

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

Julio Cezar Santos Otto

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) em Genes Relacionados a  
Absorção e Translocação de Boro em *Eucalyptus*.

Botucatu-SP

2012

**Julio Cezar Santos Otto**

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) em Genes Relacionados a  
Absorção e Translocação de Boro em *Eucalyptus*.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, para  
a Obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas – Área de Concentração Genética.

**Orientador: Prof. Dr. Celso Luís Marino**

Botucatu-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Otto, Julio Cezar Santos.

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) em genes relacionados a absorção e translocação de Boro em *Eucalyptus* / Julio Cezar Santos Otto. - Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Celso Luís Marino

Capes: 20203004

1. Eucalipto - Melhoramento genético.

Palavras-chave: Déficit Boro; *Eucalyptus*; Haplótipo; SNPs.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por Sua Providência e pelo dom da vida.

Aos meus pais, que me ensinaram tudo o que sei e graças a eles me tornei quem sou hoje.

A Vanusa pelo amor, carinho, companheirismo, respeito e amizade.

Ao Prof. Celso Luís Marino pela confiança e oportunidade.

À companhia Fibria por fornecer o material vegetal.

Aos colegas do laboratório CAGEM: Cíntia, Virginia, Leonardo, Andréia, Helena, Karine, Paola, Cecília, Lídia, Maurício, e todos os que por lá passaram.

A todos os colegas do laboratório BIOGEM e do departamento de genética.

Ao amigo Bonsai pelo auxílio nas etapas desse trabalho.

Ao amigo Douglas que sempre esteve disposto a auxiliar nas discussões e análise dos dados.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho.

A toda a minha família avós e avôs (em memória).

A CAPES pela bolsa concedida.

Dedico este trabalho às pessoas que lutam diariamente ao meu lado com fé, amor, alegria, determinação e coragem, tornando os meus dias mais felizes e bonitos. Aos meus pais Maria Francisca e Eluiz Carlos (em memória), a minha irmã Juliana, minha esposa Vanusa e ao meu filho Carlos Augusto. Sem vocês eu não seria nada.

## RESUMO

OTTO, J. C. S. **SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) em genes relacionados a absorção e translocação de boro em *Eucalyptus***. 2012. 68f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

A expansão da atividade florestal no Brasil tem levado a exploração cada vez maior de solos considerados pobres do ponto de vista nutricional. A necessidade de adubações de correção e/ou manutenção envolve considerável custo de produção, o qual é incorporado ao custo final do produto. Os relatos de deficiências do micronutriente Boro (B) nestas situações têm levado a realização de muitos trabalhos com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos envolvidos na absorção e retranslocação deste nutriente, assim como a avaliação de materiais que possam apresentar variabilidade genética quanto à resposta a sua deficiência. O grupo CAGEN em parceria com a empresa Fibria desenvolveu este projeto que visa a busca de SNPs em genes relacionados à absorção e translocação de B. em *Eucalyptus*. Como resultado da procura de SNPs, nos genes *BOR1* e Sorbitol dehydrogenase foram encontrados um total de 54 SNPs sendo que, no gene *BOR1*, foi localizado 35 SNPs, e destes, 16 foram encontrados em exons e 19 em introns. Distribuídos da seguinte forma, 13 no “primer” B9 e destes dois em exons, 11 no “primer” B10 com sete localizados em exons e 11 encontrados no “primer” B11 com sete deles em exons, das mutações encontradas no gene *BOR1*, 69% ou 24 do total de 35 SNPs foram substituições por transição e 31% ou 11 dos 35 foram substituições por transversão. Dos 16 SNPs encontrados em exons, dois deles foram encontrados no “primer” B9, sete no “primer” B10 e sete no “primer” B11. Quanto a classificação das mutações em sinônimas e não sinônimas, dos 16 SNPs, 12 (75%) apresentaram mutações sinônimas e quatro (25%) apresentaram mutações não sinônimas, destas três ocorreram nos SPNs encontrados no primer B10 e uma no "primer" B11. Como resultado da procura de SNPs no gene da Sorbitol dehydrogenase, foi encontrado um total de 19 SNPs, destes, sete foram encontrados em exons, 10 em introns e dois nas regiões UTRs sendo um na 3' UTR e outro na 5' UTR . Distribuídos da seguinte forma, oito no “primer” B1 e destes um na região 3' UTR, cinco em exons e dois em introns, já no "primer" B2 foram

encontrados 11 SNPs sendo dois localizados em exons, oito em introns e um na 5' UTR. Dos sete SNPs encontrados em exons, cinco deles foram encontrados no "primer" B1 e dois no "primer" B2. Destes ocorreram mutação por transição em seis (86%) e mutação por transverção em um deles (14%). Já a classificação das mutações em sinônimas e não sinônimas, dos sete SNPs encontrados em exons, quatro (57%) apresentaram mutações sinônimas e três (43%) apresentaram mutações não sinônimas, das mutações não sinônimas uma ocorreu no SPN encontrado no "primer" B1 e duas nos SNPs localizados no "primer" B2. Na análise da diversidade para o gene BOR1, foram encontrados 16 Haplótipos, a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,957 e a diversidade Nucleotídica Pi ( $\pi$ ) encontrada foi 0,00308 em média foi encontrado um SNP para cada 120 pb. Para o gene da Sorbitol dehydrogenase, foram encontrados 18 Haplótipos, a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,967 e a diversidade Nucleotídica Pi ( $\pi$ ) encontrada foi 0,00296 em média foi encontrado um SNP para cada 152 pb.

Palavras-chave: SNPs, déficit Boro, *Eucalyptus*, haplótipo

## ABSTRACT

The Brazil forestry expansion has increased the poor nutritional soils exploitation. The need for fertilizers correction and / or maintenance involves considerable production costs, which is incorporated into the final product price. The reports about boron (B) micronutrient deficiencies in these situations have led to realization of many works for better understand the mechanisms involved in nutrients uptake and retranslocation, as well as the materials evaluation that may present genetic variability for response to their disability. CAGEN group in partnership with Fibria Company idealized this project for search SNPs in genes related to Boron absorption and translocation in Eucalyptus. On gene BOR1, was found 35 SNPs of which, 16 were found in exons and 19 in introns, of which, 13 in B9 primer with two of these in two exons, 11 in B10 primer with seven of these located in exons and 11 found in B11 primer with seven of them in exons. From gene mutations found in BOR1, 69% or 24 SNPs were transitional substitutions and 31% or 11 were transversion substitutions. Of the 16 SNPs found in exons, two of them were found in B9 primer, seven in B10 primer and seven in B11 primer. Mutations were classified as synonymous and non-synonymous, being that of 16 SNPs, 12 (75%) had synonymous mutations and four (25%) had non-synonymous mutations, in these, three occurred in SPNs found in B10 and one in B11 primer. From gene mutations found in sorbitol dehydrogenase, was found 19 SNPs, of these, seven were found in exons, 10 in introns and two in UTRs regions, one at 3' UTR and one another at 5' UTR. Their distribution was, eight in B1 primer and, of these, one in a 3' UTR region, five in exons and two in introns. In B2 primer were found 11 SNPs, two being located in exons, eight in introns and one in 5' UTR. Of the seven SNPs found in exons, five of them were found in B1 primer and two in B2 primer. By these, mutation transition occurred in six (86%) and transversion mutation in one (14%). Of the seven SNPs found in exons, four (57%) had synonymous mutations and three (43%) had non-synonymous mutations, one non-synonymous mutations occurred in the SNP found in B1 primer and two in the B2 primer. For the BOR1 gene diversity analysis were found 16 haplotypes, with 0.957 haplotype diversity and 0.00308 nucleotide diversity  $P_i$  ( $\pi$ ), on average was found one SNP in each 120 bp. For the sorbitol dehydrogenase gene, were found 18 haplotypes, with 0.967 haplotype diversity and 0.00296 nucleotide diversity  $P_i$  ( $\pi$ ), on average was found one SNP in each 152 bp.

Keywords: SNPs, Boron deficit, Eucalyptus, haplotype



# Sumário

## Conteúdo

RESUMO

ABSTRACT

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	O Boro na planta .....	16
1.2	Polióis .....	18
1.2.1	Polióis e a Mobilidade de Boro.....	20
1.3	Funções do Boro nas plantas .....	22
1.4	Single Nucleotide Polymorfism (SNPs).....	27
1.5	Diversidade nucleotídica e haplótipos de SNP .....	29
1.6	Genes Candidatos.....	31
2	Objetivos .....	34
2.1	Objetivos Gerais .....	34
2.2	Objetivos Específicos.....	35
3	Material e Métodos.....	35
3.1	Material vegetal .....	35
3.2	Procura dos Genes candidatos.....	36
3.3	Extração de DNA.....	36
3.4	Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	37
3.5	Condições de amplificação.....	37
3.6	Purificação dos produtos de PCR .....	37
3.7	Reação de Seqüenciamento.....	38
3.8	Precipitação das reações de seqüenciamento .....	38
3.9	Alinhamento das Seqüências e procura de SNPs .....	39
3.10	Análise da diversidade.....	39
4	Resultado e Discussão .....	40
4.1	Procura dos genes .....	40
4.1.1	Gene BOR1 .....	40
4.1.2	Gene NIP5; 1.....	41

4.1.3	Gene da enzima Sorbitol dehydrogenase .....	43
4.1.4	Gene da enzima Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (Aldose-6-phosphate reductase) .....	45
4.1.5	Gene da enzima Mannose-6-phosphate isomerase (Phosphomannose isomerase) .....	47
4.2	Desenho dos "primers" e padronização.....	49
4.3	Teste e padronização dos "primers" .....	50
4.4	Sequenciamento e confirmação da região esperada.....	51
4.5	Ensaio de genotipagem de SNPs com a região dos genes BOR1 e Sorbitol dehydrogenase.....	52
4.5.1	Sequenciamento .....	52
4.5.2	Procura de SNPs .....	52
4.5.3	Genotipagem BOR1.....	53
4.5.4	Classificação dos SNPs localizados nas regiões codificantes.....	54
4.5.5	Genotipagem do gene da Sorbitol dehydrogenase .....	56
4.5.6	Classificação dos SNPs localizados nas regiões codificantes.....	57
4.5.7	Análise da diversidade.....	60
5	Conclusões.....	61
6	Referencias.....	63

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene <i>BOR1</i> .	41
Tabela 2 – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene <i>NIP5;1</i> .	43
Tabela 3 – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da sorbitol deidrogenase.	45
Tabela 4 – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase.	47
Tabela 5 – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da Mannose-6-phosphate isomerase.	48
Tabela 6 - Nome de cada "primer" desenhado para os genes em estudo.	50
Tabela 7 - SNPs encontrados em cada “primer”, sua posição a partir do ATG, tipo de mutação, tipo de substituição e sua localização.	55
Tabela 8 – “Primers” e os respectivos SNPs encontrados na região codante do gene, o tipo de mutação, localização da substituição no codon, aminoácido produzido, pelo codon normal e mutado e os genótipos encontrados.	56
Tabela 9 – “Primers” onde foram encontradas mutações não sinônimas, quais SNPs tem a mutação, o tipo de substituição encontrada, onde foi a substituição em cada codon, qual a mutação de aminoácido ocorreu e o tipo de genótipo encontrado.	56
Tabela 10 - SNPs encontrados em cada “primer” sua posição a partir do ATG, tipo de mutação encontrada o tipo de substituição e sua localização.	58
Tabela 11 – “Primers” e os respectivos SNPs encontrados na região codante do gene, o tipo de mutação, localização da substituição no codon, qual aminoácido é produzido pelo codon normal e mutado e os genótipos encontrados na amostra.	59
Tabela 12 – “Primers” onde foram encontradas mutações não sinônimas, quais SNPs tem a mutação, o tipo de substituição encontrada, onde foi a substituição em cada codon, qual a mutação de aminoácido ocorreu e o tipo de genótipo encontrado.	59

## Lista de Figuras

- Figura 1 - Estrutura dos polióis mais comumente encontrados em plantas.....19
- Figura 2 - Rota metabólica da produção do sorbitol Figura 2A, onde está localizada a Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, enzima responsável pela penúltima etapa da via de produção do Sorbitol, Figura 2B Rota metabólica da degradação do sorbitol onde se encontra a enzima Sorbitol dehydrogenase, responsável pela degradação do Sorbitol, Figura 2C rota metabólica onde se encontra a enzima manitol Mannose-6-phosphate isomerase (phosphomannose isomerase) enzima responsável pelo primeiro passo na via de produção do manitol. (Imagens obtidas em: <http://metacyc.org/>) ..... 33
- Figura 3 - Modelo de transporte de Boro em raízes *Arabidopsis thaliana*, submetidas a limitação de boro, Sob Limitação de B, NIP5;1 aumenta a permeabilidade do ácido bórico às membranas celulares, e facilita fluxo de B do solo pelas células da raiz. BOR1 Exporta B para o xilema e para fora das células de acordo com um gradiente de concentração. Quando em altas concentrações de B, a expressão de NIP5;1 e BOR1 é regulada por mecanismos transcricional e pós transcricional respectivamente, sendo que a regulação negativa de NIP5;1 e BOR1 pode ser benéfica para evitar a toxicidade em casos de altas concentrações de B. (Figura adaptada de Miwa e Fujiwara, 2010)..... 34
- Figura 4 – Resultado do Blast do EST similar ao BOR1 contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo..... 40
- Figura 5 – figura 5A Representa o loco AT2G47160 (BOR1) em *Arabidopsis thaliana* em suas duas versões a superior com 12 exons e 11 introns e a inferior com 11 exons e 10 introns, figura 5B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons observados em uma das versões de *Arabidopsis thaliana* estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes..... 41
- Figura 6 – Resultado do Blast do EST similar a NIP5;1 contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo..... 42
- Figura 7 - Figura 7A Representa o loco AT4G10380 (NIP5;1) em *Arabidopsis thaliana*, figura 7B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes..... 43
- Figura 8 – Resultado do Blast do EST similar a sorbitol dehydrogenase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo..... 44
- Figura 9 – figura 9A Representa o loco AT5G51970 (sorbitol dehydrogenase) em *Arabidopsis thaliana* em suas duas versões a superior com cinco exons e quatro introns e a inferior com seis exons e cinco introns, figura 9B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar uma estrutura com quatro exons e três introns, estrutura esta diferente da observada nas duas versões de *A. thaliana*..... 45

Figura 10 – Resultado do Blast do EST Similar a Sorbitol_6_phosfatase Dehydrogenase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.....	46
Figura 11 - figura 11A Representa o loco AT2G21260.1 Sorbitol_6_phosfatase Dehydrogenase (aldose-6-phosphate reductase) em <i>A. thaliana</i> que apresenta seis exons e cinco introns, figura 11B mostra estrutura prevista em <i>Eucalyptus</i> , onde e possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes.....	47
Figura 12 – Resultado do Blast do EST similar a Mannose-6-phosphate isomerase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.....	48
Figura 13 – figura 13A Representa o loco AT3G02570 (Mannose-6-phosphate isomerase) em <i>A. thaliana</i> que apresenta cinco exons e quatro introns, figura 13B mostra estrutura prevista em <i>Eucalyptus</i> , onde e possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes.....	49
Figura 14 - Gel agarose 1% com amplificação obtida com os “primers” descritos na (Tabela 6). .....	51
Figura 15 - Identificação de um SNP A/G no “primer” B2, atraves de alinhamento de quatro sequencias.....	53

# 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui cerca de 900 espécies e subespécies a maioria nativa da Austrália (Brooker e Kleinig, 2006), com exceção de *E. urophylla* e *E. deglupta* que são originais do Timor e Papua Nova Guiné, respectivamente (Pryor, 1985). É um gênero florestal de interesse econômico plantado comercialmente nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Hoje, o eucalipto assume grande importância na economia brasileira, sendo destinado principalmente à produção de celulose, papel e carvão vegetal utilizado nas siderúrgicas. O eucalipto também é muito utilizado na produção de lâminas, compensados, aglomerados, madeira serrada, móveis, além de outros produtos como o óleo essencial utilizado em produtos de limpeza, alimentos, perfumes e remédios e o mel produzido a partir do pólen de suas flores.

