro. (A) Sementes foram posicionadas em uma extremidade da folha de papel filtro e umedecidas com água destilada. (B) As sementes são cobertas com uma nova folha de papel filtro. (C) É feito um rolo com as duas folhas de papel filtro e este é imerso em água destilada.

Extração de RNA e síntese de cDNA

As raízes coletadas foram imediatamente pulverizadas em nitrogênio líquido para a extração do RNA total com o kit *GeneJET™ Plant RNA Purification* (Fermentas). Vidros, plásticos e cerâmicas utilizados na extração do RNA foram previamente descontaminados com *RNaseZap®Solution* (Life Technologies) para a remoção de RNases. A concentração de RNA extraído foi medida pela absorbância em 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) e ajustada para 0,45 µg/µL. O RNA foi tratado com *DNase 1* (Sigma-Aldrich) para a posterior síntese de cDNA com o kit *RevertAid Reverse Transcriptase* (Fermentas).

Detecção de transcritos de AQPs presentes na raiz dos cultivares

A técnica de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi empregada a fim de detectar os genes de AQP presentes nas raízes das cultivares tratadas ou controles, utilizando-se primers específicos para 40 AQPs (APÊNDICE A). Como controle da RT-PCR, foram utilizados primers para o gene da β -actina (*Glyma08g15480*). As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturação), 60 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 30 s (extensão) e extensão final a 72 °C por 10 min. As análises dos produtos da PCR foram feitas em gel de agarose 1,6 %, revelado com *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium) e utilizando *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotecnologia) como padrão de tamanho.

Quantificação de transcritos gênicos de AQPs

A técnica da PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no equipamento *Illumina Eco Real-Time Instrument - qPCR* para quantificação de transcritos dos genes de AQPs que apresentaram diferença de expressão entre os cultivares tolerantes e sensíveis ao alumínio na análise inicial por RT-PCR. Primers para os genes Fbox e metaloprotease, Fbox_F (5'AGATAGGGAAATGGTGCAGGT), Fbox_R (5'CTAATGGCAATTGCAGCTCTC), MT_F (5'ATGAATGACGGTTCATGTA) e MT_R (5'GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT), foram utilizados como controles internos para normalizar a expressão dos transcritos de AQPs. Os reagentes utilizados na reação foram oriundos do kit *qPCR-SYBR-Green mix/ROX* (Ludwig Biotecnologia). O cDNA foi preparado, como já descrito, e diluído 1:20 do volume original. As condições da qPCR utilizadas foram: 94 °C por 5 min para a desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 15 s (desnaturação), 60 °C por 15 s (anelamento), 72 °C por 15 s (extensão). Para obter a curva de desnaturação, as amostras foram aquecidas de 60 °C até 99 °C. As relações quantitativas entre os dois tratamentos foram feitas no programa Excel, utilizando a fórmula (1) para a obtenção da Relação do Gene Alvo (RGA) entre plântulas tratadas com alumínio e controles e os gráficos foram gerados no software *SigmaPlot* (Systat Software Inc).

$$RGA = \frac{2^{Ct \text{ gene alvo controle} - Ct \text{ gene alvo tratado}}}{2^{Ct \text{ normalizador controle} - Ct \text{ normalizador tratado}}} \quad (1)$$

ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DO GENE DA AQP TIP1;9

Desenho de primers

A partir das sequências dos genes de AQPs disponíveis no Phytozome, novos primers foram desenhados para amplificação do cDNA completo do gene TIP1;9. Os primers *forward* e *reverse* contém a sequência de reconhecimento para as enzimas de restrição Xho I e Xba I, respectivamente. Além disso, o primer *forward* possui a sequência consenso para aumento da eficiência de tradução na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 1; APÊNDICE B).

Tabela 1: Sequência dos primers para a clonagem da AQP TIP1;9. ● Sequência aleatória; ● Sítio de reconhecimento da enzima Xho I ou Xba I; ● Sequência consenso da *S. cerevisiae*; ● Sequência da AQP.

	Sequência (5' → 3')	Tm (°C)
Forward	GGCGGCTCGAGAAAAAATGTCTGCGTACCGCAGCGCCATC	57,2
Reverso	CGCCTCTAGATTAATAATAACTTCTGCGAAACCTCTGACGGCTA	60,8

A banda referente ao gene (765 pb) foi extraída do gel e purificada com o kit *GeneJET Gel Extration* (Thermo scientific). A ligação do inserto purificado no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) foi realizado com a enzima *T4 DNA ligase* (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Células competentes de *Escherichia coli* DH5α, previamente preparadas como descrito no APÊNDICE C, foram transformadas com a construção por choque térmico (5 min no gelo, 45 s a 42 °C e 5 min no gelo). Após, foi adicionado 100 µL de meio líquido SOC para a recuperação das células. As bactérias foram plaqueadas em meio sólido

Luria-Bertani (LB) com 100 µg/mL ampicilina, 40 µg/mL X-Gal e 1 mM IPTG. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. As colônias brancas foram coletadas e transferidas para meio LB líquido, com ampicilina, e cultivadas *overnight* a 37 °C com agitação de 200 rpm. Para confirmação da presença do gene da AQP TIP1;9 nas colônias, foi feita uma PCR utilizando como molde a cultura *overnight*, conforme protocolo descrito na Tabela 2. Após a confirmação da presença da banda de interesse, em gel de agarose 1,6 %, os plasmídeos foram isolados com o kit de Purificação de DNA Plasmidial (Ludwig Biotecnologia)

Tabela 2: Protocolo da PCR para verificar a inserção do gene da AQP TIP1;9 no vetor pGEM-T Easy.

Reagentes	Concentração final
Tampão de amostra 10 X	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP <i>mix</i>	0,4 mM
Primer Forward	0,25 mM
Primer Reverso	0,25 mM
Molde	1 µL da cultura, previamente fervida
Taq DNA polimerase	1,25 U

Subclonagem em vetor de expressão em leveduras (pYES2)

O plasmídeo purificado anteriormente foi então clivado, para a remoção do gene da AQP TIP1;9, com as enzimas de restrição Xho I e Not I, as mesmas utilizadas para a clivagem do vetor pYES2 (Invitrogen). A enzima *T4 DNA ligase* (Promega) foi utilizada para a ligação do gene da AQP TIP1;9 no vetor pYES2 (pYES2 + TIP1;9). Essa construção foi inserida em *E. coli* como descrito anteriormente. As colônias selecionadas foram então inoculadas em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada *overnight* a 37 °C e sob agitação de 200 rpm. Para a confirmação da inserção correta do gene da AQP TIP1;9, os plasmídeos foram purificados e sequenciados com o primer T7_F (5' TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG). O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene.

Células competentes de *S. cerevisiae* mutantes para o gene $\Delta fps1$ foram preparadas e transformadas com as construções pYES2 + TIP1;9 ou com o vetor pYES2 vazio (controle), utilizando o *Yeast Transformation kit* (Sigma-Aldrich). As leveduras transformadas foram plaqueadas em meio sintético completo (SC), sem a base uracila, contendo 2 % de glicose e incubadas a 28 ° C por 3 dias.

Avaliação do transporte de diferentes moléculas

Uma colônia contendo a construção pYES + TIP1;9 e uma contendo o vetor pYES2 vazio foram inoculadas em meio SC complementado com 2 % de rafinose. Os inóculos foram incubados a 28 °C, sob agitação de 250 rpm, até a obtenção de $OD_{600} \geq 0,5$. As culturas foram então centrifugadas por 5 min a 5000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 4 mL de água Milli-Q. Uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. O sobrenadante foi novamente descartado e as células ressuspensas com água Milli-Q para obter absorbância OD_{600} 0,5. A partir dessa solução (1:1), foram feitas diluições seriadas de 1:10, 1:100 e 1:1000.

Placas com meio SC (contendo 1 % de rafinose e 2 % de galactose) foram complementadas com 1 M de NaCl, 2,5 mM de H_2O_2 , 3,0 mM de H_2O_2 ou 20 mM de H_3BO_3 . 10 μ L de cada diluição foram plaqueados e as placas foram incubadas a 28 °C por 3-4 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na pesquisa visando identificar o mecanismo molecular envolvido na resposta ao estresse abiótico induzido pelo alumínio nas plantas. Muitos estudos têm demonstrado que a tolerância ao alumínio é multigênica (Shi *et al.*, 2009; Duressa, Soliman e Chen, 2010; Ryan *et al.*, 2011). Alguns desses genes já foram descritos por estarem envolvidos na tolerância em diversas plantas, como o *ALMT*, o primeiro gene identificado em plantas relacionado com a resistência ao alumínio (Sasaki *et al.*, 2004). Outros genes, como PEPC e MDH na soja (Ermolayev, Weschke e Manteuffel, 2003), o HvAACT1 no centeio (Zhou *et al.*, 2013), o OsCDT3 no arroz (Xia, Yamaji e Ma, 2013) e, mais recentemente, o ASR5 também no arroz (Arenhart *et al.* 2013) são alguns exemplos da variedade de genes estudados. Apesar disso, o mecanismo molecular exato para a tolerância diferencial ao alumínio entre diferentes plantas ainda não foi completamente esclarecido.

Neste projeto foi visado avaliar a expressão diferencial de genes de AQPs presentes nas raízes de duas cultivares tolerantes e duas sensíveis à toxicidade do alumínio, além da sua caracterização. A concentração de alumínio escolhida foi a mínima quantidade no meio necessária para causar as primeiras respostas ao estresse. Duressa (2010) utilizou 10 μM de alumínio para identificar a diferença de expressão em soja e Ermolayev (2003) utilizou 300 μM . Com base nisso, em estudos anteriores a este, foram testadas em nosso laboratório três concentrações de alumínio (3 μM , 30 μM e 300 μM) para a análise da expressão diferencial de AQPs em soja. O melhor resultado observado foi com 3 μM , pois já era possível observar alterações na expressão dos genes de AQP através da técnica de qPCR. A concentração de 3 μM de alumínio foi a utilizada no presente estudo.

