



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Estudos Funcionais do gene *EgTIP2* que codifica uma aquaporina de Eucalipto

Dissertação de Mestrado

MARCELA IARA RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu – 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu

Estudos Funcionais do gene *EgTIP2* que codifica uma aquaporina de Eucalipto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu (SP), para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Dissertação de Mestrado

MARCELA IARA RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu – 2013

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**

Rodrigues, Marcela Iara.

Estudos funcionais do gene EgTIP2 que codifica uma aquaporina de eucalipto / Marcela Iara Rodrigues. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. *Eucalyptus grandis* - Biotecnologia. 2. Genética vegetal. 3. Plantas transgênicas. 4. Biotecnologia vegetal. 5. Genética – Expressão.

Palavras-chave: Aquaporina; Estresse abiótico; *Eucalyptus grandis*; Promotor; Tecido-especificidade.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao professor Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação, dedicação, paternidade, paciência, preocupação, por apoiar e investir nas minhas ideias, pelo zelo durante meu processo de amadurecimento. Agradeço de coração por acreditar em mim e torcer pelo meu sucesso.
- ❖ Aos meus pais, pela força que me transmitiram, pela compreensão, pela preocupação, pelo apoio financeiro, por nunca deixar de acreditar em mim e investir nos meus sonhos. Sem o amor e o apoio ambos eu não teria chegado até aqui hoje. Principalmente pela força da minha mãe que ia ao laboratório me auxiliar no trato dos meus experimentos nos finais de semana em que eu não retornava a minha cidade de origem.
- ❖ As minhas queridas irmãs Carolina e Camila, pela amizade, conversas e momentos de descontração, pelo apoio e incentivo para escrever essa dissertação.
- ❖ Aos meus colegas de laboratório, Carol, Alessandra, Bruno pelas discussões, auxílio, pela amizade, e companheirismo. E também e a Cíntia que mesmo longe estava sempre pronta a me auxiliar e se tornou uma grande amiga.
- ❖ Agradeço muito ao Doutorando Fabio pelo apoio e dedicação em me ensinar coisas novas, me auxiliar nas discussões, nas extrações de RNA e por sempre estar disposto a me ajudar.
- ❖ Agradeço especialmente a Pós-doutoranda Juliana Bravo, por ser mais que uma tutora ou co-orientadora, mas por ser minha amiga, por ficar comigo nos finais de semana trabalhando no laboratório, por estar sempre pronta a me ajudar, por se preocupar, simplesmente por existir e me tornar uma pessoa melhor como pesquisadora.

- ❖ Aos meus Companheiros de Pós Graduação, Daniel, Felipe, Luis, Talita, Paula que me ajudaram a montar experimento, analisar dados, passar noites no laboratório, me deram apoio e sempre me incentivaram. Agradeço de coração a todos vocês
- ❖ Á todos os professores que gastaram uns minutos da sua vida para me transformar numa pessoa mais culta e instruída, que se esforçaram para tornar as coisas mais difíceis em algo agradável, e que além de serem simplesmente professores se tornaram amigos e pessoas muito queridas que serão lembrados sempre.
- ❖ Ao apoio financeiro do CAPES e FAPESP.
- ❖ Agradeço a todos que passaram em minha vida e fizeram parte dessa jornada incrível de superação, transformação e amadurecimento pessoal e profissional, mesmo aquele que ficaram por alguns minutos, mas que foram minutos suficientes para alterar a rota e me fazer chegar ao final de mais essa jornada Que hoje se tornou um novo começo!
- ❖ Agradeço a Deus por tornar tudo possível, por me confortar nos momentos difíceis e por estar sempre comigo...

OBRIGADA A TODOS POR FAZEREM PARTE MINHA VIDA!!!!!!!

RESUMO

A biotecnologia define-se pelo uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade. É importante frisar que uma das principais vantagens da biotecnologia moderna voltada para a área vegetal é a de poder gerar estratégias de melhoramento aplicáveis a diferentes culturas. Uma das principais estratégias de ação nessa área trata da produção de plantas geneticamente modificadas com transgenes de interesse. Nesse contexto, a caracterização de promotores com padrão de expressão tecido-específico é essencial para que a expressão de tais transgenes em plantas de interesse agrônômico e florestal, como em eucalipto, fique limitada a determinados órgãos/tecidos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização funcional do promotor do gene *EgTIP2* que codifica uma putativa aquaporina intrínseca de tonoplasto (TIP) com expressão específica em raízes de eucalipto. Em paralelo, o perfil de expressão desse gene em resposta ao estresse osmótico foi investigado em eucalipto. Análises de expressão mostraram que tanto o promotor quanto o gene *EgTIP2* são regulados positivamente pelo estresse osmótico curto e persistente, enquanto que o promotor parece ser regulado negativamente na presença de ABA-exógeno. Testes histoquímicos revelaram uma expressão vascular-específica dirigida pelo promotor *EgTIP2* em plantas de tabaco transgênicas, sugerindo uma possível utilização como ferramenta para aplicação em engenharia genética de espécies lenhosas.