Segundo o relatório de março de 2011 da BRACELPA a produtividade média de madeira para celulose entre os anos de 1980 a 2009 sofreu um aumento de 24 para 44m<sup>3</sup>/ha/ano que representa um crescimento de 83%, e ainda indica que o país tem potencial para chegar à produtividade média de 70 m<sup>3</sup>/ha/ano (BRACELPA, 2011). A produção de celulose apresentou um aumento de 5,6% do ano de 2009 para o ano de 2010, chegando a atingir a marca de 14 milhões de toneladas em 2010, marca que faz do país o quarto maior produtor de celulose do mundo. As exportações em 2010 chegaram a 6,8 bilhões de dólares com um saldo comercial de 4,9 bilhões, gerando 115 mil empregos diretos e 575 mil empregos indiretos (BRACELPA, 2011). Esse crescimento é devido a vários fatores ambientais como o clima e o solo e também a investimentos em pesquisa e desenvolvimento como a genética e a biotecnologia, além de planejamentos sócio-ambientais, manejo

florestal e organização do setor privado, dentre outros. A madeira utilizada na produção de papel é principalmente de eucalipto (81,6%) e pinus (17,2%) (BRACELPA, 2011).

No Brasil, os produtores de eucalipto sempre se preocuparam com a inclusão de espécies e populações diferentes do gênero, para aumentar a diversidade dessa cultura e isso possibilitou ao país possuir hoje um dos maiores bancos de germoplasma do gênero *Eucalyptus* do mundo, sendo o mais diverso fora dos locais de origem dessas espécies.

Em climas tropicais, como no Brasil, as espécies mais plantadas são *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. saligna* (SBS, 2011). O híbrido conhecido como *E. urograndis* é originado do cruzamento entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla*, também é muito utilizado pelas empresas brasileiras. O eucalipto apresenta uma série de características que fizeram deste gênero a planta exótica mais plantada no Brasil, isso inclui capacidade de adaptação às condições ambientais e rápido crescimento.

O crescimento da atividade florestal levou à necessidade de expandir cada vez mais as fronteiras silviculturais levando a ocupação de solos de menor fertilidade, como os do cerrado. Os solos do cerrado se caracterizam principalmente pelo alto grau de intemperização, baixo pH e baixo teor de matéria orgânica, o que leva a classificação destes solos como de baixa fertilidade. Portanto, deficiências nutricionais nas culturas instaladas em solos de cerrado sem manejo adequado são comuns. Dentre os micronutrientes de maior importância, o Boro é, juntamente com o Zinco, são os micronutrientes que tem apresentado sintomas mais frequentes de

deficiência em plantios florestais (Novelino et al, 1982) e tem merecido justificável atenção por parte de pesquisadores.

Sendo a deficiência de B uma das mais comuns entre todos os micronutrientes, a fertilização parece ser uma alternativa para a manutenção e/ou aumento da produtividade de culturas implantadas em solos com este problema. Mas o alto custo da fertilização corretiva e de manutenção tem levado a exploração da variabilidade genética natural entre e dentro de espécies com o objetivo de selecionar materiais mais tolerantes a esta situação.

Desta forma, há a necessidade de identificar características adaptativas que aumentem as chances de sobrevivência das plantas nessas condições e introduzi-las no programa de melhoramento do gênero.

### ***1.1 O Boro na planta***

Loomis & Durst (1992) fazem uma revisão sobre as primeiras citações de exigência de B em plantas vasculares, dando o mérito do primeiro trabalho sobre a essencialidade de B para Warrington em 1923. Somente em 1980 foi teorizada a sua essencialidade, que seria devida a evolução das plantas vasculares, tendo o B um papel primário na biossíntese de lignina (Power & Woods, 1997). Dentro do reino vegetal, embora o B seja importante na nutrição de plantas, sua exigência difere grandemente, sendo essencial para o desenvolvimento de mono e dicotiledôneas, coníferas, mas não para fungos e algumas algas (Shelp, 1993).

Os nutrientes inorgânicos requeridos pelas plantas podem ser fornecidos aos tecidos em crescimento pelo xilema através da água da coluna de transpiração, ou pelo floema, associado ao movimento de escoamento de solutos inorgânicos da



fonte em direção aos tecidos. A razão de suprimento de nutrientes inorgânicos para tecidos em crescimento é um determinante primário da planta em desenvolvimento, sendo que o suprimento insuficiente resulta em redução na taxa de crescimento, o aparecimento de sintomas de deficiência e perda de produtividade. A relativa contribuição do transporte realizado no floema e xilema para o suprimento de nutrientes varia de espécie para espécie e dentro de espécie, diferindo para cada elemento (Brown et al, 1999). Os elementos Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Enxofre (S) e Magnésio (Mg) são prontamente transportados no xilema ou no floema, enquanto o Cálcio (Ca) e, em muitas espécies, o Boro (B) têm mobilidade limitada e apenas podem ser suprido em tecidos em crescimento pelo xilema (Malavolta & Kliemann, 1985).

O transporte de nutrientes como o N, por exemplo, também está entre as funções dos carboidratos, que pode fazer parte da própria molécula de carboidrato, passando a ser denominado de amina. Já o transporte de B é feito na forma de complexação e, com a possível exceção do carbono (C), B tem a mais interessante e diversa química de qualquer outro elemento (Power & Woods, 1997).

Shelp (1988) relatou que a concentração de B na seiva do xilema de plantas de brócolis diminuiu para a metade quando o B não foi aplicado, ou foi removido após um período de suprimento adequado, enquanto que a concentração no floema não foi afetada, desaparecendo o gradiente de concentração entre os tecidos maduros e as folhas-dreno jovens. O autor concluiu que, quando o B esteve em concentrações abaixo da ideal para a espécie, ele é retranslocado das folhas fonte, através da corrente do floema, suprimindo as folhas em desenvolvimento e a inflorescência.

Uma importante propriedade do ácido bórico (forma como o boro é absorvido) está na habilidade de formar complexos cis-diol (forma com o ácido bórico é translocado na planta) com uma variedade de moléculas orgânicas, como polióis (manitol, sorbitol, glicerol e dulcitol), ribose, apiose, NAD e frutose (Hu & Brown, 1997). A possível causa para a eficiência ou deficiência a pouca disponibilidade de B pode ser a presença ou não de alguns destes compostos, o que poderia explicar a diferença na concentração do elemento entre tecidos juvenis e maduros.

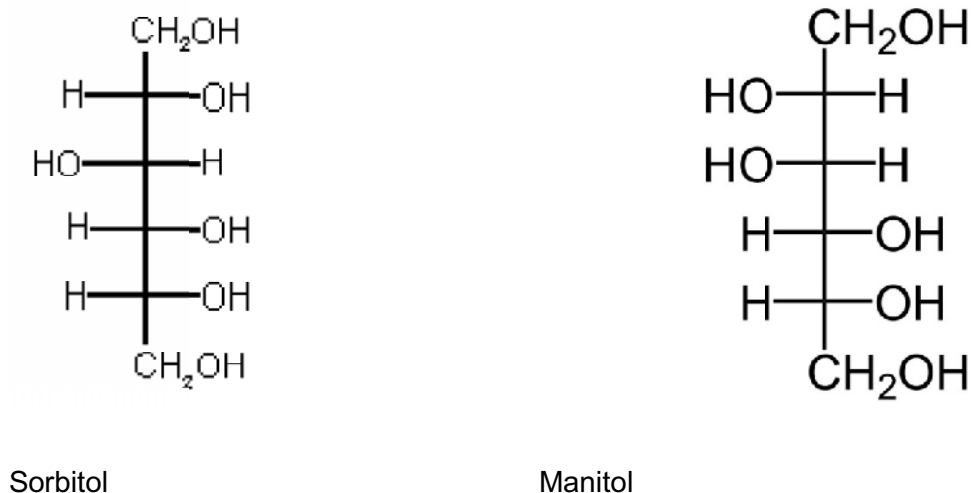
### **1.2 Polióis**

As plantas são capazes de produzir todo material orgânico requerido para seu crescimento, metabolismo e reprodução a partir de moléculas inorgânicas muito simples obtidas da atmosfera e do solo. Através da energia solar, moléculas inorgânicas, principalmente CO<sub>2</sub>, fosfato e nitrato ou amônia são incorporados a biomoléculas como triose fosfato e aminoácidos. Estas moléculas são então utilizadas na célula para respiração ou para a construção de biomoléculas mais complexas como carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos são requeridos para o crescimento e metabolismo. Em espécies agrícolas, a incorporação de carbono fixado na forma de carboidratos é particularmente importante determinando a produção vegetal (Madore, 1994).

Entre os carboidratos estão os polióis ou polihidroxi álcoois ou ainda açúcares-álcoois, que estão provavelmente presentes em todas as espécies de plantas, mas apenas em relativamente poucas famílias estes compostos são sintetizados a partir de carbono fixado fotossinteticamente nas folhas (Loesher, 1987). Bielecki (1982) calculou que acima de 30% do carbono fixado por algumas plantas está na forma de polióis. Os polióis mais comuns são derivados de açúcares hexoses nos quais o grupo aldose ou ketose é reduzido em um grupo hidroxila. Desta forma, manitol,

sorbitol (ou glucitol) e dulcitol (ou galactitol) são polióis equivalentes das hexoses glicose, frutose e galactose, respectivamente (Figura 1), e são os mais freqüentes hexitóis em angiospermas (Noiraud et al, 2001).

Em espécies que translocam polióis, tecidos vegetativos tais como pecíolos, folhas, caule e raízes podem acumular polióis, mas não há evidências de que isto ocorra por síntese direta, mas possivelmente devido ao transporte realizado pelo floema. Açúcares e polióis carregam de 60 a 95% do carbono transportado e tem uma concentração total acima de  $180 \text{ mg mL}^{-1}$  (Hendrix, 1994).



**Figura 1** - Estrutura dos polióis mais comumente encontrados em plantas.

Existe uma variação genética entre espécies para a produção de polióis. Dulcitol, manitol, sorbitol e inositol são encontrados em espécies de diferentes famílias. Dulcitol pode ser encontrado em *Lauraceae* (Bourne, 1958), *Celestraceae* e *Scrophulariaceae* (Noiraud et al, 2001). Sorbitol é comum em *Rosaceae* tais como em macieiras, pereiras, pessegueiros e ameixeiras (Loescher, 1987), podendo ser também encontrados em *Plantaginaceae* (Noiraud et al, 2001). Manitol é o hexitol mais amplamente distribuído e está presente em mais de 100 espécies de plantas

superiores distribuídas entre várias famílias incluindo *Platanaceae*, *Rosaceae* (Bourne, 1958) e *Rubiaceae* (Bielecki, 1982).

Polióis, como outros açúcares, têm outras importantes funções em vários organismos. Manitol é o poliol mais abundante na natureza, ocorrendo em bactérias, fungos, líquens e muitas espécies de plantas vasculares (Everard et al, 1994). Este é o mais importante fotoassimilador participando na translocação e estoque de metabólitos (Priestley, 1977) e proporcionando às plantas resistência a salinidade e ao estresse osmótico (Yamamoto et al, 1997) bem como a invasão de patógenos (Stoop et al, 1996).

Sorbitol é conhecido por ser o produto de transporte primário de fotossíntese em muitas frutíferas comuns (Loescher, 1987). Em algumas espécies, tais como macieiras e ameixeiras, sorbitol apresenta aproximadamente as mesmas concentrações que sacarose (Bollard, 1970).

### **1.2.1 Polióis e a Mobilidade de Boro**

Desde 1949 já foi sugerido por Berger que B exerceria uma importante função na translocação de açúcares. Para Dugger (1983), este elemento estaria envolvido em muitas vias metabólicas devido a formação de complexos com uma variedade de moléculas hidroxiladas.

Na maioria das espécies de plantas a distribuição de B entre os órgãos e os sintomas de deficiência e toxidez deste nutriente indica haver uma restrita mobilidade (Ferreira & Da Cruz, 1991). Entretanto, B está presente no floema e é retranslocado via floema, muitas vezes em quantidades insuficientes para suprir a demanda de regiões em desenvolvimento que não prontamente respiram. Já, em

espécies que produzem quantidades significantes de polióis nas folhas, B é prontamente retranslocado. Boro é o único entre os elementos essenciais para as plantas que tem mobilidade restrita em algumas espécies e é livremente móvel em outras. Nenhum outro elemento é conhecido por variar tanto quanto a mobilidade (Brown & Shelp, 1997).

Recentemente tem sido demonstrado que a mobilidade de B varia grandemente entre espécies. As diferenças na base bioquímica destas espécies resultam em efeitos fisiológicos e conseqüências agronômicas já bem descritas por Brown & Shelp (1997). Existem evidências sugerindo que o principal fator que confere mobilidade de B no floema para espécies de plantas é a síntese de polióis, levando a um subseqüente transporte do B na forma de complexo B-poliol do floema para tecidos drenos (Hu et al, 1997).