A escolha dos períodos de coleta foi baseada em dados da literatura, onde se avaliou o número de genes expressos pelo tempo de exposição ao agente indutor do estresse abiótico. Foi observado que, para alumínio, as respostas iniciam nas primeiras horas após o início do tratamento e em torno de 72 h há uma drástica diminuição do número de genes expressos envolvidos na resposta ao estresse, pois, possivelmente, o alumínio já foi neutralizado ao longo desse período (Duressa, Soliman e Chen, 2010). Além disso, segundo Richards (1998), a resposta gênica que mais reflete o efeito do alumínio na planta é a dos genes induzidos no

início da resposta de defesa da planta. Com isso, escolhemos os tempos de coleta de 6 e 24 h após o início do tratamento com alumínio.

Identificação das AQPs presentes nas raízes das diferentes cultivares

A partir de estudos do nosso grupo que identificaram a presença 58 genes de AQPs em soja, por homologia de sequência e análise estrutural de cada proteína, além da identificação dos quatro aminoácidos do filtro seletivo e dos motivos NPA, *primers* para detecção de transcritos destes genes foram desenhados. Uma alta similaridade entre as sequências desses genes foi observada, podendo chegar a 90 % de identidade, dado confirmado pela recente publicação de Zhang *et al.* (2013). Esta alta identidade de sequência dos genes das AQPs em soja, dificultou a identificação de sequências específicas para cada AQP. Até o momento, 40 pares de primers foram padronizados para a técnica de PCR, no presente projeto, e 18 ainda estão sendo elaborados e testados.

Por meio da técnica de RT-PCR, foram avaliados 16 genes de AQP da subfamília TIP, 11 PIP, 12 NIP e 1 SIP em relação ao acúmulo de transcritos na raiz das quatro cultivares submetidas ou não ao tratamento com alumínio por 6 h e 24 h. Desses genes, foi detectada a expressão de 15 TIPs, 11 PIPs e 9 NIPs (Figuras 4-7), destacando-se as AQPs TIP1;9 e NIP2;2 que apresentaram aumento de expressão nas duas cultivares tolerantes, em relação ao controle, no transcorrer do período de 6 h para 24 h. O mesmo ocorreu, nas cultivares sensíveis com os genes TIP2;3, TIP 2;5, TIP4;1 e PIP2;5. Os genes PIP2;4, PIP2;7 e PIP2;12, nas cultivares tolerantes, apresentaram diminuição da expressão no decorrer no período de tratamento. Semelhante aconteceu com a AQP2;12 nas cultivares sensíveis. A NIP5;1 apresentou decréscimo da expressão nas quatro cultivares quando expostas ao alumínio. O controle da RT-PCR foi realizado com um par de primer para o gene da β -actina (Figura 8), uma proteína com expressão constitutiva.

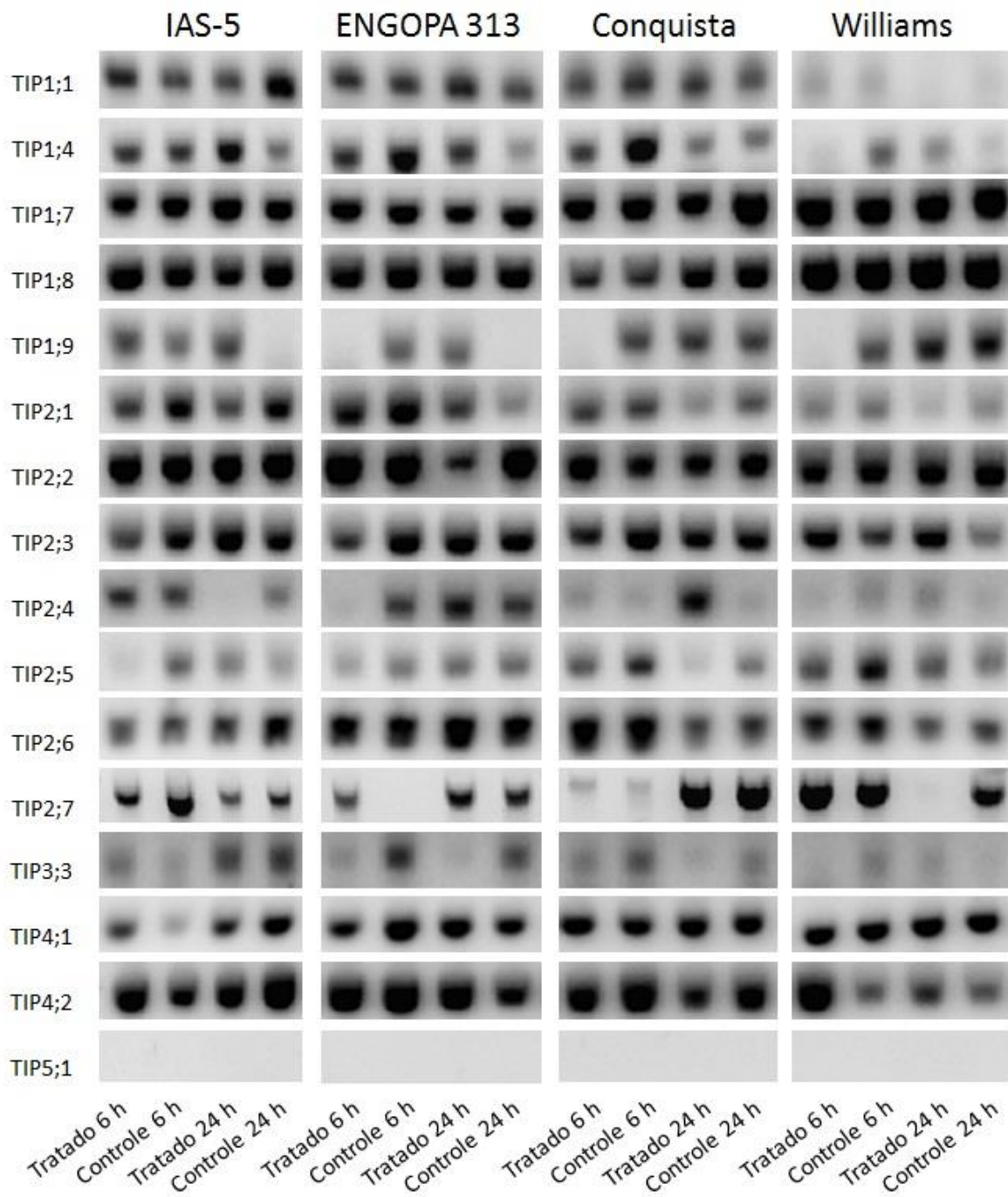


Figura 4: Detecção dos transcritos de genes de AQPs da subfamília TIP na raiz das cultivares, submetidas ou não ao tratamento com 3 μ M de alumínio por 6 h e 24 h.

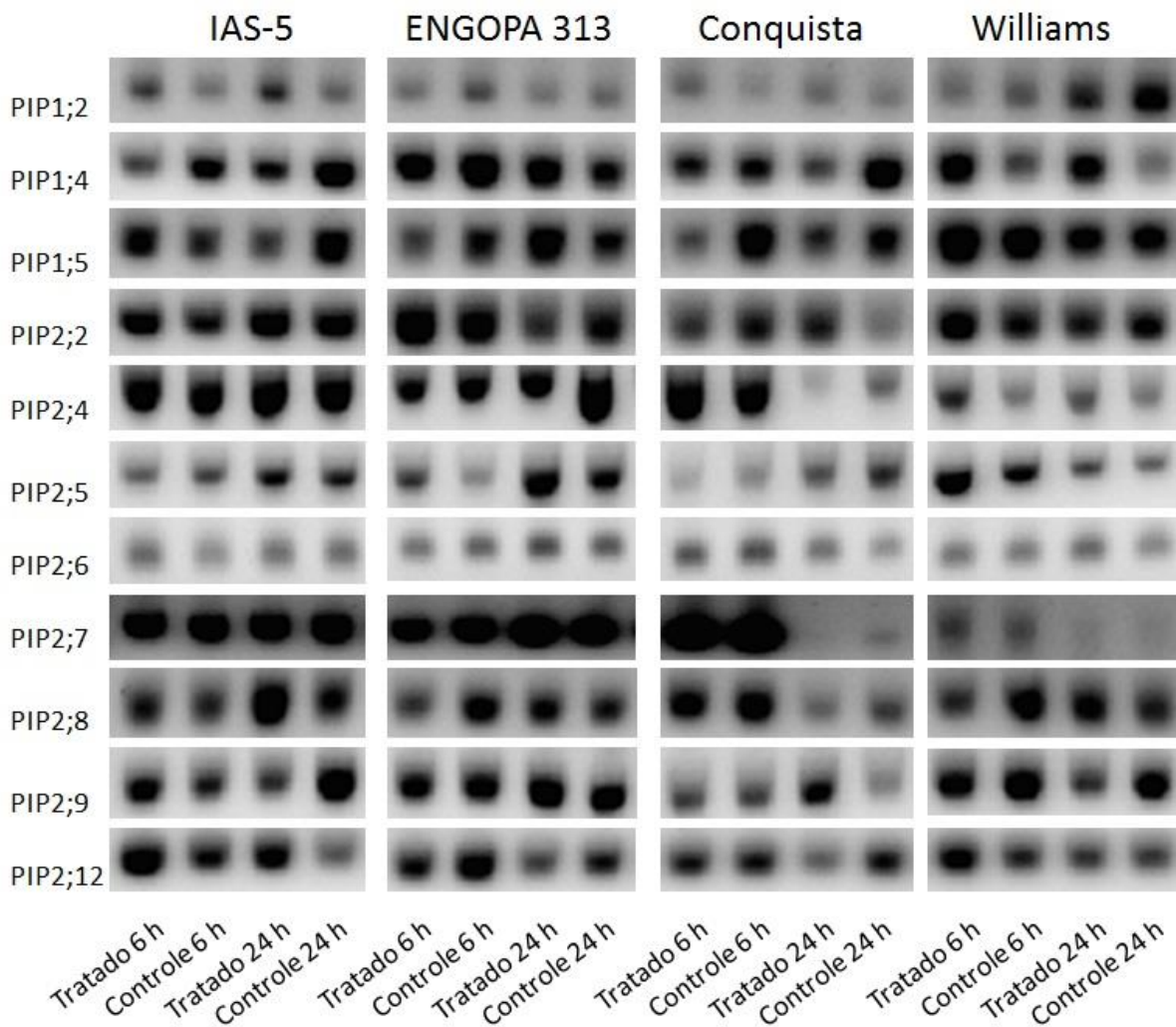


Figura 5: Detecção dos transcritos de genes de AQP's da subfamília PIP na raiz das cultivares, submetidas ou não ao tratamento com 3 μ M de alumínio por 6 h e 24 h.