SUMÁRIO

Introdução geral	12
-------------------------------	----

Capítulo 1- Análise filogenética da aquaporina putativa de Eucalipto

1) Introdução.....	16
1.1 Origem das Família Gênica.....	16
1.2 Família Gênica das Aquaporinas.....	18
1.3 Estrutura e seletividade das Aquaporinas.....	21
2) Objetivos.....	24
3) Materiais e Métodos.....	25
3.1 Banco de Dados.....	25
3.2 Alinhamento das Sequências geradas e Análise Filogenética.....	26
3.3 Modelagem por homologia com MIPs de planta.....	27
4) Resultados e Discussão.....	28
5) Conclusão.....	35

Capítulo 2- Estudo Fisiológico e Moleculares de EgTIP2 frente ao estresse osmótico

1) Introdução.....	36
1.1 As aquaporinas e os estresses abióticos.....	36
2) Objetivo.....	40
3) Materiais e Métodos.....	41
3.1. Material Vegetal e cultivo das sementes.....	41
3.2 Ensaio histoquímico da atividade GUS.....	42
3.3 Análises da região promotora.....	43

Tabela 03. Elementos <i>cis</i> -regulatórios relevantes encontrados na análise do promotor em estudo no plantcare.....	54
Tabela 04. Média dos dados coletados das plantas de eucalipto cultivadas em hidroponia nas soluções de Hoagland com diferentes concentrações: 25%, 50%, 75% e 100%.....	63

Figuras:

Figura 01. Diagrama esquemático da localização dos membros das diferentes subfamílias de aquaporinas em planta. PIPs são localizados na membrana plasmática, TIPs na membrana vacuolar e na membrana de corpos protéicos (protein body), SIP na membrana do retículo endoplasmático (ER), e NIP na membrana plasmática e ER.....	20
Figura 02. Topologia geral conservada na família MIP.....	22
Figura 03. Representação gráfica do monômero de aquaporina TIP2 de <i>E. grandis</i>	29
Figura 04. Árvore filogenética construída a partir de sequências de aminoácidos de aquaporinas da subfamília TIP.....	31
Figura 05. Alinhamento comparativo de sequências preditas de aminoácidos do canal TIP2 de <i>Eucalyptus grandis</i> e outras espécies representativas em plantas.....	32
Figura 06- Análise estrutural da TIP2 de <i>E. grandis</i>	33
Figura 07. Complexidade da resposta das plantas aos estresses abióticos.....	37
Figura 08. Representação esquemática do cassete de expressão contendo o fragmento AQUA em fusão transcricional com o gene <i>uidA</i> (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z.....	42
Figura 09. Sistema de cultivo hidropônico de eucalipto em garrafas pets para teste-piloto de adaptação a hidroponia e estabelecimento da melhor concentração da solução de Hoagland para essa espécie.....	45
Figura 10. Vista geral do ensaio de estresse osmótico empregando mudas de eucalipto realizado em casa de vegetação controlada do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP- Botucatu, SP.....	47

Figura 11. Padrão predominante de expressão de GUS sob controle do promotor investigado em plântulas de tabaco transgênico em diferentes estágios de desenvolvimento: plântulas com 2 (C), 3 (D), e 4 (E) folhas.....	53
Figura 12. Fenologia das plântulas transgênicas de tabaco submetidas ao estresse osmótico com 250 mM de manitol nos diferentes tempos de coleta: 0 (A e B), 3 (C) e 24 horas (D).....	56
Figura 13. Avaliação da qualidade do RNA total extraído utilizando método de CTAB.....	57
Figura 14. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas.....	58
Figura 15. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao tratamento com fitohormônio ABA por um período de 24 horas.....	60
Figura 16. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao efeito conjunto do estresse osmótico e do fitohormônio ABA durante 24 horas.....	61
Figura 17. Comparação da expressão relativa do gene repórter GUS e do gene <i>NtHSF2</i> em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas	62
Figura 18. Mudanças de <i>E. grandis</i> após 20 dias de cultivo hidropônico em solução de Hoagland a 25%(A), 50%(B), 75%(C) e 100%(D).....	64
Figura 19. Variáveis ambientais da casa de vegetação de clima controlado (UNESP, Botucatu, SP) no cultivo hidropônico de eucalipto sob estresse osmótico: umidade relativa da folha (UR% folha), umidade relativa do ar (UR% ar), temperatura da folha (Tfolha), temperatura do ar (Tar) e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF).....	67
Figura 20. Taxa fotossintética líquida, transpiração (E), conteúdo de carbono interno (Ci), condutância estomática (Gs), eficiência da enzima rubisco e a eficiência do uso da água em folhas de <i>E. grandis</i> cultivados em condição hidropônicas.....	69

Figura 21. - Expressão relativa do gene *EgTIP2* em raízes de mudas de eucalipto expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas.....72

Figura 24. Comparação do perfil de expressão relativa dos genes *EgTIP2* e *EgPIP* em raízes de eucalipto expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas.....73

INTRODUÇÃO GERAL

As abordagens biotecnológicas representam uma alternativa atraente na silvicultura contemporânea como complemento das abordagens tradicionais de melhoramento genético (Altpeter *et al.*, 2005). Entre os elementos que têm contribuído para o crescimento da biotecnologia vegetal destacam-se inúmeros genes identificados por intermédio dos projetos de sequenciamento de genomas e transcriptomas de espécies importantes, que passaram a tornar viável a obtenção de plantas com características melhoradas via modificação genética.