A demonstração da ocorrência de mobilidade no floema de complexos B-poliol fornece uma explicação de como ocorre a mobilidade deste nutriente no floema de espécies como aipo e pessegueiro (Brown & Shelp, 1997). Reforçando a hipótese de mobilidade de B através da complexação, Brown & Hu (1996) encontraram que, em espécies em que o sorbitol é o poliol em maior quantidade (espécies ricas em sorbitol), o B é móvel, enquanto que em espécies com baixas quantidades de sorbitol (espécies pobres em sorbitol) o elemento é essencialmente imóvel. Sorbitol é conhecido por formar complexos estáveis 1:2 (B:sorbitol) devido ao arranjo favorável em zig-zag do 2-,3- e 4-hidroxilas. A estabilidade do complexo com sorbitol excede a do complexo 3,4,3',4' manitol (Makkee et al, 1985; Nose & Zenki, 1991). Hu et al (1997) identificaram o complexo 3,4- manitol - B - 3',4' - manitol na seiva de floema de aipo e complexos similares de sorbitol e frutose a partir de néctar floral de pessegueiro.

A comprovação da importância do sorbitol na mobilidade do B foi dada por Brown et al (1999). A obtenção de plantas de tabaco geneticamente modificadas para maior produção de sorbitol por parte destes pesquisadores demonstrou que estas apresentaram significativo aumento da mobilidade de B, altura de plantas e produtividade em relação às plantas controle quando tratadas com baixos teores de B ou interrupção do fornecimento do elemento. Experimentos com B verificaram ainda que o B é móvel em floema de plantas transgênicas, mas imóvel em plantas controle (Brown et al, 1999). Leite (2003) isolou em folhas jovens de eucalipto os polióis sorbitol e manitol, os resultados dão indicativos que o B apresenta mobilidade condicional em *Eucalyptus*.

A compreensão dos mecanismos de transporte de Boro a nível molecular avançou muito nos últimos anos (Takano et al. 2008). Dois diferentes tipos de transportadores, BOR1 e NIP5;1 foram identificados em *A. thaliana* como moléculas requeridas para a eficiente absorção e transporte de B em condições limitantes (Takano et al. 2002, Takano et al. 2006).

### **1.3 Funções do Boro nas plantas**

Desde que Warington (1923) comprovou a essencialidade do elemento B para as plantas até o momento muitas hipóteses têm sido levantadas sobre suas funções dentro das plantas. Já em 1957, Skok discutia a possibilidade de que o B seria requerido pela planta não apenas para síntese de parede celular, mas também para outras funções fisiológicas básicas. Loomis & Durst (1992) concluíram que a rápida resposta do alongamento do tubo polínico para a remoção do B no meio de cultura indica que a função do B não está envolvida nem com síntese de proteína nem com

metabolismo de ácido nucléico, como havia sido postulado por Parr & Loughman (1983), mas muito provavelmente a função do B seja a união de paredes celulares.

Deficiência de B produz uma ampla variedade de sintomas levando a formulação de muitas hipóteses sobre suas funções, mas sua verdadeira função ainda é um enigma (Loomis & Durst, 1992). Muitas das hipóteses foram baseadas em observações das anormalidades causadas pela ausência de B no meio de cultura. As anormalidades podem ser o resultado de uma função primária do elemento ou meramente a consequência secundária de um efeito primário (Matoh, 1997). Os efeitos da deficiência do B incluem rápida inibição do crescimento meristemático, interrupção da formação da parede celular, rompimento da membrana e prejuízo de sua função, metabolismo alterado de fenóis, metabolismo alterado da auxina, alteração do metabolismo de RNA, DNA e outros (Brown & Hu, 1997).

Yamada (2000) resume as funções do B, efeitos fisiológicos e sintomas de deficiência observados nas plantas. Os sintomas característicos da deficiência de B, como a inibição de crescimento, a morte de gema apical, a necrose marginal das folhas e a perda de produtividade de grãos, seriam consequências finais das funções básicas do B, que, segundo o autor seriam a síntese de parede, a integridade de membrana, o metabolismo de fenóis, a lignificação e o crescimento reprodutivo. Mas outros pesquisadores têm defendido que a função do B se limita mais à parede celular.

Cerca de 95 a 98% do B total estão ligados à parede celular, em condições limitantes de disponibilidade de B, deixando somente uma pequena fração que possivelmente pode estar envolvida em outras funções da planta (Matoh et al., 1992). Em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Hu & Brown (1994) descrevem

que o B encontrado na parede celular correspondeu à cerca de 97% e 64% do B celular total, sob condições de deficiência e suficiência respectivamente. Porém, segundo Parr & Louglunan (1983), as frações de B na parede não são a razão para a essencialidade de B.

Hu & Brown (1994) propuseram uma função fundamental do B na estrutura física da expansão da parede celular. Eles encontraram que o B está localizado principalmente na parede, associado com a pectina. Um complexo B-pectina (B-ramnogalacturona II ou B-RGII) com a parede celular foi isolado e caracterizado por vários autores (Ishii & Matsunaga, 1996; Kobayashi et al., 1996; O'Neil et al., 1996) e sua importância na regulação da razão de crescimento celular foi descrita por O'Neil et al. (1996).

A redução na elasticidade da parede celular em raiz de *Curucubita pepo* imediatamente após a transferência de plantas para solução com ausência de B também foi relatada por Findeklee & Goldbach (1996). Isto sugere uma função de B na ligação de macromoléculas na parede celular. Entretanto, durante o decorrer do tempo do experimento, eles não observaram danos no turgor, sugerindo que o B primeiramente afeta as propriedades físicas da parede e que o rompimento da membrana é um efeito secundário.

Kobayashi & Match (1997) propuseram que a determinação da localização de B na célula parece ser um pré-requisito para a identificação das suas funções, porém esses lugares onde se encontra o ácido bórico pode ser meramente uma consequência de sua ligação di-éster com grupos cis-diol de açúcares e fenóis. A maior parte do B solúvel ocorre no apoplasto, exceto em condições de toxidez, porém isto não exclui um possível envolvimento de B em reações metabólicas no



simplasto e uma possibilidade de transporte via floema em algumas espécies (Matoh, 1997).

Diferenças no requerimento e na sensibilidade a baixos teores de B no solo entre espécies de plantas têm sido relatado (Novelino et al, 1982; Blamey et al, 1984). Dicotiledôneas são conhecidas como espécies de maior requerimento de B do que as monocotiledôneas. A variação genotípica dentro de espécies pode muitas vezes ser tão ampla que o “ranking” de espécies quanto à eficiência ao B pode mudar com a comparação de genótipos (Rerkasem & Jamjod, 1997). Por exemplo, a ordem de eficiência ao B entre *Glycine max*, *Vigna radiata* e *Vigna mungo* foi alterada pela seleção de diferentes genótipos por comparação (Rerkasem et al., 1993a). Para o trigo (*Triticum aestivum*), uma ampla variedade de eficiência de B foi reportada (Rerkasem et al., 1993b).

Pesquisas realizadas em espécies do gênero *Eucalyptus* revelaram que estas respondem de diferentes maneiras a diferentes tratamentos de concentração de B, indicando a existência de um fator genético agindo para maior ou menor necessidade deste micronutriente para seu metabolismo. Novelino et al. (1982), estudaram o efeito de cinco níveis de boro em solução nutritiva sobre o crescimento de mudas de *Eucalyptus camaldulensis*, *Corymbia citriodora*, *E. grandis* e *E. paniculata*, e observaram que a altura e produção de matéria seca total nas plantas que não receberam o nutriente foram maiores para *E. camaldulensis*, seguido por *E. grandis* e *C. citriodora* e por último *E. paniculata*. Estas diferenças entre espécies dão um grande indício de que há um fator genético controlando as variações observadas. Diversos trabalhos sugerem que a mobilidade de B se faz através da complexação do elemento B com os polióis sorbitol e manitol (Nose & Zenki, 1991; Brown & Hu, 1996; Brown & Shelp, 1997; Hu et al., 1997).

O controle genético da eficiência ao B tem sido estudado em várias espécies, sendo reportado como monogênico por alguns autores. Em espécies como aipo, tomate e beterraba o controle genético têm se mostrado monogênico. Em girassol, o controle genético para concentração de B foliar, sintomas de deficiência e produtividade de grãos mostrou ter ação predominantemente aditiva ou epistática e apresentavam alta herdabilidade (Rerkasem & Jamjod, 1997). O mesmo tipo de herança (aditiva ou epistática) foi determinado por Blamey et al (1984) também para girassol para eficiência de absorção de B.

A herança simples encontrada para alguns caracteres relacionados ao B na maioria das espécies estudadas teria como consequência a maior facilidade de obtenção de material genético tolerante a solos que naturalmente apresentam teores reduzidos deste nutriente. Isto, obviamente, levaria a maior produtividade e menor custo de produção em menor tempo de pesquisa.

Existe um forte investimento no país para o melhoramento genético desse gênero florestal, porém o longo tempo necessário para a realização de um ciclo de melhoramento o torna um dos fatores limitantes. Daí a importância da incorporação de novas ferramentas que possibilitem reduzir esse tempo, como é o caso da aplicação de biotecnologia para melhorar a qualidade e aumentar a produtividade da madeira a cada ciclo de seleção.

A utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, dentre outros fatores, permite uma avaliação prévia de indivíduos superiores, otimizando o processo de seleção dentro dessas espécies, além de possibilitar o estudo de caracterização de genótipo de indivíduos a partir de células e tecidos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Ferreira & Grattapaglia,

1998). A perspectiva de tornar a seleção mais eficiente faz com que o melhoramento de espécies florestais seja uma das áreas que mais solicita o uso desta tecnologia.

Já foram desenvolvidos vários marcadores moleculares de interesse em diversas espécies vegetais (Junghans, 2000; Moretzsohn et al., 2000; Martins Filho et al., 2002; Benko-Iseppon et al., 2003), em *Eucalyptus grandis* foi identificado com sucesso gene de resistência a *Puccinia psidii* Winter (Junghans et al., 2003) onde foi construído um grupo de ligação com o gene de resistência e marcadores a ele flanqueados. Estes marcadores podem ser utilizados em programas de melhoramento possibilitando a seleção precoce de indivíduos portadores do gene de interesse.

#### **1.4 Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)**

SNP é uma variação do DNA que ocorre quando um único nucleotídeo – A, T, C, ou G – no genoma difere entre membros de uma espécie, ou entre pares de cromossomos de um indivíduo. Por exemplo, duas seqüências de um fragmento de DNA de diferentes indivíduos, AGTGCCTGA e AGGTCTGA; contém uma diferença em um único nucleotídeo. Neste caso diz-se que existem dois alelos: C ou T. Esses marcadores denominados bialelicos devido ao fato de que, geralmente, apenas dois alelos são observados. (Brookes, 1999).

SNPs são a forma mais freqüente de variação genética em genomas de vertebrados e invertebrados; são codominantes e de fácil detecção quando comparados, por exemplo, com microssatélites (Taillon-Miller et al., 1998). São gerados por substituições de uma única base ou pequenos eventos de deleção/inserção, ocorrendo a uma taxa muito baixa de aproximadamente  $10^{-7}$  alterações por sítio por geração, ou menos. SNPs podem estar presentes dentro de

seqüências codificantes, regiões de genes não codificantes, ou em regiões intergênicas. Como apenas uma pequena porcentagem dos genomas codifica proteínas, a maior parte deles localiza-se fora do DNA codificador. SNPs localizados dentro desta região têm particular importância porque é mais provável que as variações tenham um significado funcional, em nível do fenótipo. Entretanto, SNPs de seqüências codificantes não necessariamente acarretarão em mudanças na seqüência de aminoácidos de uma proteína que é produzida, devido à degeneração do código genético (Hammer, 1995).

Um SNP em que ambas as formas levam à mesma seqüência de polipeptídios é denominado sinônimo. Embora SNPs sinônimos não alterem a seqüência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro, e conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida. Se uma seqüência diferente de polipeptídios é produzida eles são não-sinônimos, neste caso, a substituição pode ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. SNPs localizados em regiões não codificantes do genoma ou em sítios sinônimos em regiões codificantes sem impacto direto no genoma fornecem ferramentas de grande utilidade para estudos de evolução e genética de populações. Enquanto que, SNPs de sítios não sinônimos que podem alterar a estrutura e a função das proteínas codificantes, representam marcadores alvo para se identificar variações genéticas associadas com características fenotípicas complexas (Hammer, 1995).

A descoberta de SNPs que afetam a atividade biológica tem se tornado cada vez mais importante e vem sendo facilitada pela disponibilidade de um vasto mapeamento. Os métodos de detecção de sítios únicos são, potencialmente, mais fáceis de automatizar e de aplicar na análise genética em larga escala. Deste modo,

a informação gerada sobre os SNPs pode ser, posteriormente, utilizada em vários níveis nas análises do DNA como: marcadores no mapeamento genético; material de estudo na identificação de SNPs funcionais e seu respectivo fenótipo; ferramenta para estudos populacionais, por comparação do genoma de indivíduos de diferentes populações (Zhang & Hewitt, 2003).

### **1.5 Diversidade nucleotídica e haplótipos de SNP**

A variabilidade genética, sendo ela de ocorrência neutra ou seletiva, pode gerar variações na composição dos organismos. A fonte desta variabilidade é uma alteração súbita e herdável no material genético, caracterizada como mutação. Quando estas são localizadas e alteram apenas poucas bases, são chamadas de mutações de ponto, ou mutações gênicas. Por outro lado, se as mesmas alterarem muitas bases ou até cromossomos inteiros, são chamadas de mutações ou aberrações cromossômicas. Segundo Nei e Li (1979), uma das estimativas levando em conta a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) é representada pela fórmula,

$$\pi = \sum_{ij}^q x_i x_j d_{ij}$$

onde “q” é o número total de alelos, “ $x_i$ ” é a frequência na população (em seqüências) do alelo “i”, “ $x_j$ ” é a frequência na população (em seqüências) do alelo “j” e “ $d_{ij}$ ” é o número de diferenças nucleotídicas ou substituições por sítio entre os alelos “i” e “j”. Resumindo, é o somatório das diferenças de pares de nucleotídeos entre seqüências de uma amostra e depende tanto das frequências quanto do número de sítios polimórficos. Um exemplo para entendimento dos diferentes

parâmetros de diversidade estimados, consideremos um conjunto de 10 seqüências de 11 bases, conforme está indicado abaixo:

```

AGCTTAAATTAG
AGCTTAAATTG
AGCTTAAATTAG
AGTTTAAATTAG
AGCTTAAATTAG
AGCTTAAATTAG
AGCTTAAATTAG
CGCTTAAATTAG
CGCTTAAATTAG
CGCTTAAATTAG
AGCGTAAATTAG

```

Observando estas seqüências temos que:

$$n = \text{número de nucleotídeos} , n = 11$$

$$S = \text{número total de sítios segregantes} = 6$$

$$P_s = \text{número total de sítios segregantes por nucleotídeo} = 6/11 = 0,545$$

Considerando apenas as primeiras quatro sequencias:

```

AGCTTAAATTAG
AGCTTAAATTG
AGCTTAAATTAG
AGTTTAAATTAG

```

A diversidade nucleotídica  $\pi$  é igual a:

$$\pi = (1 / a) \times \Sigma \text{diferenças} / (a \times n) =$$

$$\pi = \frac{1}{4} \times (12 / (4 \times 11)) = 0,06818$$

onde

$$n = \text{número de nucleotídeos} , n = 11$$

a = tamanho da amostra (número de seqüências) = 4

O conceito de haplótipo está intimamente relacionado à diversidade nucleotídica, e tem como significado, o padrão de associação de SNPs que são herdados conjuntamente, isto é, segregam conjuntamente e caracterizam um grupo, espécie ou população.