Figura 6: Detecção dos transcritos de genes de AQP's da subfamília SIP na raiz das cultivares, submetidas ou não ao tratamento com 3 μ M de alumínio por 6 h e 24 h.

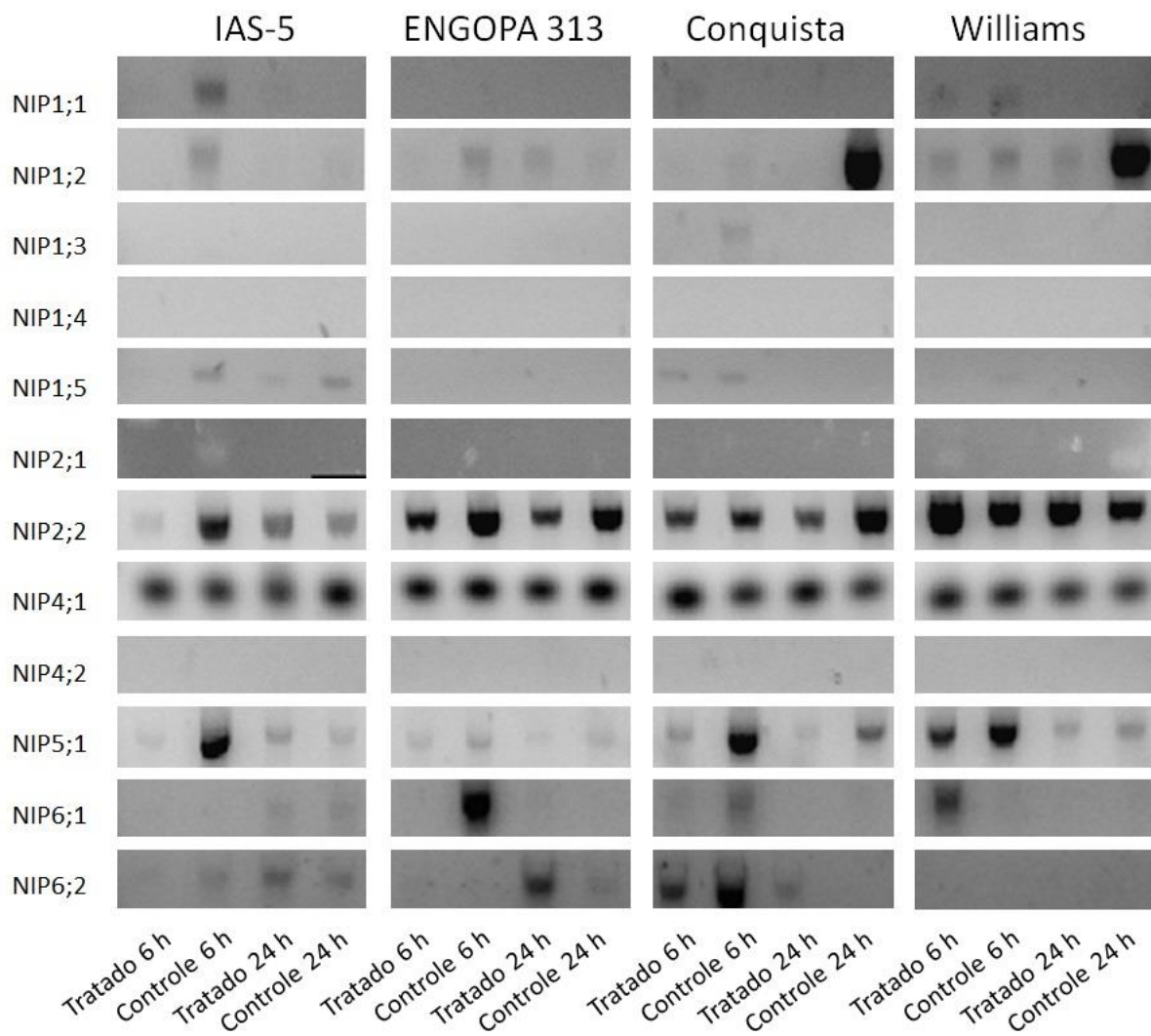


Figura 7: Detecção dos transcritos de genes de AQP's da subfamília NIP na raiz das cultivares, submetidas ou não ao tratamento com 3 μ M de alumínio por 6 h e 24 h.

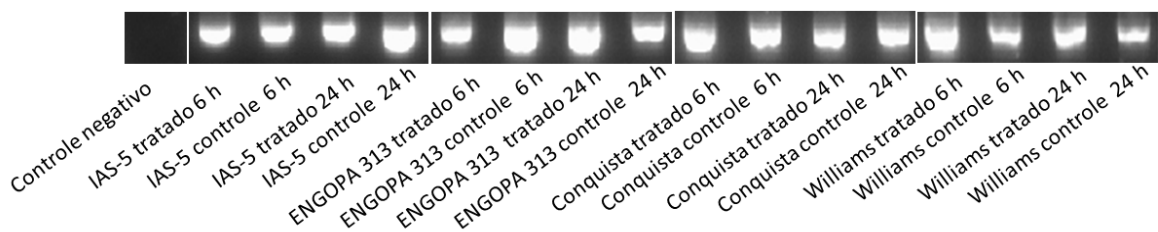


Figura 8: Detecção dos transcritos do gene controle (β -actina) na raiz das cultivares, submetidas ou não ao tratamento com 3 μ M de alumínio por 6 h e 24 h.

Quantificação dos transcritos dos genes de AQP por qPCR

Os genes de AQP que apresentaram diferença no acúmulo de transcritos entre as cultivares sensíveis e tolerantes na PCR foram os inicialmente selecionados para uma análise quantitativa. Os genes escolhidos pertencem às subfamílias TIP e PIP (TIP1;9, TIP2;1, TIP2;4, TIP2;5, TIP3;3, TIP4;1, PIP2;4, PIP2;10, PIP2;11 e PIP2;12). Até o momento, a qPCR foi realizada com uma cultivar sensível (IAS-5) e uma tolerante (Conquista) para a padronização da técnica. Futuramente, a qPCR será realizada com as outras duas cultivares e com todos os genes de AQP de soja para a obtenção de um perfil de transcritos de AQPs mais completo para a resposta ao alumínio. Para análises quantitativas dos transcritos dos genes, o *Cut off* considerado foi de 0,5 e 2, ou seja, o aumento da expressão foi considerado significativo quando, no mínimo, o dobro do valor observado para o controle e a diminuição da expressão foi considerada significativa quando esta apresentou valores iguais ou menores que a metade da expressão do controle.

No período de 6 h após o início do tratamento com alumínio (Figura 9, 6 h), foi possível observar que os genes TIP1;9 e PIP2;5 apresentaram diminuição no número de transcritos em relação ao controle na cultivar sensível, mas não na cultivar tolerante, onde não há diferença significativa em comparação com o controle. O contrário ocorreu com os genes TIP2;5 e PIP2;7, que possuem uma diferença negativa na cultivar tolerante.

Os genes das AQPs TIP4;1 e PIP2;7, no período de 24 h sob estresse provocado pelo alumínio (Figura 9, 24 h), mostraram um aumento de expressão significativo na cultivar sensível, enquanto na cultivar tolerante esses genes permaneceram com expressão similar à observada no controle. Durante esse mesmo intervalo de tempo, o transcrito da AQP TIP1;9 apresentou uma amenização de sua expressão no cultivar tolerante, sendo que a mesma não mostrou diferença significativa na cultivar sensível.

Com base nesses dados preliminares, foi possível identificar as AQPs que potencialmente estão envolvidas no processo de tolerância e sensibilidade ao alumínio como TIP1;9, TIP 2;5 TIP4;1, PIP2;5, PIP2;7. Este quadro ainda não está completo, uma vez as análises quantitativas com os outros genes de AQP presentes na raiz da soja ainda não foram realizadas.