O impacto dessa tecnologia sobre o melhoramento genético de plantas e sobre a pesquisa básica é considerável, pois novos genótipos podem ser criados de forma dirigida e em curto tempo. As áreas de cultivo de organismos geneticamente modificados (GM) têm aumentado substancialmente em diversos países, desde que foram comercializadas em 1996. Correspondentemente, a adoção de culturas GM trouxe enormes benefícios econômicos e ambientais (Chen & Lin, 2013). Essas plantas transgênicas vêm sendo comercializadas bem como utilizadas para a investigação das funções e regulação de genes isolados. Entretanto, muito do que se sabe a respeito dos genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal é advindo de estudos com plantas modelos herbáceas, tais como *Arabidopsis* e arroz. Contudo, a transferência desta informação para plantas lenhosas é, na maior parte dos casos, difícil, visto que o melhoramento de árvores é um processo normalmente longo e limitado pela taxa de crescimento das espécies envolvidas, além dos custos envolvidos na criação e manutenção de testes de progênes de grande porte (Grattapaglia *et al.*, 2009). Nesse cenário, a engenharia genética, auxiliada pelas metodologias de cultura de tecidos que permitem a produção de um grande número de propágulos, pode acelerar esse processo pela transferência direta de características simples, podendo superar as desvantagens do melhoramento tradicional através da introdução e expressão de genes conhecidos de origem vegetal ou não vegetal em um genótipo específico de forma eficiente (Harfouche *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011). Assim, quanto mais conhecimento sobre a biologia molecular das árvores for adquirido, maiores serão as oportunidades para seu melhoramento.

Dentre as ferramentas moleculares necessárias para a produção de plantas geneticamente modificadas, a identificação e caracterização de promotores que viabilizem a expressão dos transgenes de forma controlada e dirigida a determinado órgão/tecido representa uma prioridade. Tais sequências promotoras são cruciais para a regulação gênica. Em geral, o promotor é a parte do gene que tem a função de mediar e controlar o início da transcrição, estando localizado imediatamente a montante da região a ser transcrita (Werner, 1999). Promotores constitutivos têm sido amplamente utilizados para controlar a expressão de transgenes de interesse em muitas espécies de plantas. No entanto, em alguns casos, a expressão constitutiva pode ser altamente prejudicial à planta hospedeira, culminando em diversas anormalidades de desenvolvimento e, especialmente, no silenciamento do transgene (Cai *et al.*, 2007 e referências nele contidas). Deste modo, o uso de promotores com padrões específicos de expressão em construções gênicas visando à transformação de plantas de interesse é importante tanto para evitar o desperdício de energia produzindo proteínas de interesse em células/tecidos não relevantes, quanto para evitar distúrbios metabólicos e de desenvolvimento (Vicentini *et al.*, 2005).

Como parte de um projeto abrangente voltado para a identificação e clonagem de promotores com expressão tecido-específica, nosso grupo de pesquisa identificou diversos genes candidatos com expressão específica ou preferencial em determinados órgãos/tecidos em *Eucalyptus grandis* (Sasaki, 2008, Ribeiro, 2009) bem como em outras espécies vegetais (Brandalise, 2007; Hoshino, 2007). Algumas das sequências promotoras correspondentes foram clonadas e caracterizadas objetivando um futuro emprego em programas biotecnológicos das espécies em estudo. Apesar desses esforços, a disponibilidade de informações sobre genes com expressão órgão/tecido-específica e de seus promotores ainda é insipiente, especialmente em eucalipto.

No presente projeto, uma etiqueta de sequência expressa (EST) identificada no banco de dados do Projeto EST do Eucalipto (Forests), e validada como apresentando expressão específica em raiz de eucalipto, foi usada como ponto de partida para a clonagem e caracterização da região promotora correspondente. Esse EST codifica uma putativa aquaporina intrínseca de tonoplasto (TIP), cujo gene foi denominado *EgTIP2* (Rodrigues, 2010).

Nos vegetais, a atividade das aquaporinas (canais de água) possibilita aumento da permeabilidade da água nas membranas (Ohshima *et al.*, 2001), o que constitui um passo importante em vários processos fisiológicos, como alongamento celular, a germinação das sementes, e osmorregulação (Maurel, 2007).