Hoje, a tecnologia disponível e a emergência de ferramentas de genotipagem de alta resolução têm acelerado o desenvolvimento de um grande número de programas de pesquisa, gerados a partir de projetos genoma, incluindo ferramentas de genotipagem “high-throughput” para identificar polimorfismos de único nucleotídeo (Syvanen, 2001). Isto os tem tornado marcadores genéticos de escolha para o mapeamento de alta-resolução, genética de populações e estudos de associação alélica (Botstein & Risch 2003).

### **1.6 Genes Candidatos**

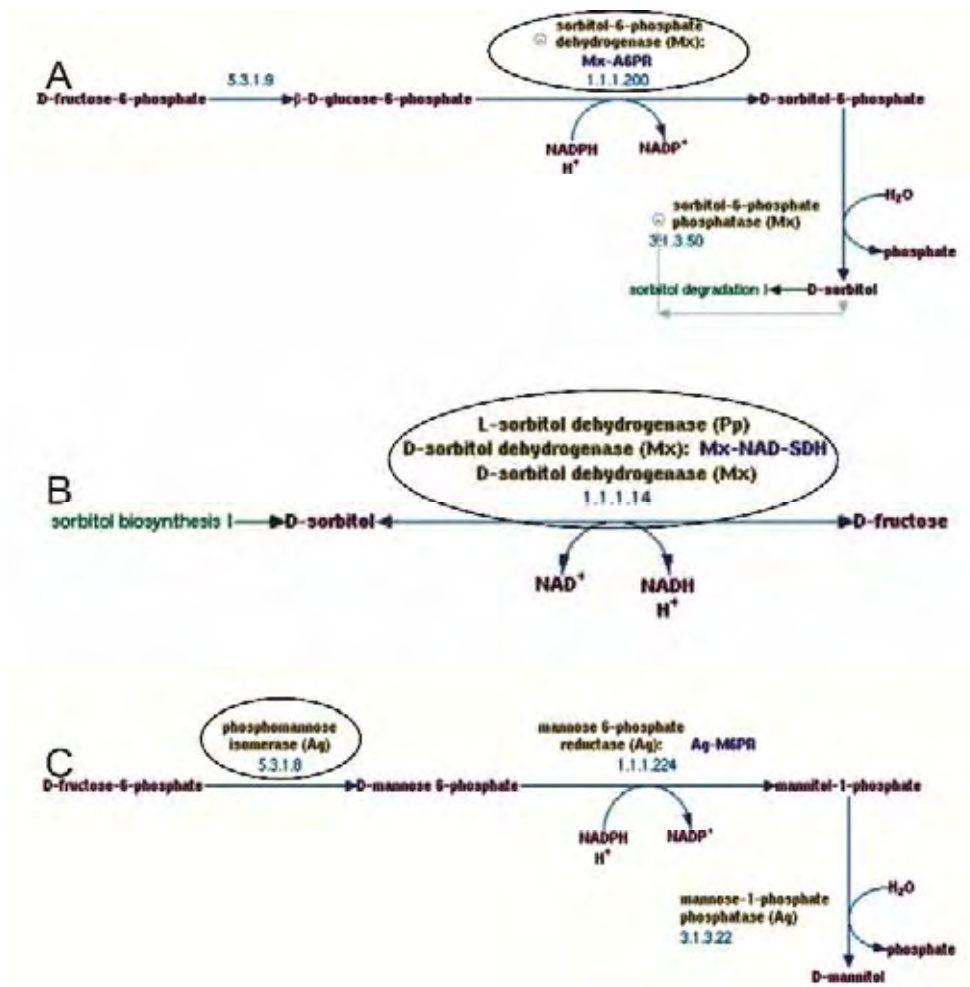
Foram escolhidos para este trabalho cinco genes candidatos três deles relacionados à produção e/ou degradação de sorbitol e manitol e dois transportadores de raiz responsáveis pela captação de boro via xilema. Sendo estes: Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, enzima responsável pela penúltima etapa da via de produção do Sorbitol (Figura 2A), Sorbitol dehydrogenase, enzima responsável pela degradação do Sorbitol (Figura 2B), Mannose-6-phosphate isomerase (phosphomannose isomerase) enzima responsável pelo primeiro passo na via de produção do manitol (Figura 2C).

BOR1 é um transportador de ácido bórico através do carregamento via xilema (Takano et al. 2002), sendo identificado um mutante do gene BOR1-1 em *A.*

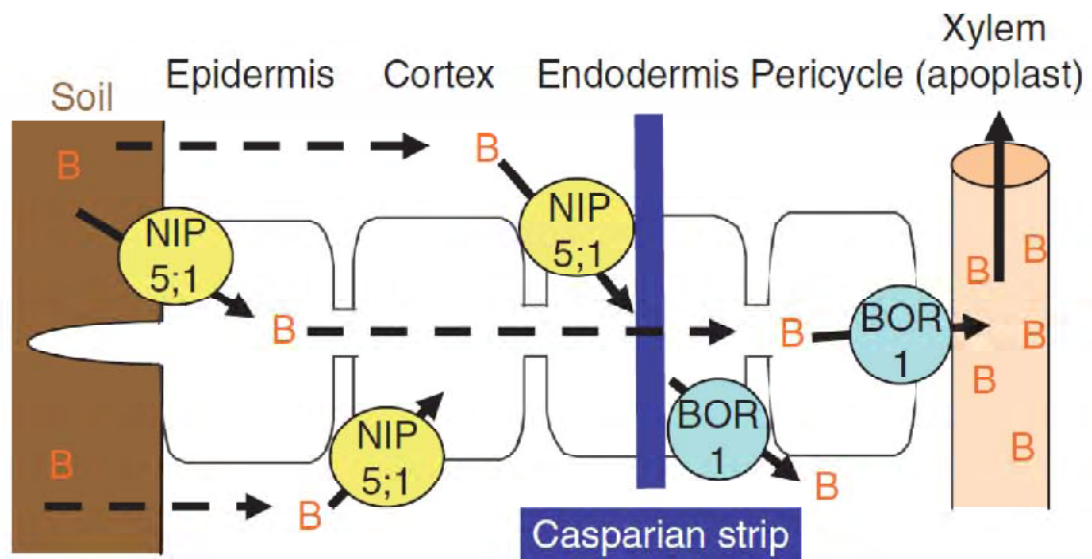
*thaliana*. O mutante BOR1-1 exibe severa inibição do crescimento e tem fertilidade reduzida em limitação das quantidades de B (Noguchi et al. 1997) sendo deficiente na captação de B da raiz para a planta (Noguchi et al. 2000). A super expressão de BOR1, resultou na melhora do crescimento da planta e fertilidade sob condições de deficiência ao B (Miwa et al. 2006).

O transportador NIP5;1 é um membro da família de proteínas MIP (major intrinsic protein) e pertence a subfamília NIP (nodulin 26-like intrinsic protein) sendo identificado em *A. Thaliana* como um canal de ácido bórico requerido para o crescimento da planta sob condições de limitação de B (Takano et al. 2006). As proteínas MIPs são canais de água ou de pequenas moléculas não carregadas (Wallace et al. 2006 ). Em condições limitantes de B, a NIP5;1 faz a regulação positiva dos níveis de mRNA e mutantes NIP5;1 exibem severa redução do crescimento da planta e raiz. A interação dos dois transportadores pode ser vista na Figura 3.





**Figura 2** - Rota metabólica da produção do sorbitol Figura 2A, onde está localizada a Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, enzima responsável pela penúltima etapa da via de produção do Sorbitol, Figura 2B Rota metabólica da degradação do sorbitol onde se se encontra a enzima Sorbitol dehydrogenase, responsável pela degradação do Sorbitol, Figura 2C rota metabólica onde se encontra a enzima manitol Mannose-6-phosphate isomerase (phosphomannose isomerase) enzima responsável pelo primeiro passo na via de produção do manitol. (Imagens obtidas em: <http://metacyc.org/>)



**Figura 3** - Modelo de transporte de Boro em raízes *Arabidopsis thaliana*, submetidas a limitação de boro, Sob Limitação de B, NIP5;1 aumenta a permeabilidade do ácido bórico às membranas celulares, e facilita fluxo de B do solo pelas células da raiz. BOR1 Exporta B para o xilema e para fora das células de acordo com um gradiente de concentração. Quando em altas concentrações de B, a expressão de NIP5;1 e BOR1 é regulada por mecanismos transcricional e pós transcricional respectivamente, sendo que a regulação negativa de NIP5;1 e BOR1 pode ser benéfica para evitar a toxicidade em casos de altas concentrações de B. (Figura adaptada de Miwa e Fujiwara, 2010).

Diante disso o Centro de Análises Genômicas (CAGEN) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu - SP, em parceria com a empresa FIBRIA, desenvolveu este projeto que visa à busca de marcadores moleculares em genes candidatos para a característica de tolerância ao déficit de B.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Identificação de SNPs em genes candidatos relacionados à síntese e degradação do manitol e sorbitol e dos transportadores BOR1 e NIP5;1 em eucalipto.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificação, desenho de "primers", sequenciamento e validação para confirmar a região amplificada de genes específicos relacionados com a translocação e absorção de boro em eucaliptos.
- Identificação dos potenciais SNPs através do sequenciamento direto e alinhamento dos indivíduos.
- Genotipagem de indivíduos utilizando os SNPs encontrados.
- Disponibilizar marcadores que poderão ser utilizados na genotipagem de populações de *Eucalyptus* contrastantes na eficiência ou não eficiência na absorção de Boro.

## **3 Material e Métodos**

### **3.1 Material vegetal**

Para padronização dos "primers" e sequenciamento iniciais foram utilizados quatro indivíduos híbridos formados pelo cruzamento de *E. urophylla* x *E. grandis* conhecido como *urograndis* sem parentesco entre si, já para a procura e ensaios de genotipagem com SNPs foram utilizados 12 indivíduos, sendo seis indivíduos meio irmãos de *E. Urophylla* e seis híbridos formados pelo cruzamento de *E. urophylla* x *E. grandis* sem parentesco entre si. Todos oriundos do programa de melhoramento da empresa FIBRIA.

### **3.2 Procura dos Genes candidatos**

A procura dos genes candidatos sorbitol deidrogenase, phosphomannose isomerase, sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, BOR1e NIP5;1, inicialmente foi realizada em *Arabidopsis Thaliana* em seguida as seqüências de aminoácidos foram utilizadas como referência para procura de seqüências expressas similares no banco de dados de seqüência de ESTs de eucaliptos da empresa FIBRIA, utilizando tBlastx (Altschul et al., 1997), os clusters de maior similaridade com a seqüência de referência foram anotados, em seguida estes clusters foram usados como base para a procura da seqüência completa no banco de dados do genoma completo de eucaliptos disponível em (<http://www.phytozome.net>).

Estas seqüências foram utilizadas para o desenho dos “primers”, que após padronização, foram seqüenciadas para confirmar se as seqüências amplificadas correspondem aos clusters desejados.

### **3.3 Extração de DNA**

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). A qualidade do DNA foi observada em gel de agarose 0,8% a quantificação e pureza foram efetuadas por espectrofotômetro específico NanoDrop® ND-1000, equipamento que fornece automaticamente a concentração do DNA em ng/µl e razões de pureza onde uma razão acima de 1,8 na faixa de absorbância 260/280 nm o DNA é considerado puro sendo também fornecida uma razão secundária onde a razão entre 260/230 nm valores de 1.8 a 2.2 são

considerados para DNA puro. Com estes resultados o DNA foi diluído para uso na concentração de 15 ng/μl.

### ***3.4 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores***

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram construídos para amplificarem produtos em torno de 1000-1200 pb. Utilizando o programa PerlPrimer v1.1.14 (Marshall OJ, 2004). A melhor temperatura de reação para cada oligonucleotídeo foi determinada utilizando-se um termociclador PT-100 (Mj Research, Inc., Watertown, MA, USA).

### ***3.5 Condições de amplificação***

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 32 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a X °C e 1 minuto a 72 °C, onde X (temperatura de anelamento de cada oligoiniciador ). Cada reação foi composta por 30 ng de DNA genômico, 0,3 μM de cada “primer” e concentração final de 1x PCR Máster Mix (produto comercial composto por: 50 units/ml de Taq DNA polymerase em buffer de reação com (pH 8.5), 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>) em um volume final de 10 μl. As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). O fragmento resultante foi visualizado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e comparado com um padrão de peso molecular para confirmação do tamanho do fragmento amplificado.

### ***3.6 Purificação dos produtos de PCR***

Os fragmentos de PCR de cada indivíduo foram purificados por reação enzimática adicionando-se 1,5 µl da enzima ExoSAP IT (GE Healthcare) em 4 µl do produto de PCR, incubadas a 37° C por 45 minutos e a 80° C por 25 minutos. Após purificação o produto da PCR foi quantificado utilizando-se espectrofotômetro específico NanoDrop® ND-1000.

### ***3.7 Reação de Seqüenciamento***

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems®) utilizando-se 2 µl de 2,5 Save Money (400mM Tris-HCl pH 9,0, 10mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 5 pmol dos oligonucleotídeos forward e reverse e produto de PCR purificado suficiente para 400 ng de DNA e H<sub>2</sub>O q.s.p.. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) com os ciclos de temperatura programados para: inicio a 96°C por 2 minutos seguidos de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 6°C até a precipitação. Para cada amostra foram realizadas duas reações, sendo uma para oligonucleotídeo “forward” e outra para o “reverse”.