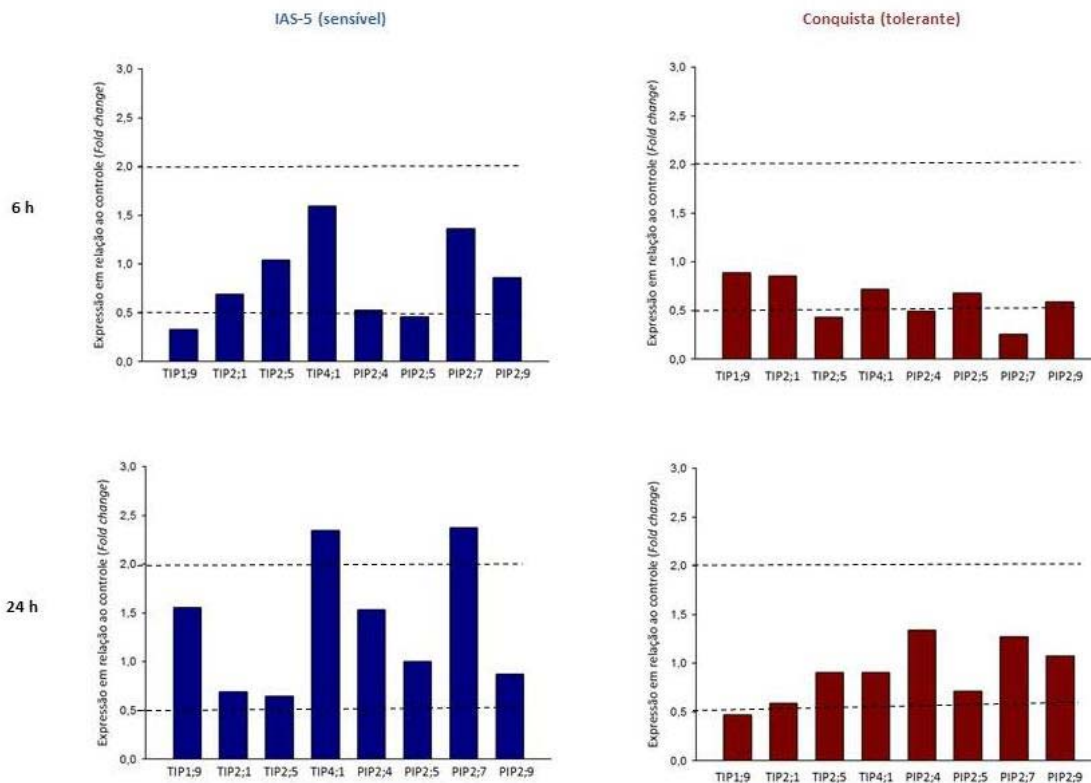


Figura 9: Quantificação da expressão de AQPs na raiz de dois cultivares de soja por qPCR. A expressão de oito genes de AQP na raiz de duas cultivares, uma sensível e outra tolerante ao alumínio, foi quantificada por qPCR. As raízes dessas cultivares ficaram expostas por 6 h ou 24 h a uma solução nutritiva contendo 3 μ M de alumínio. O *Cut off* utilizado foi de 0,5 e 2.

Negishi *et al.* (2012) publicou um estudo relacionando a tolerância de hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) ao alumínio e o alto acúmulo deste semimetal no vacúolo. No trabalho, os autores buscaram identificar um sistema que pudesse transportar esse alumínio. Por meio de análises de microarranjo e *in silico*, dois genes de AQP foram identificados, *plasma membrane Al transporter 1* (PALT1), da subfamília NIP, e *vacuolar Al transporter* (VALT), da subfamília TIP, que aparentam estar relacionados com a sensibilidade e a tolerância ao alumínio, respectivamente.

Com base nesses dados, realizamos BLAST das sequências das proteínas PAL1 e VALT com as proteínas de AQPs de soja no Phytozome. A proteína PALT1, de hortênsia, apresentou 71,8 % de identidade com a AQP NIP6;1 de soja (Figura 10A) e a VALT 82,5 % de identidade com a AQP TIP1;6 (Figura 10B).

A HSP#1: Score: 378.6 bits (971.0) E-value: 1.5e-130 Identity: 71.8% (221/308) Positive: 82.1% (253/308) Frame: +0/+0

```

Query 1MSEDEVPSAPSTFVTTPGTPGAPLFGGFKPERSGNARRSILKSCKCFGVEWAMEEG----XXXXXXXXXXXXXXXXXARKVGAEFIGTLILIFAGTATPIV 96
MD+ + PSTP TPGTPGAPLFGGF R+ N+++S+LKSC+CF VE W++E+G + PPP V LARK+GAEFIGT IL+FFAGTA IV
Subject 1MDNNE--EIPSTPATPGTPGAPLFGGFSNGRNNNSKSLKSCRCFVSEEWLEDGGLPAVSCSLPLPSPPPVPLARKIGAEFIGTFILMFAAGTAAIV 98

Query 97NQKIQGSEXXXXXXXXXXXVMIVILSTGHISGAHLNPSVTIAFAALKHFPWKHVPMYIGAQMVASLCAAFALKGIFHPIRGGGEVTVPSVHYGQAF 196
NQKT GSETL+G AA+TGLAVMIVIL+TGHISGAHLNP+VTI+FAALKHFPWKHVPMYIGAQV+AS+CA FALKG++HP GG VTVPS YGQ+FALE
Subject 99NQKTNGSETLIGCAATTGLAVMIVILATGHISGAHLNPAVTISFAALKHFPWKHVPMYIGAQVLSLASICAGFALKGVYHPFMSGG--VTVPSGGYQSF 197

Query 197FIITFNLMFXXXXXXXXXXGELAGIAGVATVMLNLIAGESTGASMPVVRTLGPAAIANNFKGIWYFTAPILGALAGAGVYSAVKLPEEIGNTHDKP 296
FII FNLMFVTVAVATDTRAVGELAGIAGVATVMLNLIAG +G SMNPVVRTLGPAAIANNFKGIWYFTAPILGALAGAG Y+AVKLP EE + K
Subject 198FIITFNLMFVTVAVATDTRAVGELAGIAGVATVMLNLIAGVSGSMNPVVRTLGPAAIANNFKGIWYFTAPILGALAGAGTYTAVKLP EEDD DAK 297

Query 297ETAHSFRQ 304
+ SFR+
Subject 298SIS-SFRR 304

```

B HSP#1: Score: 397.9 bits (1021.0) E-value: 1.0e-139 Identity: 82.5% (208/252) Positive: 91.7% (231/252) Frame: +0/+0

```

Query 1MPIYKIAIGTPGEASNPDALRAALAEFFSMLIFVFAGEGSGMAFNKIINNSTTPSGLIXXXXXXXXXXXXXXSVGANISGGHVNPVTFGAF 100
M IY+IAIGTPGEA PDA+RAA AEFFSM+IFVFAGEGSGMA++K+INN TP+GLIAA+L+HAF LFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAF+GGNIT
Subject 1MAIYRIAIGTPGEAQPDARAFAAEFFSMIFVFAGEGSGMAYSKLTNNGPATPAGLIAASLSHAFGLFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAF 100

Query 101LRSILYWIAQLLGSVVACLLKFKATGGLETSAFALSSNVVWNLVFEIVMTFGLVTVYALAVDPKKNLGI IAPIAIGFIVGANILVGGAFD 200
LRSILYWIAQLLGSVVAC+LLK ATGG+ET+ F+LS VSVWNLVFEIVMTFGLVTVYA AVDPKKN+G+++APIAIGFIVGANILVGGAFD 200
Subject 101LRSILYWIAQLLGSVVACILKKSATGGMETTFSLSPGVSVWNLVFEIVMTFGLVTVYATAVDPKKNVGVVAPIAIGFIVGANILVGGAFD 200

Query 201AVSFGPAVVSWTIHHWVYWLGMIGAAIAALIYDNIFIGDSTHEQLPVIDY 252
AVSFGPAVV+W+TTHHWVYW+GP IGAIAA+IYDNIFIGD HE L +D+
Subject 201AVSFGPAVVTWSWTIHHWVYVWVPGFIGAIAAVIYDNIFIGDDGHEPLSSSDF 252

```

Figura 10: BLAST do proteoma de soja com as proteínas PALT1 e VALT de hortênsia. (A) Alinhamento da proteína PALT1 com a NIP6;1 de soja (identidade de 71,8 %). (B) alinhamento da proteína VALT com a TIP1;6 se soja (identidade de 82,5 %).

Na análise por RT-PCR, NIP6;1 foi mais expressa na cultivar sensível (ENGOPA 313) do que nas tolerantes. Além disso, a mesma foi encontrada apenas na cultivar sensível (IAS-5) no período de 24 h, levantando a hipótese de que esta AQP pode ter um papel importante na sensibilidade ao alumínio em soja. A confirmação dos dados de transcrição será feita por qPCR. A expressão da AQP TIP1;6 ainda está sendo analisada por RT-PCR.

Altos níveis de expressão de TIPs nos meristemas apicais das células e na zona de alongamento foram detectados em milho (*Zea mays*). Essa expressão permite o rápido fluxo de água para o vacúolo, gerando uma pressão de turgor que direciona o alongamento celular (Chaumont *et al.*, 1998). Além disso, em espinafre (*Spinacia pleracea*), já foi demonstrado que a expressão de genes TIP pode ser induzida durante a formação de grandes vacúolos no alongamento celular (Karlsson *et al.*, 2000). Entretanto, essa expressão elevada de TIPs pode ser reduzida quando a planta é submetida ao alumínio, o que conseqüentemente gera uma perda da pressão de turgor em células na zona de alongamento, reduzindo o crescimento da raiz (Milla *et al.* 2002). A redução do tamanho da raiz, devido à presença do alumínio,

novamente indica que as TIP podem estar diretamente envolvidas na sensibilidade da planta ao alumínio.

Caracterização funcional e estrutural da AQP TIP1;9

O nosso grupo analisou estruturalmente todas as AQPs de soja, avaliando a estrutura tridimensional da proteína, a presença dos motivos NPA e a composição filtro seletivo. Na análise da AQP TIP1;9, que possui acúmulo de transcritos diferentes entre as cultivares tolerantes e sensíveis, foi identificado um filtro seletivo que ainda não havia sido descrito na literatura, composto pelos aminoácidos HVAA (Figura 11). Para confirmação de que se tratava de uma AQP funcional, foram realizados ensaios de complementação funcional em leveduras.