Uma vez que a raiz pode ajustar finamente a sua condutividade hidráulica em resposta as alterações ambientais, tais como um aumento da salinidade do solo, carências nutricionais, ciclos de dia e noite, ou anaerobiose (Gomes *et al.*, 2009), acredita-se que as aquaporinas estejam envolvidas nessa regulação (Heymann & Angel, 1999), sendo consideradas canais multifuncionais. Várias aquaporinas têm sido associadas à germinação e ao processo de amadurecimento dos frutos. Nestes casos, compostos osmoticamente ativos são gerados e distribuídos, ou ainda, grandes quantidades de precursores são transportadas para dentro das células e tecidos (Schaffner, 1998).

Pela sua atuação como canal de água, as aquaporinas poderiam contribuir para a tolerância à seca, facilitando transporte da água entre os diferentes órgãos e preservando a homeostase hídrica no nível celular (Kjellbom *et al.*, 1999; Tyerman *et al.*, 2002). Segundo resultados obtidos por Aharon e colaboradores (2003), o transporte de água mediado pelas aquaporinas da membrana plasmática representa um fator limitante para o crescimento das plantas e vigor sob condições favoráveis e que, mesmo plenamente irrigadas, as plantas enfrentam limitado transporte de água. Em contrapartida, o reforço desse transporte através da superexpressão de aquaporinas da membrana plasmática não apresenta qualquer efeito

benéfico em plantas transgênicas de tabaco submetidas a estresse salino, chegando a ter um efeito deletério durante o estresse hídrico (Aharon *et al.*, 2003).

A disponibilidade de um gene com expressão específica em raiz de eucalipto representa uma ótima oportunidade para empreender estudos visando a obtenção de promotores tecido-específicos nessa importante espécie. No presente trabalho, a caracterização funcional do promotor do gene *EgTIP2*, com expressão específica em raiz, foi empreendida empregando plantas transgênicas de tabaco. Em paralelo, a expressão do referido gene em resposta ao estresse osmótico foi investigada em eucalipto. Um levantamento dos genes codificando TIPs no genoma de eucalipto foi realizado e as relações filogenéticas destes com outros codificando TIP foram estudadas.

CAPITULO 1- Análise filogenética da aquaporina putativa de Eucalipto

1) INTRODUÇÃO

1.1 Origem das Famílias Gênicas

No curso da história evolutiva, o gene e suas regiões regulatórias sofrem uma variedade de modificações, incluindo substituições nucleotídicas, duplicações, recombinações e eventos de reparo (Liberles, 2001). Existem vários tipos de duplicação gênica, que se classificam conforme a extensão da região genômica envolvida. Segundo Thompson (2006), a duplicação gênica completa produz duas cópias idênticas e estas sequências podem evoluir de diferentes formas: uma das cópias pode originar um pseudogene por apresentar mutações deletérias (pseudofuncionalização); ou ambas podem ser repetidas. A preservação pode levar à persistência das duas cópias com similaridade de sequência, à subfuncionalização (onde cada cópia adota algumas das características do ancestral) ou à neofuncionalização (quando um gene mantém a função original, enquanto o outro adquire uma nova função) (Gonzalez-Duarte & Albalat, 2005). Assim a duplicação gênica pode dar origem a novidades genéticas, produzindo novos genes.

A redundância do material genético é uma das mais peculiares características de todos os genomas, sendo que esta aumenta com o tamanho e a complexidade do genoma (Santamaria *et al.*, 2004). Em regiões codificadoras, os genes podem ser duplicados ou retrotranspostos criando genes parálogos que se agrupam em famílias. Genes que possuem a mesma origem são chamados de homólogos, podendo ser classificados em ortólogos, se sua divergência é devido à especiação, ou parálogos, se eles se originaram da duplicação gênica. Alguns parálogos podem manter a mesma função que o gene ancestral, enquanto outros podem adquirir novas funções (Doyle & Gaut, 2000). Assim, a redundância gênica é um importante mecanismo na evolução, podendo criar inovações. Neste cenário, o entendimento das funções específicas de cada membro de uma família gênica, bem como a comparação das

mesmas entre as várias espécies, constitui um problema altamente relevante (Santamaria et al., 2004).

A duplicação de genes em genomas de eucariotos leva a formação de famílias gênicas com número e tamanho variáveis de membros, os quais podem adquirir funções no espaço (diferentes tecidos, células ou organelas) e no tempo (diferentes estágios do desenvolvimento) (Wagner, 2002). A homologia de sequências entre membros de uma mesma família multigênica depende principalmente de taxas relativas de ocorrência de mutações e eventos ilegítimos de crossing-over, além de ser influenciada em alguma extensão pela seleção natural e deriva genética (Wagner, 2002; ohta, 2003). Além disso, genes pertencentes às famílias multigênicas estão, usualmente, sob o mesmo controle regulatório. Portanto, é interessante estudar como diferentes padrões de expressão são adquiridos.