### ***3.8 Precipitação das reações de seqüenciamento***

Às reações de seqüenciamento foi adicionado 40 µl de isopropanol 75% e incubado a temperatura ambiente (T.A.) por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 4000 rpm por 45 min a T.A. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, foi adicionado 200 µl de etanol 70%

seguida de centrifugação a 4000 rpm por 10 min a T.A. Todo o etanol foi removido com auxílio de micropipeta. As amostras foram secas a T.A. e o produto ressuspensionado em 10 µl de Formamida Hi-DiTM (Applied Biosystems). No momento da aplicação as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min e rapidamente transferidas para o gelo.

### **3.9 Alinhamento das Seqüências e procura de SNPs**

Os eletroferogramas das seqüências “forward” e “reverse” foram utilizados para gerar um consenso entre todos os “forward” e todos os “reverse” de cada “primer”. Quando possível um consenso entre “forward” e “reverse” foi montado, para tanto foi utilizado o programa ChromasPro versão 1.42 (Copyright©2003-2007 Technelysium Pty Ltd). Após o consenso ter sido gerado a seqüência resultante foi confrontada com a seqüência do cluster onde originalmente foi desenhado o “primer” utilizando-se a ferramenta Blast, para confirmar se a seqüência amplificada por PCR tem similaridade com o cluster de origem após esta confirmação foi realizada a identificação visual de potenciais SNPs.

### **3.10 Análise da diversidade**

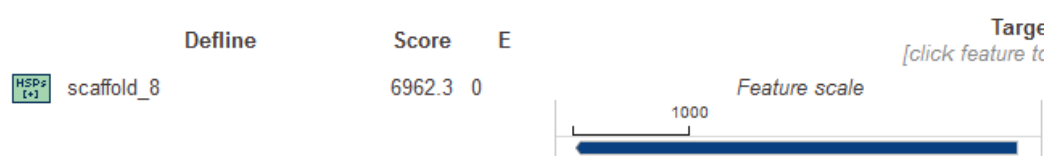
Utilizando o programa DnaSP 5.10 ([www.ub.es/dnasp](http://www.ub.es/dnasp)) (Rozas et al., 2003) foram obtidas as seguintes estimativas: a) Número total de sítios segregantes (S); b) Diversidade nucleotídica  $\pi$  (Nei e Li, 1979; Nei, 1987), o número médio de diferenças nucleotídicas (SNPs, polimorfismos de bases individuais); e haplótipos de SNP.

## 4 Resultado e Discussão

### 4.1 Procura dos genes

#### 4.1.1 Gene BOR1

Foi encontrado um "cluster" similar ao do gene BOR1 de *Arabidopsis thaliana* no banco de dados de seqüência de ESTs de *Eucalyptus* da empresa FIBRIA, indicando que em *Eucalyptus* há seqüências expressas similares ao respectivo gene. Este "cluster" foi utilizado para procura da seqüência completa no banco de dados do genoma completo de *Eucalyptus* disponível em (<http://www.phytozome.net>) retornando como resultado, um agrupamento com 4200 pb com alta similaridade (valor de e-value 0.0). Este agrupamento foi nomeado pelo banco de dados como scaffold\_8 e abrange o mesmo da posição 58896000 a 58900199 (Figura 4).



**Figura 4** – Resultado do Blast do EST similar ao BOR1 contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.

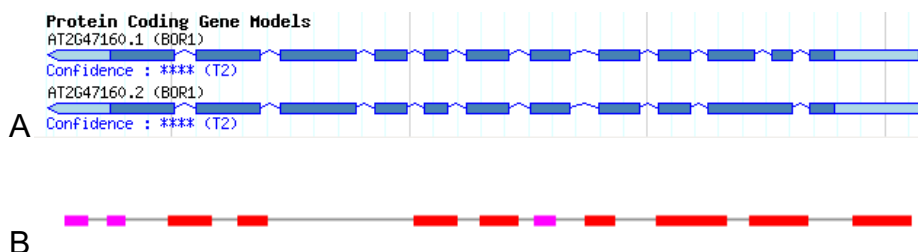
Após ter se obtido a seqüência, a proteína foi predita usando a ferramenta FGENESH do Foftberry disponível em (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), a proteína prevista contém 660 aminoácidos. Esta foi utilizada para a procura por similaridade no GenBank usando a ferramenta tblastn e a mesma retornou resultados com alta similaridade para o gene BOR1 (Tabela1). O alinhamento do EST com a seqüência completa permitiu estimar o número de exons e introns da mesma sendo encontrados 11 exons e 10 introns. Em *A. thaliana* foram observadas



duas versões do gene, uma com 11 exons e 10 introns com estrutura semelhante a prevista em *Eucalyptus* e uma com 12 exons e 11 introns, a duas versão possuem um pequeno intron no exon 10 (Figura 5).

**Tabela 1** - Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene *BOR1*.

Acesso	Descrição	E-Value
<a href="#">NM_001084602.1</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> BOR1 (REQUIRES HIGH BORON 1); anion exchanger/ boron transporter (BOR1) mRNA, complete cds	0.0
<a href="#">NM_180138.2</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> BOR1 (REQUIRES HIGH BORON 1); anion exchanger/ boron transporter (BOR1) mRNA, complete cds	0.0
<a href="#">GU827643.1</a>	<i>Brassica napus</i> boron transporter (BOR1) mRNA, complete cds	0.0



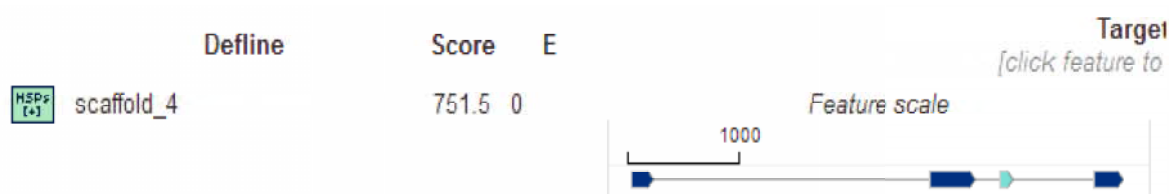
**Figura 5** – figura 5A Representa o loco AT2G47160 (*BOR1*) em *Arabidopsis thaliana* em suas duas versões a superior com 12 exons e 11 introns e a inferior com 11 exons e 10 introns, figura 5B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons observados em uma das versões de *Arabidopsis thaliana* estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes.

Considerando o DNA genômico sem as UTRs o gene em *A. thaliana* apresenta 3048 pb e em *Eucalyptus* 3860 pb sendo está diferença devido principalmente aos introns de *Eucalyptus* serem maiores que os de *A. thaliana*.

#### 4.1.2 Gene NIP5; 1

Foi encontrado "cluster" similar ao do gene NIP5;1 de *Arabidopsis thaliana* no banco de dados de seqüência de ESTs de *Eucalyptus* da empresa FIBRIA, indicando que em *Eucalyptus* há seqüências expressas similares ao respectivo gene. Este "cluster" foi utilizado para procura da seqüência completa no banco de

dados do genoma completo de *Eucalyptus* disponível em (<http://www.phytozome.net>) retornando como resultado um agrupamento com 4900 pb com alta similaridade (valor de e-value 0.0). Este agrupamento foi nomeado pelo banco de dados como scaffold\_4 e abrange o mesmo da posição 40056900 a 40061399 (Figura 6).



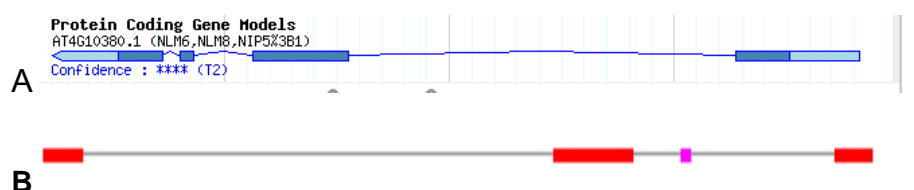
**Figura 6** – Resultado do Blast do EST similar a NIP5;1 contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.

Após ter se obtido a seqüência, a proteína foi predita usando a ferramenta FGENESH do site <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, a seqüência de aminoácidos prevista contem 294 aminoácidos e foi utilizada para uma procura por similaridade no GenBank usando a ferramenta tblastn e a mesma retornou resultados com alta similaridade para o gene NIP5;1 (Tabela 2).

O alinhamento do EST com a seqüência completa permitiu estimar o número de exons e introns da mesma, sendo encontrados quatro exons e três introns, os mesmos números são observados em *A. thaliana* (Figura 7), da seqüência de 4900 pb, 885 pb são referentes a exons.

**Tabela 2** – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene *NIP5;1*.

Acesso	Descrição	E-Value
<a href="#">NM_117106.2</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative aquaporin NIP5-1 (NIP5;1) mRNA, complete cds	3e-143
<a href="#">XM_002276283.2</a>	PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> probable aquaporin NIP5-1-like (LOC100265051), mRNA	6e-148
<a href="#">XM_002317606.1</a>	<i>Populus trichocarpa</i> aquaporin, MIP family, NIP subfamily, mRNA	5e-154



**Figura 7** - Figura 7A Representa o loco AT4G10380 (NIP5;1) em *Arabidopsis thaliana*, figura 7B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porem com introns de tamanho diferentes.

Considerando o DNA genômico sem as UTRs o gene em *A. thaliana* apresenta 1521 pb e em eucalipto 4391 pb sendo está diferença devido principalmente aos introns de *Eucalyptus* serem maiores que os de *A. thaliana*, na qual os exons somam 915 pb.

### 4.1.3 Gene da enzima Sorbitol dehydrogenase

Foi encontrado cluster similar ao do gene Sorbitol dehydrogenase de *Malus domestica* no banco de dados de seqüência de ESTs de *Eucalyptus* da empresa FIBRIA, indicando que em *Eucalyptus* há seqüências expressas similares ao respectivo gene. Este cluster foi utilizado para procura da seqüência completa no banco de dados do genoma completo de *Eucalyptus* disponível em (<http://www.phytozome.net>) retornando como resultado um agrupamento com 2889 pb com alta similaridade (valor de e-value 0.0). Este agrupamento foi nomeado pelo

banco de dados como scaffold\_11 e abrange o mesmo da posição 2624787 a 2627676 (Figura 8).



**Figura 8** – Resultado do Blast do EST similar a sorbitol dehydrogenase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.

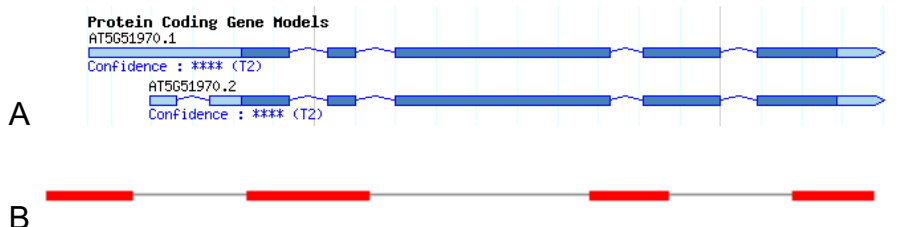
Após ter se obtido a seqüência, a proteína foi predita usando a ferramenta FGENESH do site <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, a proteína prevista contém 290 aminoácidos, esta foi utilizada para uma procura por similaridade no GenBank usando a ferramenta tblastn e a mesma retornou resultados com alta similaridade para o gene da sorbitol dehydrogenase (Tabela 3).

O alinhamento do EST com a seqüência completa permitiu estimar o número de exons e introns da mesma, sendo encontrados quatro exons e três introns, da seqüência de 2889 pb, 873 pb são referentes a exons. Em *A. thaliana* há duas versões para o gene uma com cinco exons e quatro introns e outra com seis exons e cinco introns, neste caso apesar da similaridade encontrada na proteína prevista em eucalipto com a de *Arabidopsis* a estrutura do gene prevista é diferente da existente em *A. thaliana* (Figura 9).

**Tabela 3** – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da sorbitol desidrogenase.

Acesso	Descrição	E-Value
<a href="#">AF370161.1</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative sorbitol dehydrogenase (At5g51970) mRNA, complete cds	0,0
<a href="#">FJ481100.1</a>	<i>Prunus salicina</i> var. cordata NAD-dependent sorbitol dehydrogenase mRNA, complete cds	0,0
<a href="#">AB025969.1</a>	<i>Prunus persica</i> mRNA for NAD-dependent sorbitol dehydrogenase, complete cds	0,0
<a href="#">AY849316.1</a>	<i>Malus x domestica</i> sorbitol dehydrogenase (SDH6) mRNA, complete cds	1e-177

Considerando o DNA genômico sem as UTRs o gene em *A. thaliana* apresenta 1589 pb e em *Eucalyptus* 1982 pb sendo esta diferença devido principalmente aos introns de *Eucalyptus* serem maiores que os de *A. thaliana*, na qual os exons somam 1029 pb.



**Figura 9** – figura 9A Representa o loco AT5G51970 (sorbitol dehydrogenase) em *Arabidopsis thaliana* em suas duas versões a superior com cinco exons e quatro introns e a inferior com seis exons e cinco introns, figura 9B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde e possível observar uma estrutura com quatro exons e três introns, estrutura esta diferente da observada nas duas versões de *A. thaliana*.

#### 4.1.4 Gene da enzima Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (Aldose-6-phosphate reductase)

Foi encontrado cluster similar ao do gene Aldose-6-phosphate reductase de *Malus domestica* no banco de dados de dados de seqüência de ESTs de *Eucalyptus* da empresa FIBRIA, indicando que em *Eucalyptus* há seqüências expressas similares

ao respectivo gene, este cluster foi utilizado para procura da sequência completa no banco de dados do genoma de *Eucalyptus* disponível em (<http://www.phytozome.net>) retornando como resultado um agrupamento com 3150 pb com alta similaridade (valor de e-value 0.0). Este agrupamento foi nomeado pelo banco de dados como scaffold\_9 e abrange o mesmo da posição 23937840 a 23940989 (Figura 10).



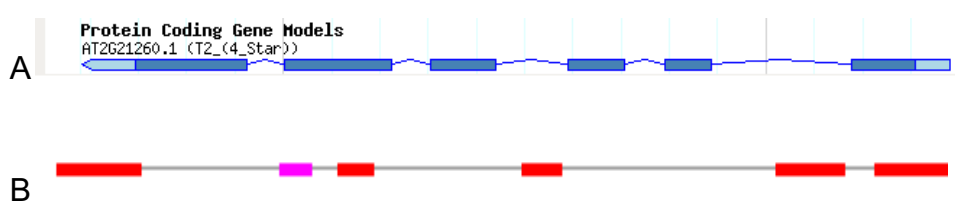
**Figura 10** – Resultado do Blast do EST Similar a Sorbitol\_6\_phosfatase Dehydrogenase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.