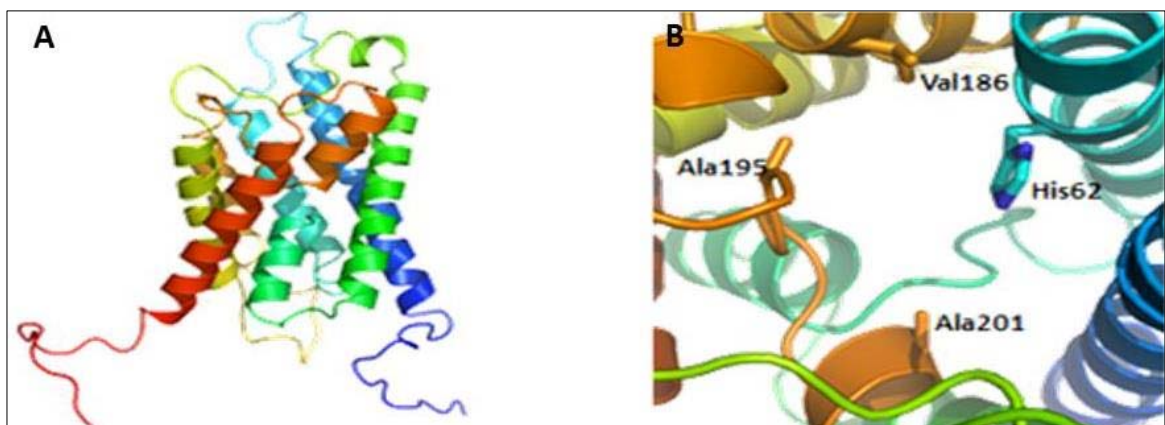


Figura 11: Modelagem molecular da AQP TIP1;9 e análise do poro. (A) Estrutura tridimensional da proteína. (B) Composição de aminoácidos do filtro seletivo.

A levedura *S. cerevisiae* com deleção do gene de AQP *fps1* foi utilizada em todos os experimentos de teste de funcionalidade e transporte. O ensaio de avaliação funcional foi realizado com a suplementação de 1 M de NaCl no meio SC. Nestas condições, células que expressam um canal de água funcional não são capazes de se multiplicar. Foi possível confirmar que TIP1;9 é uma AQP funcional, pois houve uma menor formação unidades formadoras de colônias (UFCs) nas leveduras que possuíam o gene do que no controle (Figura 12A).

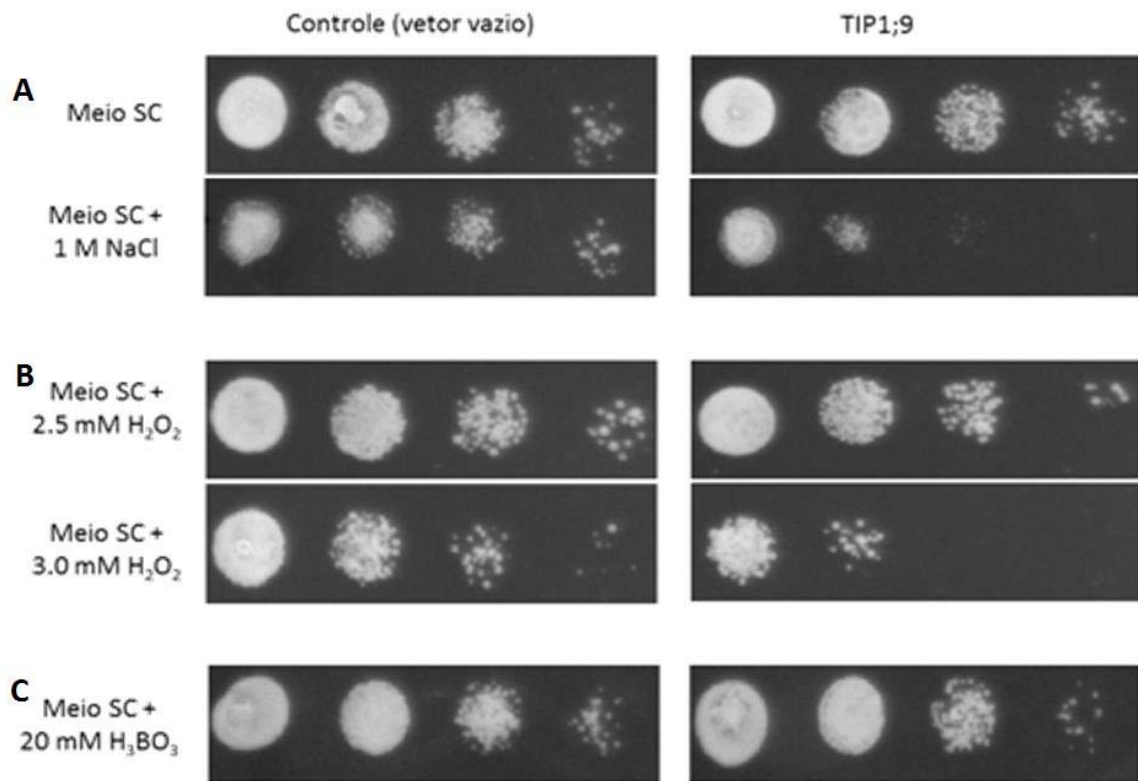


Figura 12: Ensaio de complementação funcional em *S. cerevisiae*. A absorbância (600 nm) da cultura overnight foi corrigida para 0,5 e diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1000) foram plaqueadas em meio SC, sem uracila, contendo NaCl, H₂O₂ ou H₃BO₃. As placas foram incubadas por 3 dias a 28 °C.

Investigamos, também, se esta AQP é uma AQP estrita, que transporta apenas água, ou uma aquagliceroporina que, além de água, transporta outros substratos. Para tal, foi testado o transporte de H₂O₂ e H₃BO₃. Nas avaliações de transporte do H₂O₂ pela TIP1;9 de soja, foi observada uma diminuição no número de UFC, na diluição de 1:1000, na concentração de 2,5 mM de H₂O₂. Com o aumento dessa concentração para 3 mM, houve uma queda do número de UFC já na amostra sem diluição (1:1) (Figura 12B). Isto confirma que TIP1;9 é uma aquagliceroporina. O H₂O₂ é uma forma reativa do oxigênio que é gerada durante diversos processos metabólicos. Na célula, essa forma afeta diretamente sistemas de redox intracelular, dá início a peroxidação lipídica, degrada ácidos nucleicos, inativa enzimas e, conseqüentemente, tem um alto potencial para afetar a fisiologia celular e causar danos e até a morte da célula (Hooijmaijers, 2012). Em plantas, o H₂O₂ modula a ação de antioxidantes

celulares e genes de resistência a doenças, atuando como um “comunicador” intracelular (Levine, 1994; Chappell, 1997). Estudos com AQPs de *Arabidopsis* confirmaram que três AQPs da subfamília TIP, TIP1;1, TIP1;2 e TIP2;3, são permeáveis ao H_2O_2 em células de levedura (Chaumont *et al.*, 2005). É possível que TIP1;9 esteja envolvida em funções celulares dependentes de H_2O_2 em soja.

O boro é um micronutriente essencial para plantas e, em soluções neutras, ele é predominantemente presente na forma de H_3BO_3 . Esse semimetal possui ação de inibidor ou modelador de vias metabólicas de plantas, pois influencia a atividade de várias enzimas. Entretanto, há uma pequena diferença de concentração que poder ser considerada deficiente ou tóxica para cada tipo de planta (Frank M., 1944) . AQPs tem a capacidade de transportar boro, como já foi descrito em *Arabidopsis* (Fitzpatrick e Raid, 2009) e em cevada (Schnurbusch, *et al.*, 2010). Na presença de 20 mM de H_3BO_3 , não houve diferença significativa no número de UFC em relação ao controle (Figura 12C). Assim sendo, nas condições testadas, a AQP TIP1;9 não se mostrou capaz de transportar H_3BO_3 .

CONCLUSÃO

As análises realizadas em relação a expressão de AQPs nos diferentes cultivares de soja, sensíveis ou tolerantes, possibilitam concluir que há diferença de expressão em pelo menos cinco genes de AQP, sendo eles TIP1;9, TIP2;5, TIP4;1 PIP2;5 e PIP2;7. No entanto ainda não é possível afirmar qual a participação dessas AQPs em resposta ao alumínio, uma vez que nem todos os genes tiveram sua expressão quantificada em resposta a esse estresse. Além disso, e a complexidade fisiológica que os 58 genes de AQPs acarreta deve ser considerada.

O recente artigo publicado por Negishi (2012), comprovando que AQPs podem transportar alumínio em hortênsias, trouxe novas possibilidades de mecanismos mediados por AQPs envolvidos na tolerância diferencial de plantas. Com isso, serão necessárias novas análises voltadas para a possível capacidade das AQPs de soja de transportar alumínio e o que isso estaria trazendo de benefício ou prejuízo para a fisiologia da planta.

PRÓXIMOS PASSOS E PERSPECTIVAS

Como próximos passos para o trabalho apresentado, temos:

- quantificar a expressão das outras AQPs ainda não analisadas por qPCR e dos outros dois cultivares (ENGOPA 3013 e Williams);
- avaliar a resposta dos quatro cultivares ao tratamento com outras concentrações de alumínio e nos períodos de 3 h e 48 h após o início do tratamento;
- caracterizar estrutural e funcionalmente as AQPs que apresentarem diferença de expressão entre os cultivares sensíveis e tolerantes, incluindo ensaios de avaliação do transporte de alumínio.

Com isso, a perspectiva do trabalho é aprofundar o conhecimento sobre o papel das AQPs na resposta de plantas ao alumínio, podendo gerar novas abordagens para o melhoramento vegetal para culturas mantidas em solos ácidos.

APÊNDICE

APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS PARA O RT-PCR

Tabela 3: Lista de primers para os genes de AQPs da subfamília TIP.