Muitos genes nucleares são membros de famílias multigênicas, sendo que a formação dessas famílias deve ter sido fundamental na evolução de plantas. A recorrência de duplicação e a divergência funcional têm gerado as famílias gênicas atuais. Vários estudos têm sido conduzidos a fim de avaliar a dinâmica evolutiva das famílias gênicas em plantas, incluindo aqueles que codificam proteínas regulatórias, proteínas de choque térmico e as proteínas de ligação á clorofila a e b, entre outras. A maioria dessas famílias possui diversos loci e apresenta uma grande variação no número de cópias entre as espécies. As famílias gênicas em plantas variam de pequenas famílias com poucos loci, como muitas enzimas metabólicas das famílias ADH e RBCS, a grandes famílias com centenas de loci, como as proteínas de choque térmico. Análises filogenéticas indicam que muitas dessas variações podem ser atribuídas à duplicação recente. Assim, a dinâmica evolutiva dessas famílias apresenta flutuações no número de cópias através de eventos múltiplos de duplicação e deleção (Morton et al., 1996). No entanto, os processos evolutivos que controlam a estrutura dinâmica da tais famílias são relativamente pouco compreendidos (Small e Wendel, 2000a).

1.2 Aquaporinas e suas relações filogenéticas

As aquaporinas foram primeiramente identificadas como proteínas de canal de água e apresentam, nestes aspectos, uma notável eficiência no transporte. Aquaporinas têm também uma seletividade iônica rigorosa, e são, em particular, totalmente impermeáveis a prótons. Algumas aquaporinas também podem ser permeadas por pequenos solutos neutros ou por gases interferindo nas respostas fisiológicas em plantas.

Até agora, um corpo substancial de evidências mostra que aquaporinas em plantas estão envolvidas na captação de água pelas raízes (Javot *et al.*, 2003, Siefritz *et al.*, 2002), na reprodução (Bots *et al.*, 2005), no alongamento das células (Hukin *et al.*, 2002), fotossíntese e germinação das sementes (Vander Willigen *et al.*, 2006). Essas proteínas têm atraído a atenção de biólogos, inicialmente devido a sua abundância no plasma e membranas intracelulares de células vegetais e, posteriormente, devido as suas propriedades únicas de transporte de águas e soluto. A aquaporina (AQPS) é uma proteína integral de membrana que facilita o transporte de pequenas moléculas, como água e glicerol, ou substâncias voláteis como o CO₂ ou NH₃ (Biela *et al.* 1999, Uehlein *et al.* , 2003). Além disso, a atividade de transporte intrínseca das aquaporinas é regulada pelo seu estado de fosforilação e os parâmetros celulares, incluindo prótons citosólica (H) e cálcio (CA₂).

As aquaporinas em plantas são mais abundantes e apresentam maior diversidade do que nos animais ou bactérias. Estas pertencem à família de proteínas MIP (major intrinsic protein). São proteínas altamente hidrofóbicas que apresentam seis domínios transmembrana e massas moleculares de 26 a 34 kDa. O sequenciamento dos genomas de Arabidopsis e arroz estabeleceu o número dos genes que codificam aquaporina como sendo: 35 em Arabidopsis (Johanson *et al.*, 2001, Quigley *et al.*, 2001) e 33 em arroz (Sakurai *et al.*, 2005). Além disso, projetos de sequenciamento de ESTs permitiram a identificação de 36 isoformas de aquaporinas em milho (Chaumont *et al.*, 2001), enquanto que 28 foram anotadas no genoma da uva (Fouquet *et al.*, 2008). Além disso, um total de 55 genes de MIPs foi identificado em

Populus, sendo este o maior número de genes identificado em uma única espécie até a presente data (Gupta & Sankararamakrishnan, 2009).

A estrutura principal, o substrato de transporte, a regulação funcional, o perfil de expressão gênica, bem como a abundância e localização intracelular das aquaporinas são altamente diversificados (Maeshima & Ishikawa, 2008). Com base na homologia de sequência, as aquaporinas de plantas superiores formam quatro subfamílias, que correspondem à suas diferentes localizações sub-celulares (Figura 01) (Johanson *et al.*, 2001, Quigley *et al.*, 2001, Chaumont *et al.*, 2001) sendo elas: proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs) e proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs), que juntas representam vias centrais transcelular e intracelular de transporte de água (Maurel *et al.*, 2002, Wallace *et al.*, 2006); proteínas intrínsecas com similaridade a nodulina 26 (NIPs), abundante em nódulos formadores por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja (Wallace *et al.*, 2006); pequenas proteínas intrínsecas básicas (SIPs) (Johanson & Gustavsson, 2002), que são, na sua maioria, localizadas no retículo endoplasmático (ER) (Ishikawa *et al.*, 2005) e as proteínas intrínsecas X (XIPs) (Danielson & Johanson, 2008), as quais ainda não têm sua localização definida.