Após ter se obtido a sequência a proteína foi predita usando a ferramenta FGENESH do site <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, a proteína prevista contém 357 aminoácidos, esta foi utilizada para uma procura por similaridade no GenBank usando a ferramenta tblastn e a mesma retornou resultados com alta similaridade para o gene da Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (Tabela 4).

O alinhamento do EST com a sequência completa permitiu estimar o número de exons e introns da mesma sendo encontrados seis exons e cinco introns, da sequência de 3150 pb, 1074 pb são referentes a exons (Figura 11).

**Tabela 4** – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase.

Acesso	Descrição	E-Value
<a href="#">XM_002269196.2</a>	PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like (LOC100243586), mRNA	4e-148
<a href="#">NM_127698.3</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> aldose-6-phosphate reductase (NADPH2) (AT2G21260) mRNA, complete cds	5e-146
<a href="#">BT025872.1</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> At2g21260 mRNA, complete cds	6e-147
<a href="#">NM_001253237.1</a>	<i>Glycine max</i> NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like (LOC100806500), mRNA	1e-144



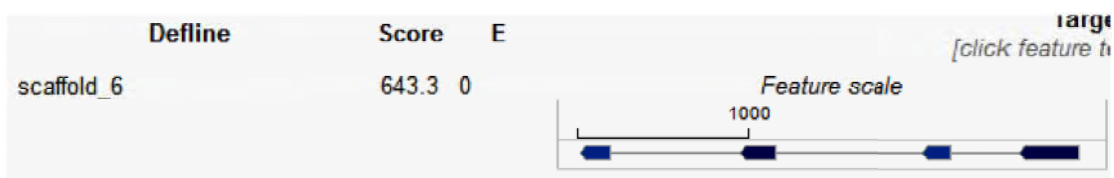
**Figura 11** - figura 11A Representa o loco AT2G21260.1 Sorbitol\_6\_phosfatase Dehydrogenase (aldose-6-phosphate reductase) em *A. thaliana* que apresenta seis exons e cinco introns, figura 11B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porém com introns de tamanho diferentes.

Considerando o DNA genômico sem as UTRs o gene em *A. thaliana* apresenta 1112 pb e em *Eucalyptus* 2894 pb sendo esta diferença devido principalmente aos introns de eucaliptos serem maiores que os de *A. thaliana*, na qual os exons somam 930 pb.

#### 4.1.5 Gene da enzima Mannose-6-phosphate isomerase (Phosphomannose isomerase)

Foi encontrado cluster similar ao do gene Mannose-6-phosphate isomerase de *A. thaliana* no banco de dados de seqüência de ESTs de *Eucalyptus* da empresa FIBRIA, indicando que em *Eucalyptus* há seqüências expressas similares ao respectivo gene, este cluster foi utilizado para procura da seqüência completa no banco de dados do genoma de *Eucalyptus* disponível em (<http://www.phytozome.net>) retornando como resultado um agrupamento com 3900 pb com alta similaridade (valor de e-value 0.0) este agrupamento foi nomeado pelo

banco de dados como scaffold\_6 e abrange o mesmo da posição 34607500 a 34611399 (**Figura 12**).



**Figura 12** – Resultado do Blast do EST similar a Mannose-6-phosphate isomerase contra o genoma completo, este foi utilizado para estimar o gene completo.

Após ter se obtido a seqüência a proteína foi predita usando a ferramenta FGENESH do site <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, a proteína prevista contém 439 aminoácidos e foi utilizada para uma procura por similaridade no GenBank usando a ferramenta tblastn a mesma retornou resultados com alta similaridade para o gene da Mannose-6-phosphate isomerase (**Tabela 5**).

O alinhamento do EST com a seqüência completa permitiu estimar o número de exons e introns da mesma sendo encontrados cinco exons e quatro introns, da sequencia de 3900 pb, 1320 pb são referentes a exons (Figura 13).

**Tabela 5** – Alguns resultados do tblastn, usando a proteína prevista para gene da Mannose-6-phosphate isomerase.

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>E-Value</b>
<a href="#">NM_111125.3</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> mannose-6-phosphate isomerase (MEE31) mRNA, complete cds	0.0
<a href="#">XM_002283890.1</a>	PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> mannose-6-phosphate isomerase-like (LOC100263511), mRNA	0.0
<a href="#">XM_002526947.1</a>	<i>Ricinus communis</i> mannose-6-phosphate isomerase, putative, mRNA	0.0
<a href="#">XM_003541272.1</a>	PREDICTED: <i>Glycine max</i> mannose-6-phosphate isomerase-like (LOC100792369), mRNA	0.0





**Figura 13** – figura 13A Representa o loco AT3G02570 (Mannose-6-phosphate isomerase) em *A. thaliana* que apresenta cinco exons e quatro introns, figura 13B mostra estrutura prevista em *Eucalyptus*, onde é possível observar o mesmo número de introns e exons estrutura esta semelhante porém com introns de tamanho diferentes.

Considerando o DNA genômico sem as UTRs o gene em *A. thaliana* apresenta 1533 pb e em eucalipto 3785 pb sendo está diferença devido principalmente aos introns de eucaliptos serem maiores que os de *A. thaliana*, na qual os exons somam 1299 pb.

#### **4.2 Desenho dos "primers" e padronização**

As sequências recuperadas do genoma completo foram utilizadas como base para o desenho de "primers" que permitiram a amplificação da região dos genes BOR1, NIP5, Sorbitol dehydrogenase, Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase e Mannose-6-phosphate isomerase, sendo desenhados dois "primers" para Sorbitol dehydrogenase, três para BOR1, Sorbitol-6-phosphate e Mannose-6-phosphate isomerase e quatro para NIP5, os nomes dos "primers" desenhados para cada um dos genes pode ser observado na (Tabela 6).

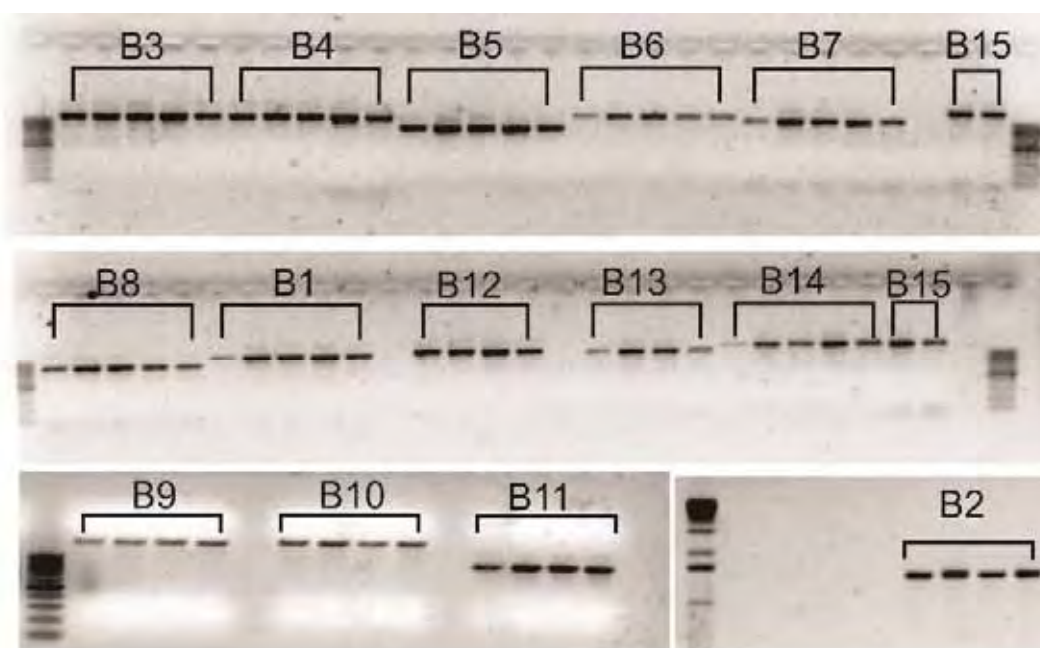
**Tabela 6** - Nome de cada "primer" desenhado para os genes em estudo.

<b>Gene</b>	<b>Nome do primer</b>
sorbitol dehydrogenase	B1
	B2
Mannose-6-phosphate isomerase	B3
	B4
	B5
Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	B6
	B7
	B8
Bor1	B9
	B10
	B11
Nip5	B12
	B13
	B14
	B15

### **4.3 Teste e padronização dos "primers"**

Estes "primers" foram ressuspensos em uma solução estoque a 100  $\mu\text{M}$  e posteriormente diluídos para uso a 10  $\mu\text{M}$ . Foram utilizados quatro indivíduos para padronização destes "primers", sendo efetuado testes de temperatura e concentração de DNA e "primers" até se obter um bom padrão de amplificação.

Todos os primers testados amplificaram bandas únicas, sendo possível utilizar os mesmos pra seqüenciamento, (Figura 14).



**Figura 14** - Gel agarose 1% com amplificação obtida com os "primers" descritos na (Tabela 6).

#### **4.4 Sequenciamento e confirmação da região esperada**

Para confirmar a amplificação com a região identificada no genoma, inicialmente foram sequenciados quatro indivíduos com todos os "primers" relacionados na (Tabela 6). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o software Chromas pro versão 1.41. A sequência consenso foi comparada com a sequência obtida inicialmente do genoma de *Eucalyptus* disponível em <http://www.phytozome.net>, sendo confirmada a amplificação da região esperada para todos os "primers" testados.

Após o sequenciamento inicial e a confirmação da região esperada em cada "primer" foi realizado um piloto para a localização e genotipagem de SNPs com 12 indivíduos, utilizando para isto os genes BOR1 e Sorbitol dehydrogenase, sendo estes escolhidos por um estar relacionado a absorção do boro via xilema e o outro tendo relação com o sorbitol envolvido na translocação de boro.

Para os três genes restantes não foi feita a procura e genotipagem de SNPs, a mesma será realizada através de sequenciamento direto, quando tivermos a disponibilidade de uma população composta por indivíduos contrastantes para a característica de eficiência e não eficiência ao déficit de boro, oriunda de população a ser obtida pela Empresa Fibria.

#### **4.5 Ensaio de genotipagem de SNPs com a região dos genes *BOR1* e *Sorbitol dehydrogenase***

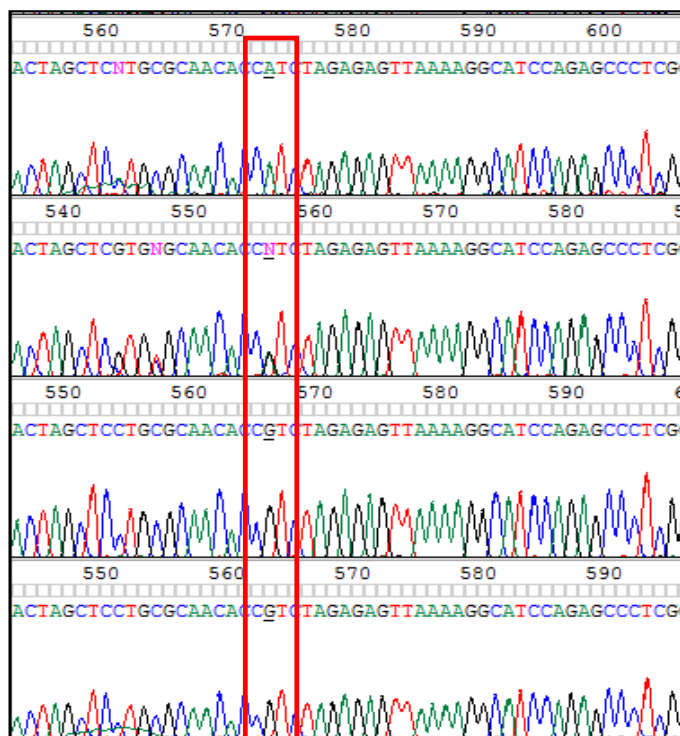
##### **4.5.1 Sequenciamento**

Os “primers” B9, B10, B11, B1 e B2 foram utilizados para seqüenciamento. Primeiramente foi efetuada uma PCR com cada um dos “primers” utilizando 12 indivíduos.

Após a reação de PCR, seu produto foi purificado por reação enzimática como descrito anteriormente e após purificação o produto foi quantificado, obtendo-se em média 450 ng/µl. Foi realizado o sequenciamento das sequências “Foward” e “Reverse”, sendo possível realizar o alinhamento das mesmas e procura de potenciais SNPs.

##### **4.5.2 Procura de SNPs**

Após o seqüenciamento, foi possível o alinhamento e procura de SNPs com cada um dos "primers" citados. O alinhamento foi realizado com o Software ChromasPro versão 1.41 (Copyright©2003-2007 Technelysium Pty Ltd) e os SNPs identificados visualmente, a Figura 15 mostra um exemplo de alinhamento e um sitio de SNP.



**Figura 15** - Identificação de um SNP A/G no “primer” B2, através de alinhamento de quatro sequencias.

### 4.5.3 Genotipagem BOR1

Como resultado da procura de SNPs no gene *BOR1*, foi encontrado um total de 35 SNPs, destes, 16 foram encontrados em exons e 19 em introns. Distribuídos da seguinte forma, 13 no “primer” B9 e destes dois em exons, 11 no “primer” B10 com sete localizados em exons e 11 encontrados no “primer” B11 com sete deles em exons (Tabela 7).

Quanto à classificação de mutações de substituição por transição e transversão nos SNPs encontrados no gene *BOR1*, 69% ou 24 do total de 35 SNPs encontrados foram substituição por transição e 31% ou 11 dos 35 foram substituições por transversão (Tabela 7), sendo transição quando uma pirimidina é substituída por outra pirimidina e transversão quando uma purina é substituída por uma pirimidina ou uma pirimidina é substituída por purina. Geralmente as substituições por transição ocorrem com maior frequência no genoma de diversos organismos (Lewin, 2009).

#### **4.5.4 Classificação dos SNPs localizados nas regiões codificantes**

Como os SNPs encontrados em regiões codantes podem alterar o aminoácido e com isso a proteína; os mesmos foram classificados quanto ao tipo da mutação, posição da mutação no codon e tipo de substituição ocorrida. Dos 16 SNPs encontrados em exons, dois deles foram encontrados no "primer" B9, sete no "primer" B10 e sete no "primer" B11. Destes ocorreram mutações por transição em dez (62,5%) e mutações por transverção em seis (37,5%). A proteína predita permitiu a separação de cada códon e localização de cada um dos SNPs encontrados em regiões codantes.