AQP	Primers	Tamanho Amplificado (F+R)	Utilização
TIP1;1_F	GGGCATGTTAACCCCTGCTGTCAC	150 pb	PCR e qPCR
TIP1;1_R	AGATGTTTCCAATCCACCAGTGGCAA		
TIP1;4_F	CATGTCAACCCTGCAGTCACATTTGG	150 pb	PCR e qPCR
TIP1;4_R	GCTGATGTTTCCATTCCACCAGTAGCA		
TIP1;7_F	TCACTGCCTCCCCTGTTCCA	150 pb	PCR e qPCR
TIP1;7_R	CAATAATCCCAAATTGCCCTTCTTGGGG		
TIP1;8_F	ACCTTCGGCGCCTTCGTC	240 pb	PCR e qPCR
TIP1;8_R	ACCCTTCTTGGGGTCAATGGC		
TIP1;9_F	CCGGCGGACAGGATGTACC	150 pb	PCR e qPCR
TIP1;9_R	CTCCCAAACCTACCCCTCCTGCT		
TIP2;1_F	TCGCTTACAACGAGCTTACAAAAGATGCA	151 pb	PCR e qPCR
TIP2;1_R	ATCCAAAAGTAACAGCTGGGTTCAAATGG		
TIP2;2_F	GGTTTTGCACTCTTTGTTGCAGTTTCTGTT	216 pb	PCR e qPCR
TIP2;2_R	AGAAGCCACACTGTGGATTGGAGTT		
TIP2;3_F	GGTTTTGCACTCTTTGTTGCAGTTTCTGTC	216 pb	PCR e qPCR
TIP2;3_R	TGAAGCCACACTGTGGATTGGAGT		
TIP2;4_F	GCATAGCATTTCGGAAGCTTCAATGATTCTT	199 pb	PCR e qPCR
TIP2;4_R	ACGAAGAGAGCAAAACCATGGCAAATG		
TIP2;5_F	AGCCTATGCTAAGTTGACATCAGATGCAG	150 pb	PCR e qPCR
TIP2;5_R	AACCCAAAGGTCACAGCAGGG		
TIP2;6_F	TCAGCCATAGCCTATGCTAAGTTGACATCA	150 pb	PCR e qPCR
TIP2;6_R	GGTCACAGCAGGGTTCACATGG		
TIP2;7_F	CCGTCGCCGCCAACATCTCA	910 pb	PCR
TIP2;7_R	TCGGATTTCGGACCCCTACAGTT		

Tabela 6: Continuação

TIP3;3_F	AGCCTTGCTTTGGTTAAGATTTACCAGGA	142 pb	PCR e qPCR
TIP3;3_R	AAATGTCACAGCTGGGTTGACATGG		
TIP4;1_F	CCTCAACCCCGCCGTCA	149 pb	PCR e qPCR
TIP4;1_R	GAACTGGAGTTGCCTGTCCTCCT		
TIP4;2_F	CATCTTTTCGTTCCCTGCTCTATTGGATTGA	250 pb	PCR e qPCR
TIP4;2_R	TACAAACCCAACCAGTGTGGGC		
TIP5;1_F	ATGGCTCCATCTTCTGTCCTGT	744 pb	PCR
TIP5;1_R	TTATTGCATAAACTACAGAGTTTAGACCCC		

Tabela 4: Lista de primers para os genes de AQPs da subfamília PIP.

AQP	Primers	Tamanho amplificado (F+R)	Utilização
PIP1;2_F	CTGCTGGAATATCAGGTGGGCAC	153 pb	PCR e qPCR
PIP1;2_R	CCTCAAACCCCTTCACCACACC		
PIP1;4_F	TGCTGGAATTCAGGGGGACACAT	152 pb	PCR e qPCR
PIP1;4_R	CCCTCAAAGCCCTTCACCACAC		
PIP1;5_F	CTGCTGGAATCTCAGGGGGTCATAT	153 pb	PCR e qPCR
PIP1;5_R	GCTCGAACCCCTTAACTACACCAG		
PIP2;2_F	AATCTCTGGGGGACACATCAACCC	153 pb	PCR e qPCR
PIP2;2_R	AACGATTTCTGGAACCCTTTGGCC		
PIP2;4_F	GCTGAGATCATTGGAACCTTTGTTTTGGTT	346 pb	PCR e qPCR
PIP2;4_R	CGGGGTTGCTCCTGAATGATCC		
PIP2;5_F	GTTCTCTGCAACTGACCCCAAGAG	230 pb	PCR e qPCR
PIP2;5_R	TGCTGCTCCAATAAATGGTCCAACC		
PIP2;6_F	TTCATGTGCCGTTTTGGCA	132 pb	PCR e qPCR
PIP2;6_R	GGTTGTACATGACAGCAGCTCCTAGG		
PIP2;7_F	CACTGTCTTCTCTGCAACTGACCCA	214 pb	PCR e qPCR
PIP2;7_R	AACCCAAAAGATCCATTGGTCATCCCAA		
PIP2;8_F	GACCTCAAGGAAAATGGTGAAATCTGTGGT	134 pb	PCR e qPCR
PIP2;8_R	CACCGCTGGGTTAATGTGACCC		

Tabela 7: Continuação

PIP2;9_F	CTGGGATTTTCAGGAGGTCACATTAAC	152 pb	PCR e qPCR
PIP2;9_R	ACTTTTGGAAAGCCTTAACTAAACCAACTC		
PIP2;12_F	GGCATCTCTGGGGGACACATC	153 pb	PCR e qPCR
PIP2;12_R	CGATTTCTGGAACCCTTTGGCCAAC		

Tabela 5: Lista de primers para os genes de AQPs da subfamília NIP.

AQP	Primers	Tamanho amplificado (F+R)	Utilização
NIP1;1_F	GGAAGTGAATCCCAGGAGGTGGTTCG	547 pb	PCR
NIP1;1_R	TTGCAATCCCAGCCAACCTCACCAA		
NIP1;2_F	TCAGCTGTTCTCTCTGTTTTTCTGCCT	595 pb	PCR
NIP1;2_R	CGGCAATCCCGGCCAACTCA		
NIP1;3_F	GGGTGTGCTTCAGTGGTGGTGA	658 pb	PCR
NIP1;3_R	AGCTACCACTACGCCCTACTCCT		
NIP1;4_F	GTGGTTGTTTGGTCTCAACCTCCTG	816 pb	PCR
NIP1;4_R	AAGCCCTGCCAGCTCACCAA		
NIP1;5_F	ATGTACACAAACAATGGAAGCCACCAG	444 pb	PCR
NIP1;5_R	ACCGCCAGGGAGTGTTCTCTGT		
NIP2;1_F	GCTTTCACCGCCGTCAGGCA	592 pb	PCR
NIP2;1_R	TTGGGCGGTGGTGTGGTGTTC		
NIP2;2_F	CATCACCTTCCCCTGGCGGC	717 pb	PCR
NIP2;2_R	TGGGAAAACCAGGGTGTTCAGTGT		
NIP4;1_F	CAGGGGTTTGTGTCACATGGGGA	346 pb	PCR
NIP4;1_R	CCTGCAAAGTCACCCACCCACCGCTC		
NIP4;2_F	TGCGGTTCTCCTGCGGTAGT	561 pb	PCR
NIP4;2_R	AGCTCCTGAGATTGGTCCGGC		
NIP5;1_F	AACAGGTTGGAGCAGAGTTTGTGGG	811 pb	PCR
NIP5;1_R	AGGATCATGTTGAGTTCCCCCGCAT		
NIP6;1_F	ATGAACAACGAGGAAGTCCCATCA	921 pb	PCR

Tabela 8: Continuação

NIP6;1_R	TCACCTTCTGAAGCTCCCATTAGG		
NIP6;2_F	ATGGACAATAACGAGGAAATACCCTCA	915 pb	PCR
NIP6;2_R	TCACCTTCTGAAGCTGCTGATTG		

Tabela 6: Lista de primer para os genes de AQP da subfamília SIP.

AQP	Primers	Tamanho amplificado (F+R)	Utilização
SIP2;1_F	CCACAGGAGCATCTCGCCTTAAAGA	909 pb	PCR
SIP2;1_R	TGGCTTGCCAATTGCCATACATTCA		

APÊNDICE B – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS PARA CLONAGEM

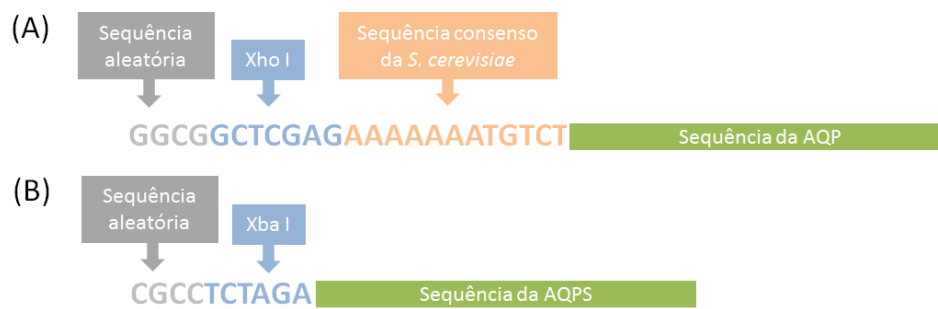


Figura 13: Esquema da construção dos primers para a clonagem da AQP TIP1;9. (A) Esquema do primer forward. (B) Esquema do primer reverso.

APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA O PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI* (LINHAGEM DH5 α).

O protocolo utilizado é uma adaptação do protocolo descrito por Cohen, Chang e Hsu(1972).