As TIPs, foco do presente trabalho, participam do fluxo de água e de pequenos solutos em toda a membrana vacuolar (tonoplasto), podendo desempenhar um papel central na osmorregulação celular (Maurel *et al.* 1997; Tyerman *et al.*, 1999). Segundo estudos de Gerbeau e colaboradores (1999), além de seu papel como canal de água, algumas TIPs podem desempenhar um papel importante no equilíbrio das concentrações de uréia entre o vacúolo e o citoplasma. Além disso, elas podem estar envolvidas na desintoxicação do citoplasma por um mecanismo de armadilha ácida, que facilita o transporte de amônia, como sugerido por Loque *et al.* (2005). Existem cinco grandes grupos na subfamília das TIP: TIP1 (nome anterior, TIP- γ), TIP2 (δ TIP), e TIP3 (TIP- α), além TIP4 e TIP5 (Figura 01). Os membros dos grupos TIP1, TIP2 e TIP4 têm sido localizados nas membranas de vacúolos centrais, enquanto que os membros do grupo TIP3 estão localizados na membrana dos corpos

protéicos (Jiang *et al.*, 2001, Maeshima *et al.*, 1994, Maeshima, 2001). Os membros da subfamília TIP têm especificidades próprias de substratos, incluindo água, amônia (membros TIP2), uréia (membros da TIP1, TIP2 e TIP4 grupos) e glicerol (TIP tabaco) (Maeshima & Ishikawa, 2008).

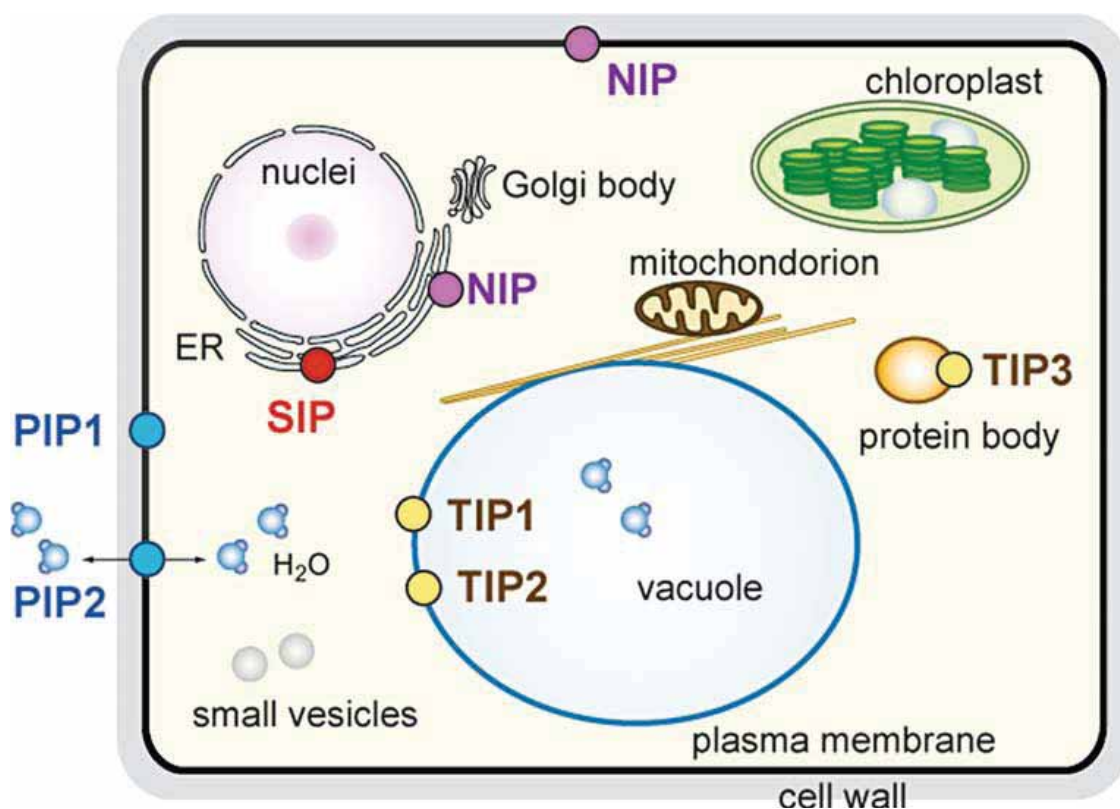


Figura 01. Diagrama esquemático da localização dos membros das diferentes subfamílias de aquaporinas em planta. PIPs são localizadas na membrana plasmática, TIPs na membrana vacuolar e na membrana de corpos protéicos (protein body), SIP na membrana do retículo endoplasmático (ER), e NIP na membrana plasmática e ER (Maeshima & Ishikawa, 2008).

Todos os membros de todas as quatro subfamílias das aquaporinas de planta apresentam atividade de canal de água, cuja permeabilidade pode ser considerada alta ou apenas residual (Takano *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 2005, Biela *et al.*, 1999, Dean *et al.*, 1999, Gerbeau *et al.*, 1999). Portanto, o uso do nome genérico aquaporina parece ser justificado para todos os homólogos presentes em planta. Devido a elevada plasticidade genômica, as aquaporinas dificilmente se distinguem entre as espécies vegetais (Johanson *et al.*, 2001, Sakurai *et al.*, 2005, Chaumont *et al.*, 2001).