A classificação quanto ao local de substituição, dos 16 SNPs encontrados em exons, quatro (25%) apresentaram a substituição na primeira base do códon, um (6%) apresentou substituição na segunda base do códon e 11 (69%) a substituição ocorreu na terceira base do codon, a ocorrência da maioria das substituições na terceira base do codon é comum visto que nesta posição raramente ocorrera à substituição de aminoácidos (Tabela 8).

A classificação das mutações em sinônimas e não sinônimas, dos 16 SNPs, 12 (75%) apresentaram mutações sinônimas e quatro (25%) apresentaram mutações não sinônimas, destas três ocorreram nos SNPs encontrados no "primer" B10 e uma no "primer" B11. Os Aminoácidos que foram substituídos podem ser observados na (Tabela 9).

**Tabela 7** - SNPs encontrados em cada “primer”, sua posição a partir do ATG, tipo de mutação, tipo de substituição e sua localização.

<b>Primer</b>	<b>Snp</b>	<b>Posição a partir do ATG</b>	<b>Mutação</b>	<b>Tipo de Substituição</b>	<b>Localização</b>
B9	1	672	C/T	Transição	INTRON
	2	701	C/T	Transição	INTRON
	3	747	C/T	Transição	INTRON
	4	756	G/A	Transição	INTRON
	5	783	C/A	Transversão	INTRON
	6	975	A/G	Transição	INTRON
	7	1075	G/T	Transversão	INTRON
	8	1121	C/T	Transição	INTRON
	9	1475	A/C	Transversão	INTRON
	10	1553	A/C	Transversão	INTRON
	11	1592	C/T	Transição	INTRON
	12	1652	T/C	Transição	EXON
	13	1730	G/A	Transição	EXON
B10	14	1860	T/C	Transição	INTRON
	15	1874	T/C	Transição	INTRON
	16	2018	G/A	Transição	EXON
	17	2070	T/C	Transição	INTRON
	18	2114	A/G	Transição	INTRON
	19	2751	G/A	Transição	EXON
	20	2837	C/A	Transversão	EXON
	21	2858	G/A	Transição	EXON
	22	2875	T/C	Transição	EXON
	23	2944	C/A	Transversão	EXON
	24	3011	C/A	Transversão	EXON
B11	25	3346	A/T	Transversão	EXON
	26	3485	G/A	Transição	INTRON
	27	3532	G/A	Transição	INTRON
	28	3559	G/A	Transição	INTRON
	29	3574	G/T	Transversão	INTRON
	30	3596	A/C	Transversão	EXON
	31	3622	C/T	Transição	EXON
	32	3679	A/C	Transversão	EXON
	33	3715	A/G	Transição	EXON
	34	3802	T/C	Transição	EXON
	35	3838	G/A	Transição	EXON
<b>Totais</b>		<b>Transição</b>	<b>Transversão</b>	<b>Exon</b>	<b>Intron</b>
		24	11	16	19
Porcentagem		69%	31%	46%	54%

**Tabela 8** – “Primers” e os respectivos SNPs encontrados na região codante do gene, o tipo de mutação, localização da substituição no codon, aminoácido produzido, pelo codon normal e mutado e os genótipos encontrados.

Primer	SNP	Posição a partir do ATG	Mutação	Tipo de Substituição	Codon-1	Codon-2	Ami-1	Ami-2	Genótipos
B9	12	1652	T/C	Transição	TA(T)	TA(C)	Tirosina	Tirosina	(T) (C)
	13	1730	G/A	Transição	AG(G)	AG(A)	Arginina	Arginina	(G) (G/A)
B10	16	2018	G/A	Transição	TT(G)	TT(A)	Leucina	Leucina	(G) (G/A)
	19	2751	G/A	Transição	C(G)C	C(A)C	Arginina	Histidina	(A) (G) (G/A)
	20	2837	C/A	Transversão	(C)TC	(A)TC	Leucina	Isoleucina	(C) (A) (C/A)
	21	2858	G/A	Transição	(G)CA	(A)CA	Alanina	Treonina	(G) (A) (G/A)
	22	2875	T/C	Transição	TG(T)	TG(C)	Cisteína	Cisteína	(T) (C) (T/C)
	23	2944	C/A	Transversão	GC(C)	GC(A)	Alanina	Alanina	(C) (A) (C/A)
B11	24	3011	C/A	Transversão	(C)GA	(A)GA	Arginina	Arginina	(C) (A) (C/A)
	25	3346	A/T	Transversão	GC(A)	GC(T)	Alanina	Alanina	(A) (A/T)
	30	3596	A/C	Transversão	(A)TG	(C)TG	Metionina	Leucina	(A) (A/C)
	31	3622	C/T	Transição	GA(C)	GA(T)	Aspartato	Aspartato	(C) (C/T)
	32	3679	A/C	Transversão	AC(A)	AC(C)	Treonina	Treonina	(A) (C) (A/C)
	33	3715	A/G	Transição	CC(A)	CC(G)	Prolina	Prolina	(A) (G) (A/G)
	34	3802	T/C	Transição	AG(T)	AG(C)	Serina	Serina	(T) (C) (T/C)
	35	3838	G/A	Transição	TC(G)	TC(A)	Serina	Serina	(G) (A) (G/A)
<b>Totais</b>			<b>Transição</b>	<b>Transversão</b>	<b>Mutação sinônima</b>	<b>Mutação não sinônima</b>	<b>Alteração 1ª base codon</b>	<b>Alteração 2ª base codon</b>	<b>Alteração 3ª base codon</b>
<b>Nº “SNPs”</b>			<b>10</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>11</b>
<b>Porcentagem</b>			<b>63%</b>	<b>38%</b>	<b>75%</b>	<b>25%</b>	<b>25%</b>	<b>6%</b>	<b>69%</b>

**Tabela 9** – “Primers” onde foram encontradas mutações não sinônimas, quais SNPs tem a mutação, o tipo de substituição encontrada, onde foi a substituição em cada codon, qual a mutação de aminoácido ocorreu e o tipo de genótipo encontrado.

Primer	SNP	Posição a partir do ATG	Mutação	Tipo de Substituição	Codon-1	Codon-2	Ami-1	Ami-2	Genótipos
B10	19	2751	G/A	Transição	C(G)C	C(A)C	Arginina	Histidina	(A) (G) (G/A)
	20	2837	C/A	Transversão	(C)TC	(A)TC	Leucina	Isoleucina	(C) (A) (C/A)
	21	2858	G/A	Transição	(G)CA	(A)CA	Alanina	Treonina	(G) (A) (G/A)
B11	30	3596	A/C	Transversão	(A)TG	(C)TG	Metionina	Leucina	(A) (A/C)

#### 4.5.5 Genotipagem do gene da Sorbitol dehydrogenase

Como resultado da procura de SNPs, no gene da Sorbitol dehydrogenase, foi encontrado um total de 19 SNPs, destes, sete foram encontrados em exons, 10 em introns e dois nas regiões UTRs sendo um na 3' UTR e outro na 5' UTR. Distribuídos da seguinte forma, oito no “primer” B1 e destes um na região 3' UTR,



cinco em exons e dois em introns, já no "primer" B2 foram encontrados 11 SNPs sendo dois localizados em exons, oito em introns e um na 5' UTR (Tabela 10).

Quanto à classificação de mutações de substituição por transição e transversão nos SNPs encontrados no gene da Sorbitol dehydrogenase, 95% ou 18 do total de 19 SNPs encontrados foram substituição por transição e 5% ou um dos 19 foram substituições por transversão (Tabela 10).

#### **4.5.6 Classificação dos SNPs localizados nas regiões codificantes.**

Dos sete SNPs encontrados em exons, cinco deles foram encontrados no "primer" B1 e dois no "primer" B2. Destes ocorreram mutação por transição em seis (86%) e mutação por transverção em um deles (14%). A proteína foi predita permitindo a separação de cada códon e localização de cada um dos SNPs encontrados em regiões codantes.

A classificação quanto ao local de substituição, dos sete SNPs encontrados em exons, três (43%) apresentaram a substituição na primeira base do códon, um (14%) apresentou substituição na segunda base do códon e três (43%) a substituição ocorreu na terceira base do códon (Tabela 11).

A classificação das mutações em sinônimas e não sinônimas, dos sete SNPs encontrados em exons, três (43%) apresentaram mutações não sinônimas e quatro (57%) apresentaram mutações sinônimas, das mutações não sinônimas uma ocorreu no SPN encontrado no "primer" B1 e duas no "primer" B2. Os Aminoácidos que foram substituídos podem ser observados na (Tabela 12).

**Tabela 10** - SNPs encontrados em cada “primer” sua posição a partir do ATG, tipo de mutação encontrada o tipo de substituição e sua localização.

	Snp	Posição a partir do ATG	Mutação	Tipo de Substituição	Localização	
B1	1	162	C/T	Transição	3' UTR	
	2	232	A/G	Transição	EXON	
	3	271	C/T	Transição	EXON	
	4	367	A/T	Transversão	EXON	
	5	414	C/T	Transição	INTRON	
	6	417	C/T	Transição	INTRON	
	7	563	C/T	Transição	EXON	
	8	745	A/G	Transição	EXON	
B2	9	304	A/G	Transição	INTRON	
	10	311	C/T	Transição	INTRON	
	11	803	C/T	Transição	INTRON	
	12	836	C/T	Transição	INTRON	
	13	904	C/T	Transição	INTRON	
	14	968	C/T	Transição	INTRON	
	15	988	A/G	Transição	INTRON	
	16	999	C/T	Transição	INTRON	
	17	1038	A/G	Transição	EXON	
	18	1071	C/T	Transição	EXON	
	19	1257	A/G	Transição	5' UTR	
Totais		<b>Transição</b>	<b>Transversão</b>	<b>Exon</b>	<b>Intron</b>	<b>UTRs</b>
		18	1	7	10	2
Porcentagem		95%	5%	37%	53%	10%

**Tabela 11** – “Primers” e os respectivos SNPs encontrados na região codante do gene, o tipo de mutação, localização da substituição no codon, qual aminoácido é produzido pelo codon normal e mutado e os genótipos encontrados na amostra.

Primer	SNP	Posição a partir do ATG	Mutação	Tipo de Substituição	Codon-1	Codon-2	Ami-1	Ami-2	Genótipos
B1	2	232	A/G	Transição	GG(G)	GG(A)	Glicina	Glicina	(A) (G) (G/A) (C) (T)
	3	271	C/T	Transição	(T)TA	(C)TA	Leucina	Leucina	(C/T) (A) (T)
	4	367	A/T	Transversão	GT(T)	GT(A)	Valina	Valina	(A/T) (C) (T)
	7	63	C/T	Transição	(C)GC	(T)GC	Alanina	Cisteína	(C/T)
B2	8	745	A/G	Transição	AC(A)	AC(G)	Treonina	Treonina	(A) (A/G) (A) (G)
	17	1038	A/G	Transição	(A)TT	(G)TT	Isoleucina	Valina	(G/A) (C) (T)
	18	1071	C/T	Transição	A(C)G	A(T)G	Treonina	Metionina	(C/T)
Totais			Transição	Transversão	Mutação sinônima	Mutação não sinônima	Alteração 1ª base codon	Alteração 2ª base codon	Alteração 3ª base codon
Nº “SNPs”			6	1	4	3	3	1	3
Porcentagem			86%	14%	57%	43%	43%	14%	43%

**Tabela 12** – “Primers” onde foram encontradas mutações não sinônimas, quais SNPs tem a mutação, o tipo de substituição encontrada, onde foi a substituição em cada codon, qual a mutação de aminoácido ocorreu e o tipo de genótipo encontrado.

Primer	SNP	Posição a partir do ATG	Mutação	Tipo de Substituição	Codon-1	Codon-2	Ami-1	Ami-2	Genótipos
B1	7	563	C/T	Transição	(C)GC	(T)GC	Alanina	Cisteína	(C) (T) (C/T)
B2	17	1038	A/G	Transição	(A)TT	(G)TT	Isoleucina	Valina	(A) (G) (G/A)
	18	1071	C/T	Transição	A(C)G	A(T)G	Treonina	Metionina	(C) (T) (C/T)

Apesar da maioria das mutações serem sinônimas, estudos recentes mostram que este tipo de mutação, algumas vezes, participa de alterações em expressões de genes e dobramentos de proteínas (Chamary et al., 2006; Gupta e Lee, 2008). Nos últimos anos, estudos com códons sinônimos demonstraram resultados diferentes na expressão de genes, mostrando, desta forma, que SNPs sinônimos também podem produzir diferentes fenótipos (Kudla et al., 2009).

A importância de se encontrar SNPs que possam alterar a estrutura e função da proteína codificada, é que os mesmos representam marcadores alvo para se identificar variações genéticas associadas com características fenotípicas complexas (Hammer, 1995).

#### **4.5.7 Análise da diversidade**

Para o gene BOR1, foram encontrados 16 haplótipos, a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,957 e a diversidade nucleotídica  $\pi$  encontrada foi 0,00308; em média, foi encontrado um SNP para cada 120 pb.

Para o gene da Sorbitol dehydrogenase, foram encontrados 18 haplótipos, a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,967 e a diversidade nucleotídica  $\pi$  encontrada foi 0,00296; em média, foi encontrado um SNP para cada 152 pb.

Outros estudos relacionados a *Eucalyptus* demonstram resultados parecidos para valores de  $\pi$ . Santos (2005) estudando um segmento do gene ccoaomt pode observar que os níveis de diversidade nucleotídica para as espécies *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla*, foram respectivamente, 0,00356, 0,00168 e 0,00254. Já em outro estudo mais recente, Neves et al. (2008), trabalhando com os genes CCR e F5H, observaram que os valores médios para  $\pi$  nas espécies *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla* foram respectivamente 0,01604; 0,00391 e 0,00305.

Em outras espécies relacionadas à silvicultura, Pot et al (2006) avaliando a diversidade nucleotídica em oito genes candidatos envolvidos na formação da madeira, encontraram valores médios de 0,00241 para *Pinus pinaster* e 0,00186 para *Pinus radiata*.

Em linhas gerais, devido à polinização cruzada, elevada heteroziguidade, baixo nível de domesticação e incipiente seleção artificial, espécies florestais tendem

a apresentar elevada diversidade nucleotídica quando comparada com outras espécies de plantas, como o milho, que já se apresenta altamente domesticado, possuindo uma diversidade nucleotídica baixa (Savolainen e Pyhajarvi, 2007).