1. Inocular células de *E. coli* da linhagem DH5 α sem competência em 3 mL de meio LB líquido sem antibiótico. Deixar o inóculo *overnight* a 37 °C sob agitação de 250 rpm.
2. Em dois tubos de 50 ml com 25 ml de meio LB, adicionar 600 μ l da cultura incubada *overnight*.
3. Manter os tubos sob agitação de 250 rpm a 37 °C até a absorbância ficar entre 0,4 e 0,5 (OD₆₀₀).
4. Colocar os tubos no gelo por 10 min.
5. Centrifugar os tubos a 2880 x g por 10 min na temperatura de 4 °C.
6. Descartar o sobrenadante e manter os tubos invertidos em cima de um papel filtro para a melhor retirada do sobrenadante.
7. Ressuspender as células com 10 mL de CaCl₂ (0,1 M) gelado (valor para cada tubo). Após, deixar os tubos no gelo por 15 min.
8. Centrifugar os tubos a 2880 x g por 10 min na temperatura de 4 °C.
9. Repetir o procedimento 6.
10. Ressuspender as células em 2 mL de CaCl₂ (0,1 M) e 0,9 ml de glicerol 50 % (valores para cada tubo)
11. Deixar os tubos no gelo até o preparo das alíquotas.
12. Aliquotar 100 μ L de células por microtubo e, imediatamente, colocar no nitrogênio líquido.
13. Rapidamente armazenar as células no freezer a – 80 °C.

Nota: Rendimento médio de 60 alíquotas.

APÊNDICE D – MEIO E SOLUÇÕES UTILIZADOS

Meio LB

Triptona.....1 % (m/V)

Extrato de levedura..... 0,5 % (m/V)

NaCl.....1 % (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar por autolavagem. Para meio LB sólido, adição de 1,5 % (m/V) de ágar.

Meio SOC

Triptona.....2 % (m/V)

Extrato de levedura.....0,5 % (m/V)

NaCl.....1 % (m/V)

KCl.....0,25 % (m/V)

MgCl₂.....2 % (m/V)

Dissolver com água destilada e esterilizar por autoclave. Com o meio na temperatura ambiente, adicionar 2 % (m/V) de glicose.

Meio SC

Drop-out.....0,08 % (m/V)

YNB sem sulfato.....0,67 % (m/V)

Sulfato de amônia.....0,6 % (m/V)

Se for meio SC sólido, adicionar 2 % (m/V) de ágar. Dissolver com água destilada e esterilizar por autoclave. Após o meio esfriar, adicionar 2 % de glicose ou rafinose.

Tampão Tris-acetato-EDTA 1X (TAE 1X)

Tris.....40 mM

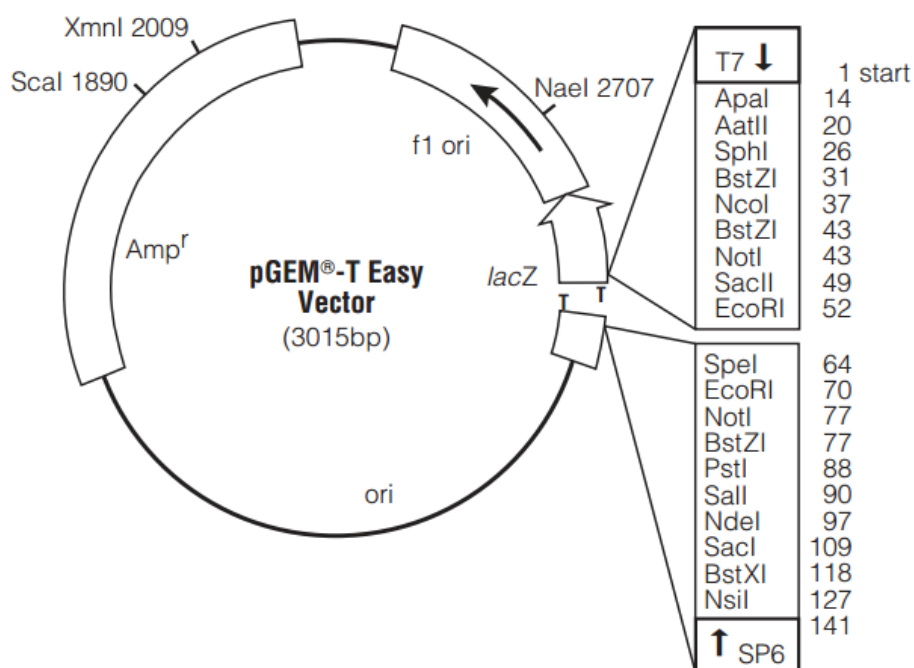
Ácido acético.....20 mM

EDTA.....1 mM

Diluir em água Milli-Q e ajustar o pH para 8.

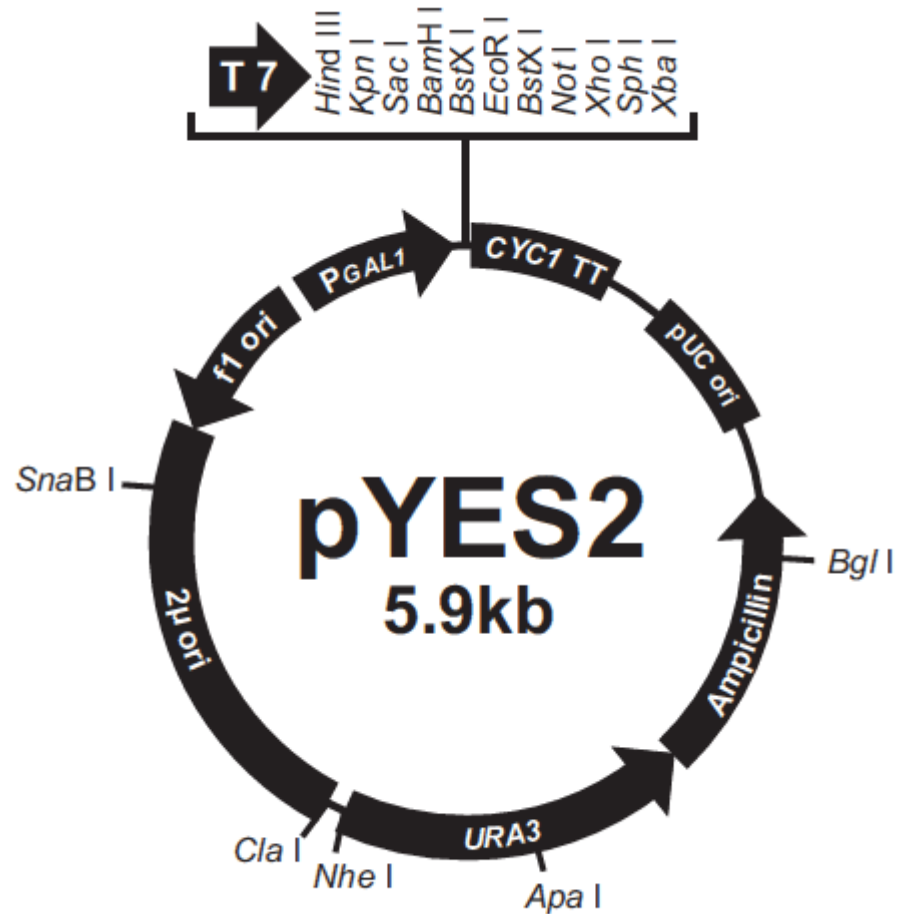
ANEXO

ANEXO A – MAPA DO VETOR pGEM-T EASY

**pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:**

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

ANEXO B – MAPA DO VETOR pYES2



Comments for pYES2:
5856 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451

T7 promoter/priming site: bases 475-494

Multiple cloning site: bases 501-600

CYC1 transcription terminator: bases 608-856

pUC origin: bases 1038-1711

Ampicillin resistance gene: bases 1856-2716 (C)

URA3 gene: bases 2734-3841 (C)

2 micron (μ) origin: bases 3845-5316

f1 origin: bases 5384-5839 (C)

(C) = complementary strand

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P., BONHIVERS, M., BORGNIA, M. J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **Jornal Biol Chem**, v. 273, n. 24, p. 14659-14662, 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614059>>

ARENHART R. A., LIMA J. C., PEDRON M., CARVALHO F. E. L., SILVEIRA J. A. G., ROSA S. B., CAVERZAN A., ANDRADE C. M. B., SCHÜNEMANN M. MARGIS R., MARGIS-PINHEIRO M. Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 1, p. 52-67, 2013. ISSN 1365-3040. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22676236>>.

BIENERT, G. P., BIENERT M. D., JAHN T. P., BOUTRY M., CHAUMONT F. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. **The Plant Journal**, v. 66, n. 2, p. 306-17, Apr 2011. ISSN 1365-313X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241387>>.

CHAUMONT, F.; LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; LUSSO, M.; LAMB, C. Characterization of a Diffusible Signal Capable of Inducing Defense Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 113, n. 2, p. 261-269, Sept 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223630>>.

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; HERMAN, E. M.; CHRISPEELS, M. J. Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1143-52, Aug 1998. ISSN 0032-0889. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701570>>.

CHAUMONT F.; MOSHELION, M.; DANIELS, M. J. Regulation of plants aquaporins activity. **Biology of the Cell**, v 97, n 10, p. 749-764, Oct 2005. ISSN 0248-4900. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16171457>>

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M. J.; JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1206-15, Mar 2001. ISSN 0032-0889. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244102>>.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the U S A**, v. 69, n. 8, p. 2110-4, Aug 1972. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4559594>>.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. **Plant Physiology**, v. 107, n. 2, p. 315-321, Feb 1995. ISSN 1532-2548. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228360>>.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; CHEN, D. Identification of Aluminum Responsive Genes in Al-Tolerant Soybean Line PI 416937. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-5389. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20953355> >.

ERMOLAYEV, V.; WESCHKE, W.; MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 393, p. 2745-56, Dec 2003. ISSN 0022-0957. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623943> >.

FITZPATRICK, K. L.; REID, R. J. The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. **Plant Cell Environ**, v. 32, n. 10, p. 1357-1365, 2009. ISSN 1365-3040. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552667>>.