1.2 Estrutura e seletividade das Aquaporinas

As estruturas terciárias da aquaporina 1 (AQP1), uma aquaporina específica de mamífero, e da Glyceroporina de *Escherichia coli* (GlpF) foram resolvidas em resolução atômica por cristalografia de raios X (Fu et al, 2000; Sui et al, 2001). A comparação dessas estruturas serviu de suporte para a hipótese de que os membros da família MIP compartilham um ancestral comum (Reizer et al., 1993) e adotam uma dobra em forma de ampulheta comum (Jung et al., 1994). A estrutura em forma de ampulheta das MIPs revela uma organização homotetramérica composta por quatro monômeros idênticos cada um deles comportando-se como um poro funcional independente. Os monômeros interagem com dois dos seus vizinhos e formam o tetrâmero com um poro central que exclui moléculas de água (Murata et al., 2000).

Aquaporinas são proteínas pequenas com menos de 300 aminoácidos, com seis hélices transmembrana altamente hidrofóbicas (1 a 6), organizadas em duas metades distintas (2, 1, 3 e 5, 4, 6) que formam o conjunto de um canal. As hélices estão conectadas por cinco regiões de laço (loops A a E) com as sequências N- e C-terminais localizadas no lado citoplasmático da membrana. Três dos *loops* de ligação estão localizados no lado exoplasmático (A, C, E) e os outros dois no lado citosólico (B e D). Os *loops* B e E contêm os motivos NPA (tripleto Asn-Pro-Ala) que são parte da assinatura da superfamília MIP (Figura 02 – Preston et al., 1994).

Tem sido proposto que as regiões Asn-Pro-Ala (NPA) e ar / R de aquaporinas exercem uma grande influência sobre a especificidade para o substrato (Wallace e Roberts, 2004; Forrest e Bhave, 2007). A região NPA é formada pela justaposição estreita das asparaginas nos dois motivos NPA no centro dos poros. Estes resíduos de asparagina formam os contatos de ligação de hidrogênio com as moléculas transportadas ou outras moléculas de soluto, e pode desempenhar um papel na exclusão de prótons (Tajkhorshid et al, 2002;. Ilan et al, 2004;. Forrest e Bhave, 2007). Já o chamado filtro aromático / arginina (ar / R) consiste de

uma tétrede formada por dois resíduos das hélices 2 (H2) e 5 (H5) e dois resíduos do *loop* E (LE1 e LE2- Agre & Kozono,2003; Stroud et al, 2003). Acredita-se que a região do filtro ar / R sirva como um filtro de seletividade para o transporte de substratos, determinando a taxa de transporte, e atuando como uma barreira de exclusão de tamanho que bloqueia estereoquimicamente o transporte dos substratos volumosos. Esta região estabelece pontes de hidrogênio e ligação de van der Waals com os solutos transportados e / ou moléculas de água (Fu et al, 2000; Sui et al, 2001).

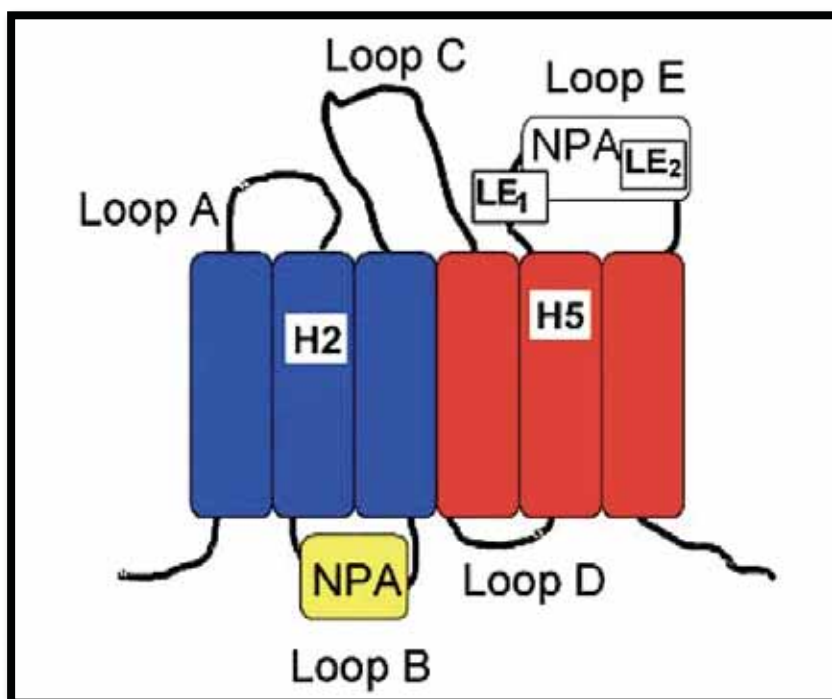


Figura 02. Topologia geral conservada na família MIP (Wallace and Roberts, 2004). Cada região NPA esta coordenada com α -hélices transmembranas. As hélices de 1-3 e o primeiro NPA no *loop* B estão representados em azul e amarelo, respectivamente, já as hélices transmembranas de 4 a 6 e a segunda região NPA no *loop* E se apresentam em vermelho e branco, respectivamente. As posições relativas dos quatro resíduos de H2, H5, e do loop E (LE1 e LE2) que compreendem a tétrede ar / R estão indicadas.