Quanto a média de SNPs encontrados por pb estudos também relacionados ao gênero *Eucalyptus* revelam uma frequência relativamente semelhante dependendo do gene em estudo. Thumma et al (2005) mostraram que a frequência observada no gene CCR (cinnamoyl coA redutase), em *Eucalyptus nitens* é de um SNP para cada 94 pares de base. Neves et al (2008) também trabalharam com o gene F5H, em *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, onde foi apresentado uma frequência, respectivamente de um SNP para cada 155, 77,5 e 52 pb. No geral, para genoma de plantas, o polimorfismo de base única variam entre 1 SNP para cada 100 a 300 pb (Gupta et al., 2001).

Nos ensaios de genotipagem os resultados encontrados são similares a outros da literatura validando os resultados. A procura de SNPs em dois genes permitiu o mapeamento de 54 novos SNPs que a podem ser utilizados para análise de diversidade em *Eucalyptus*.

## **5 Conclusões**

- A metodologia empregada permitiu a busca de sequências expressas no banco de ESTs e posteriormente encontrar a localização do gene no genoma completo;
- Foi possível desenhar "primers" e sequenciar os genes para mapeamentos dos SNPs;
- Com a Disponibilidade de populações contrastante quanto a eficiência e não eficiência a deficiência de Boro os SNPs mapeados podem ser

utilizados para genotipagem da população em busca de um padrão molecular que diferencie os indivíduos.

## 6 Referencias

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- BENKO-ISEPPON, AN, WINTER, P, HUETTEL, B, STAGINNUS, C, MUEHLBAUER, FJ KAHL, G, Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. **Theor Appl Genet**. 107 (2): 379-86, 2003.
- BIELESKI, R.L. Sugar alcohols. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W. (Ed.) **Encyclopedia of plant physiology**. New York: Springer-Verlag, v.13A, p.158-192, 1982.
- BLAMEY, F.P.C.; VERMEULEN, W.J.; CHAPMAN, J. Inheritance of boron status in sunflower. **Crop Science**, v. 24, p.43-46, 1984.
- BOLLARD, E.G. In *The Biochemistry of fruit and their products*. Vol. 1, ed. A.C. Hulme. Academic Press, London. (1970)
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nat. Genet. Suppl.**, v.33, p.228-237, mar. 2003
- BOURNE, E.J. The polyhydric alcohols: acyclic polyhydric alcohols, *In: Formation, Storage, Mobilization, and Transformation of Carbohydrates*. **Encycl. Plant Physiol**, Vol. 61 (Ruhland, W.,ed.), Springer-Verlag. New York, USA, pp. 345-362, 1958.
- BRACELPA- Associação Brasileira de Celulose e Papel. Relatório anual 2010/2011. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 2 fev. 2012.
- BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field guide to Eucalypts (3 rd ed.)**. Northern Australia Melbourne: Bloomings Books, v. 3, 2006.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs **Elsevier Science Gene** v.234 p.177-186, 1999.
- BROWN, P.; BELLALLOUI, N.; HENING, H.; DANDEKAR, A. Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of Tobacco to boron deficiency. **Plant Physiol**. V. 119, p.17-20, 1999.
- BROWN, P.; HU, H. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? **Plant and Soil**, v.196, 211-5, 1997.
- BROWN, P.; HU, H. Phloem mobility of boron is species dependent:evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. **Annals of Botany**,v.77, p.497-505, 1996.
- BROWN, P.; SHELPS, B.J. Boron mobility in plants. **Plant and Soil**, v.193, p.85-101, 1997.
- CHAMARY, JV, PARMLEY, JL, HURST, LD, Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals, **Nat. Rev. Genet**. 7:98–108, 2006.
- DUGGER, W.M. Boron in plant metabolism. *In* Inorganic Plant Nutrition. **Encyclopedia of Plant Physiology**, v. 15. Eds A Läuchli and R.L. Bieleski, p. 626-50. Springer-Verlag,

Heidelberg, 1983.

EVERARD, J.D.; CONTINI, C.; GRUMET, R.; PLUMMER J.; LOESCHER, W.H. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. **Plant Physiology**, 106: 281-292 (1994).

FERREIRA, M.E.; DA CRUZ, M.C.P. Micronutrientes na agricultura. *Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fósforo-POTAFOS*, Piracicaba, São Paulo, 734p., 1991.

FERREIRA, ME, GRATTAPAGLIA, D, **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 3 ed. 220p. 1998.

FINDEKLEE, P.; GOLDBACH, H.E. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in cucurbita pepo roots. **Bot. Acta.**, v.109, 463-5, 1996.

GUPTA, P, LEE, KH, Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates, **Biotechnol. Bioeng.** 101:967-974, 2008.

GUPTA, PK, ROY, JK, PRASAD, M, Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v.80, n.4, p.4524-535, 2001.

HAMMER, MF, A recent common ancestry for human Y chromosomes. **Nature**, v.378, n.6555, p.376-378, 1995.

HENDRIX, J.E. Handbook of **plant and crop physiology**. Cap. XII: Assimilate Transport and Partitioning- edited by Pessarakli, M.. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 257-273 (1994).

HU, H. and BROWN, P.H.. Absorption of boron by plants. **Plant and Soil**. 193:49- 58, 1997.

HU, H.; BROWN, P. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. **Plant Physiol.**, v.105, 681-9, 1994.

HU, H.; PENN, S.G.; LEBRILLA, C.B.; BROWN, P.H. Isolation and characterization of soluble boron-complexes in higher plants: the mechanism of phloem mobility of boron. **Plant Physiology**, v.113, p.649-655, 1997.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohidr.Res.**, v. 284, 1-9, 1996.

JUNGHANS, DT, ALFENAS, AC, BROMMONSCHENKEL, SH, ODA, S, MELLO EJ, GRATTAPAGLIA, D, Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theor Appl Genet.** 175-80. 2003.

JUNGHANS, DT, **Quantificação da severidade, herança de resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, 2000. 53p. Tese (doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa.

KOBAYASHI, M. & MATOH, T. In vitro reconstitution of the boron-polysaccharide complex purified from cultured tobacco BY-2 cells. In: BELL, R.W. & REKARSEM, B., eds. Boron in soils and plants. Dordrecht, Kluwer Publication, 1997. p.237-241.

KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZIMA, J-I Two chains of rhamnoglacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. **Plant Physiol.**, v.110, 1017-1020,



1996.

- LEITE, S.M.M. **Comportamento de *Eucalyptus grandis* e híbridos “urograndis” submetidos à situação de suficiência e deficiência de boro.** Botucatu, 2003. 104p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LEWIN, B. **Genes IX.** 9 ed. Porto Alegre. Artmed, 2008, 15-16, 60 p.
- LOESCHER, Physiology and metabolism of sugar alcohol in higher plants. *Physiol. Plant.*, 70: 553-7, 1987.
- LOOMIS, W.D.; DURST, R.W. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, v. 3:(4), p. 229-239, 1992.
- MADORE, M.A. Handbook of plant and crop physiology. Cap. XII: **Carbohydrate Synthesis and Crop Metabolism** - edited by Pessarakli, M.. ed. Marcel Dekker, Inc. Nwe York, 257-273 (1994).
- MAKKEE, M.; KIEBOOM, A.P.G.; van BEKKUM, H. Studies on borate esters III. Borate esters od D-mannitol, D-glucitol, D-fructose and D-glucose in water. *Recl.Trav.Chim.Pays-Bas Belg*, v. 104, 230-235, 1985.
- MALAVOLTA, E.; KLIEMANN, H.J. Desordens nutricionais no cerrado. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato: Potafos. Piracicaba, 1985, 136p.
- MARSHALL OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 2004 20(15):2471-2472 dsiponivel em: <http://perlprimer.sourceforge.net/>
- MARTINS FILHO, S, SEDIYAMA, CS, MOREIRA, MA, BARROS EG, RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, n.3, p.317-321, 2002.
- MATOH T, ISHIGAKI K, MIZUTANI M, MATSUNAGA W, TAKABE K. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for and intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant and Cell Physiology* 33, 1135–1141, 1992.
- MATOH, T. Boron in plant cell walls. *Plant and Soil*, v. 193:59-70, 1997.
- MIWA, K., TAKANO, J. AND FUJIWARA, T. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 46 : 1084 – 1091, 2006.
- MIWA, KYOKO & FUJIWARA TORU. REVIEW: PART OF A SPECIAL ISSUE ON PLANT NUTRITION, Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany* 105: 1103–1108, 2010.
- MORETZSOHN, MC, NUNES, CDM, FERREIRA, ME, GRATTAPAGLIA, D, RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Theor Appl Genetic*. 100:63-70, 2000
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. New York: **Columbia University** Press, 512 p. 1987.
- NEI, M.; LI, W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

- NEVES, LG, et al, Diversidade Nucleotídica e utilização de SNPs para o mapeamento de genes candidatos em *Eucalyptus* spp. **Embrapa**. Outubro, 2008.
- NOGUCHI, K., DANDEL, F., PFEFFER, H., ROMHELD, V., HAYASHI, H. and FUJIWARA, T. Defect in root–shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant *bor1-1*. *J. Plant Physiol.* 156: 751 – 755, 2000.
- NOGUCHI, K., YASUMORI, M., IMAI, T., NAITO, S., MATSUNAGA, T., ODA, H. et al. *bor1-1*, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant Physiol.* 115 : 901 – 906, 1997.
- NOIRAUD, N.; MAUROUSSET, L.; LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. *Plant physiol. Biochem.*, v.39, 717-28, 2001.
- NOSE K.; ZENKI, M. Flow Injection Spectrophotometric Determination D-Sorbitol Using Methyl Orange as an Indicator. *Analyst* 116 (1991) 711
- NOVELINO, J.O.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; MUNIZ, A.S. Efeito de níveis de boro em solução nutritiva no crescimento de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v.6(1), p. 45-51, 1982
- O'NEIL, M. A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P. DOCCO, T.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol.Chem.*, v.271, 22923-22930, 1996.
- PARR, A. J.; LOUGHMAN, B.C. Boron and membrane function in plants. *In Metals and micronutrients, uptake and utilization by plants.* Eds. D.A. Robb and W.S. Pierpoint. **Academic Press**, New York, p. 87-107, 1983.
- POT, D., J. C. RODRIGUES, P. ROZENBERG, G. CHANTRE, J. TIBBITS *et al.*, QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Tree Genet. Genomes** 2: 10–24, 2006
- POWER, P.P.; WOODS, W.G. The chemistry of Boron and its speciation in plants. **Plant and Soil**, 1997. vol. 193, p. 1-13.
- PRIESTLEY, C.A. The annual turnover of resources in young olive trees. **Journal of Horticultural Science** 52(1): 105-112 (1977).
- PRYOR, L. *Eucalyptus*. In: Halevy, A. **CRC Handbook of Flowering**. 1.ed. Boca Raton: Franklin Book Company, 1985. v.2, p. 476-482.
- RERKASEM, B. Bell, R.W. LORDKAEW, S. and LONERAGAN, J.F. Boron deficiency in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], peanut (*Arachis hypogaea* L.) and black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]: Symptoms in seeds and differences among soybean cultivars in susceptibility to boron deficiency. **Plant and Soil** 150, 289–294, 1993a.
- RERKASEM, B. NETSANGTIP, R. LORDKAEW, S. and CHENG, C. Grain set failure in boron deficient wheat. *Plant and Soil* 155/156, 309–312, 1993b.
- RERKASEM, B.; JAMJOD, S. Genotypic variation in plant response to low boron and implications for plant breeding. **Plant and Soil**, 193: 169-80, 1997.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. v.19, n.18,

p. 2496-2497, 2003.

SANTOS, S. N. **Genes de Lignificação em *Eucalyptus*: estrutura e diversidade dos genes *4cl* e *ccoamt***. 2005. 229 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

SAVOLAINEN, O.; PYHAJARVI, T. Genomic diversity in forest trees. **Current opinion in plant biology**, [S.l.], v. 10, p. 162-167, 2007.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. <<http://www.sbs.org.br>> Acesso em: 15 de dezembro de 2011.

SHELP, B.J. Boron mobility and nutrition in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Ann. Bot.**, v. 61, p. 83-91, 1988.

SHELP, B.J. Physiology and biochemistry of boron in plants. In: GUPTA, U.C. (Ed.) **Boron and its role in crops production**. Boca Raton: CRC Press, cap.4, p.53-85, 1993

SKOK, J. The substitution of complexing substances for boron in plant growth. **Plant Physiol.**, v.32, p.308-12, 1957

STOOP, J.M.H.; WILLIAMSON, J.D.; PHARR, D.M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. **Trends Plant Sci. Rev.**, 1(5), p. 139-44, 1996.

SYVANEN, A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nat. Rev. Genet.**, v.2, n.12, p.930-942, dec. 2001.

TAILLON-MILLER, P.; GU, Z.; LI, Q.; HILLIER, L.; PUI-YAN KWOKI. Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single nucleotide polymorphisms. **Genome Res.**, v.8, n.7, p.748-754, jul. 1998.

TAKANO, J., MIWA, K. and FUJIWARA, T. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. **Trends Plant Sci** . 13 : 451 – 457, 2008.

TAKANO, J., NOGUCHI, K., YASUMORI, M., KOBAYASHI, M., GAJDOS, Z., MIWA, K., et al. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. **Nature** 420 : 337 – 340, 2002.

TAKANO, J., WADA, M., LUDEWIG, U., SCHAAF, G., VON WIREN, N. and FUJIWARA, T. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. **Plant Cell** 18: 1498 – 1509, 2006.

THUMMA, B.R.; NOLAN, M.F.; EVANS, R.; MORAN, G.F. Polymorphisms in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) are associated with variation in microfibril angle in *Eucalyptus* ssp. **Genetics**, 2005.

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. **Biochim. Biophys. Acta** 1758 : 1165 – 1175, 2006.

WARINGTON, K. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. **Ann.Bot.**, v.37, 629-72, 1923.

YAMADA, T. Boro: será que estamos aplicando a dose suficiente para o adequado desenvolvimento das plantas? **POTAFOS: Informações Agronômicas**, v.90: 1-5; 2000.

YAMAMOTO, Y.T.; ZAMSKI, E.; WILLIAMSON, J.D.; CONKLING, M.A.; PHARR, D.M. Subcellular localization of celery mannitol dehydrogenase. A cytosolic metabolic enzyme

in nuclei. *Plant Physiology*, v.115, p.1397-1403, 1997.

ZHANG, D.X; HEWITT, G.M. Molecular DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.*, v.12, n.3, p.563-584, jun. 2003