FRANK, M.; EATON M. Deficiency, toxicity, and accumulation of Boron in plant. **Journal of Agricultural Research**, v. 60, n. 6, p. 237-277. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/IND43969950/PDF> >.

FOUQUET, R.; LÉON, C.; OLLAT, N.; BARRIEU, F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1541-50, Sep 2008. ISSN 0721-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560835> >.

FROGER, A.; ROLLAND, J. P.; BRON, P.; LAGRÉE, V.; LE CAHÉREC, F.; DESCHAMPS, S.; HUBER, T. J. F.; PELLERIN, I.; THOMAS, D.; DELAMARCHE, C. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 5, p. 1129-35, May 2001. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320116> >.

FUJIYOSHI, Y.; MITSUOKA, K.; DE GROOT, B. L.; PHILIPPSEN, A.; GRUBMÜLLER H.; AGRE P.; ENGEL A. Structure and function of water channels. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 4, p. 509-15, Aug 2002. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163075> >.

GOMES, D.; AGASSE, A.; THIÉBAUD, P.; DELROT, S.; GERÓS, H.; CHAUMONT, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 6, p. 1213-28, Jun 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327343> >.

HEDE, A. R.; SKOVMAND, B.; LÓPEZ-CESATI, J. Acid Soils and Aluminum Toxicity. **CIMMYT**, México, p. 172-182, 2003. Disponível em: < http://www.plantstress.com/articles/toxicity_m/acidsoil_chapter.pdf >

HOOIJMAIJERS, C.; RHEE, J. Y.; KWAK, K. J.; CHUNG, G. C.; HORIE, T.; KATSUHARA, M.; KANG, H. Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, v. 125, n. 1, p. 147-53, Jan 2012. ISSN 1618-0860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21390558> >.

HUB, J. S.; DE GROOT, B. L. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. **Proceedings of the National Academy of Science of the U S A**, v. 105, n. 4, p. 1198-203, Jan 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202181> >.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C., RENGEL, Z., ALBERDI, M., DE LA LUZ MORA, M., AQUEA F., ARCE-JOHNSON, P., REYES-DÍAZ, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 3, p. 2069-79, Mar 2012. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660471> >.

JANSEN, S.; WATANABE, T.; SMETS, E. Aluminium accumulation in leaves of 127 species in Melastomataceae, with comments on the order Myrtales. **Annals of Botany**, v. 90, n. 1, p. 53-64, Jul 2002. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12125773> >.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v. 90, n. 3, p. 301-13, Sep 2002. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234142> >.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils: Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 55, p. 459-93, 2004. ISSN 1543-5008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377228> >.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/795482> >

LOQUÉ, D.; LUDEWIG, U.; YUAN, L.; VON WIRÉN, N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. **Plant Physiology**, v. 137, n. 2, p. 671-680. ISSN 0032-0880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665250> >

MA, J. F.; HIRADATE, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, v. 211, n. 3, p. 355-60, 2000. ISSN 0032-0935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987553> >.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in the Plant Science**, v. 6, n. 6, p. 273-8, 2001. ISSN 1360-1385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378470> >.

MAGNI, F.; SARTO, C.; TICOZZI, D.; SOLDI, M.; BOSSO, N.; MOCARELLI, P.; KIENLE, M. G. Proteomic knowledge of human aquaporins. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5637-49, Oct 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044001> >.

MAUREL, C.; JAVOT, H.; LAUVERGEAT, V.; GERBEAU, P.; TOURNAIRE, C.; SANTONI, V.; HEYES, J. Molecular physiology of aquaporins in plants. **International Review of Cytology**, v. 215, p. 105–148, 2002. ISSN 0074-7696. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952226> >

MAUREL, C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2227-36, 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382935> >.

MAUREL, C.; REIZER J.; SCHROEDER J. I.; CHRISPPEELS M. J.; SAIER M. H. JR. Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 16, p. 11869-72, 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512955> >.

MENOSSO, O. G.; GASTÃO, O.; COSTA, J. A.; ANGHINONI, I.; BOHNEN, H. TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA AO ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2157-2166, 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n11/a06v3511.pdf> >

MERIGA, B.; REDDY, B. K.; RAO, K. R.; REDDY, L. A.; KISHOR, P. B. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 63-8, 2004. ISSN 0176-1617. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15002665> >.

MILLA, M. A.; BUTLER, E.; HUETE, A. R.; WILSON, C. F.; ANDERSON, O.; GUSTAFSON, J.P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 1706-16, 2002. ISSN 0032-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481053> >.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673-86, 2001. ISSN 0001-527X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11833776> >.

NEGISHI, T.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; KANAI, M.; MANO, S.; NISHIMURA, M.; YOSHIDA, K. Tonoplast- and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43189, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952644> >.

OBROUCHEVA, N. V.; SIN'KEVICH, I. A. Aquaporins and cell growth. **Russian Journal of Plants Physiology**, v. 57, n. 2, p. 153-165, 2008. ISSN 1021-4437 or 1608-3407 (on line). Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1134%2FS1021443710020019> >

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling e Behavior**, v. 4, n. 7, p. 592-7, 2009. ISSN 1559-2324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820334> >.

PARK, J. H.; SAIER, M. H. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. **Journal of Membrane Biology**, v. 153, n. 3, p. 171-80, 1996. ISSN 0022-2631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849412> >.

RENGEL, Z.; ELLIOTT, D. C. Mechanism of aluminum inhibition of net Ca uptake by amaranthus protoplasts. **Plant Physiology**, v. 98, n. 2, p. 632-8, 1992. ISSN 0032-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16668688> >.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 1, p. 9-20, 2011. ISSN 1460-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847099> >.

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n. 9, p. 1568-77, 2005. ISSN 0032-0781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033806> >.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v. 37, n. 5, p. 645-53, 2004. ISSN 0960-7412. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871306> >.

SCHNURBUSCH, T.; HAYES, J.; HRMOVA, M.; BAUMANN, U.; RAMESH, S. A.; TYERMAN, S. D.; LANGRIDGE, P.; SUTTON, T. Boron toxicity tolerance in barley through reduced expression of the multifunctional aquaporin HvNIP2;1. **Plant Physiology**, v. 153, n. 4, p. 1706-15, 2010. ISSN 1532-2548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581256> >.

SHEN, R.; Ma, J. F.; Kyo, M.; Iwashita, T. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Planta**, v. 215, n. 3, p. 394-8, 2002. ISSN 0032-0935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111220> >.

SHI, B. J.; GUSTAFSON, J. P.; BUTTON, J.; MIYAZAKI, J.; PALLOTTA, M.; GUSTAFSON, N.; ZHOU, H.; LANGRIDGE, P.; COLLINS, N. C. Physical analysis of the complex rye (*Secale cereale* L.) Alt4 aluminium (aluminum) tolerance locus using a whole-genome BAC library of rye cv. Blanco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 4, p. 695-704, 2009. ISSN 1432-2242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19529908> >.

SILVA, I. R., SMYTH, D. F., MOXLEY, T. E., CARTER, N. S., ALLEN, N. S. and RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, v. 123, n. 2, p. 543-552, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10859184> >

SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. Correção do solo e adubação da cultura da soja. **Planaltina: EMBRAPA-CPAC**, v. 33, p. 30, 1996.

UEHLEIN, N.; LOVISOLO, C.; SIEFRITZ, F.; KALDENHOFF, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 734-737, 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14520414>>

VALADEZ-GONZÁLEZ, N., Colli-Mull J. G., Brito-Argáez L., Muñoz-Sánchez J.A., Aguilar J. J. G., Castaño E. Differential Effect of Aluminum on DNA Synthesis and CDKA Activity in Two *Coffea arabica* Cell Lines. **Journal of Plant Growth Regulation** v. 26, n. 1, p. 69-77, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00344-006-0039-0>>

WALLACE, I.S., CHOI, W.G. AND ROBERTS, D.M. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1758, n. 8, p. 1165-1175, 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716251>>

WHITTEN, M. G.; WONG, M. T. F.; RATE, A. W. Amelioration of subsurface acidity in the south-west of Western Australia: downward movement and mass balance of surface-incorporated lime after 2-15 years. **Australian Journal of Soil Research**, v. 38, n. 3, p. 711 - 728, 2000. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/paper/SR99054.htm>>

XIA, J.; YAMAJI, N.; MA, J. F. A plasma membrane-localized small peptide is involved in rice aluminum tolerance. **The Plant Journal**, v. 76, n. 2, p. 345-55, 2013. ISSN 1365-313X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888867>>

YANG, J. L.; Li, Y.Y.; Zhang, Y. J.; Zhang, S. S.; Wu, Y. R.; Wu, P.; Zheng, S. J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 602-11, 2008. ISSN 0032-0889. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083797>>

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, C.; QIAN C.; PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 737-749, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295357>>

ZHEN, Y., QI, J. L.; WANG, S. S. Comparative proteome analysis of differentially expressed protein induced by Al toxicity in soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 131, n. 4, p. 542-554, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18251846>>

ZHANG, D. Y.; ALI, Z.; WANG, C.B.; XU, L.; YI, J. X.; XU, Z. L.; LIU, X. Q.; HE, X. L.; HUANG, Y. H.; KHAN, I. A.; TRETOWAN, R. M.; MA, H. X. Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56312, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437113>>

ZHOU, G.; DELHAIZE, E.; ZHOU, M.; RYAN, P. R. The barley MATE gene, HvAACT1, increases citrate efflux and Al(3+) tolerance when expressed in wheat and barley. **Ann Bot**, v. 112, n. 3, p. 603-12, 2013. ISSN 1095-8290. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798600> >.

ZHOU, S.; SAUVÉ, R. and THANNHAUSER, T. W. Proteome changes induced by aluminum stress in tomato roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 4201-4213, 2009. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336389> >