A região do filtro ar / R é um ponto crítico que influencia a seletividade de transporte das MIPs. Os membros da superfamília MIP de espécies animais e microbianas em geral, possuem um dos dois tipos de regiões ar / R, as quais apresentam características conservadas nas aquaporinas ou glyceroporinas (Thomas et al., 2002). Em contraste, com base no

alinhamento de sequências e a modelagem molecular das MIPs de Arabidopsis, a existência de uma maior diversidade estrutural nas sequências determinantes no poro foi sugerida. As várias MIPs podem ser separadas em oito distintos grupos ar / R, o que provavelmente ajuda na determinação da arquitetura do poro e nas propriedades funcionais de cada proteína (Tabela 01- adaptada de Wallace e Roberts, 2004).

Tabela 01. Assinatura conservada do filtro ar / R de MIPs de Arabidopsis (Wallace and Roberts, 2004). As designações em negrito representam cada uma das subfamílias de MIPs de planta como descrito por Quigley et al. (2001) e Johanson et al. (2001). Abaixo de cada título, subcategorias ar / R são listadas com base no membro representante de cada subfamília. Os resíduos conservados em cada posição da tétrade do filtro ar / R baseado em alinhamento de sequências e modelagem de homologia estão listados. O desvio rms do esqueleto de α -carbono do modelo de homologia das MIPs indicada a partir da espinha dorsal do molde AQP1 está listado.

Subfamília MIP	ar/R Subgrupo	H2	H5	LE1	LE2	rms Deviation (Å)
PIP		F	H	T	R	0.91
TIP	Grupo I	H	I	A	V	0.67
	Grupo IIA	H	I	G	R	1.03
	Grupo IIB	H	I	A	R	0.72
	Grupo III	N	V	G	C	1.56
NIP	Grupo I	W	I, V	A	R	0.92
	Grupo II	A	I, V	A ou G	R	0.97
SIP	Grupo I	T	F, V, I	P	I	1.39
	Grupo II	S	H	G	A	1.86

2)OBJETIVO

O objetivo geral desse capítulo foi o de estudar as relações filogenéticas do gene *EgTIP2*, previamente minerado no banco de ESTs do eucalipto, bem como de outros genes codificadores de TIP identificados no genoma eucalipto.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Banco de Dados

Genes que codificam aquaporinas intrínsecas de tonoplasto (TIP) foram identificados no genoma de *Eucalyptus grandis* por pesquisas usando a ferramenta BLAST no Browser v9.0 Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein et al. 2012) e no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Neste caso, as sequências de aminoácidos das proteínas TIP de Arabidopsis (AtTIP1.1, AtTIP1.2, AtTIP1.3, AtTIP2.1, AtTIP2.2, AtTIP2.3, AtTIP3.1, AtTIP3.2, AtTIP4.1, AtTIP5.1), bem como a de EgTIP2 foram usadas como iscas.

Os bancos de dados usados como fontes para obtenção das sequências protéicas e de nucleotídeos foram: GenBank do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) para as sequências de Arabidopsis, carvalho e uva, e o *Joint Genome Institute* (JGI) para buscar as sequências de *Populus* e o RCSB Protein Data Bank (PDB) fornecendo dados estruturais para as modelagens protéicas. As sequências utilizadas nas análises filogenéticas foram obtidas no formato FASTA. As descrições e autores referenciados para as famílias gênicas obtidas nos artigos durante as revisões bibliográficas foram usados como palavras-chave para as buscas.

Foi selecionado um total de 41 sequências representando diferentes grupos de TIP, 3 sequências de TIPs de carvalho (*Quercus petraea*; QqTIP1.1/ JQ846274, QqTIP2.1/ JQ846275, QqTIP2.2/ JQ846276; Rasheed-Depardieu *et al.*, 2012), 11 sequências de TIPs de uva (*Vitis vinifera*; VvTIP1.1/ CAO69259, VvTIP1.2/ CAO63006, VvTIP1.3/ CAO16745, VvTIP1.4/ CAO21720, VvTIP2.1/ CAO45860, VvTIP2.2/ CAO23095, VvTIP2.3/ CAO50033, VvTIP3.1/ CAO62035, VvTIP4.1/ CAO44039, VvTIP5.1/ CAO42713, VvTIP5.2/ CAO70596; Sheldon *et al.*, 2009), 17 sequências de TIPs de *Populus trichocarpa*; PtTIP1.1/549212, PtTIP1.2/833283, PtTIP1.3/822504, PtTIP1.4/656044, PtTIP1.5/667870, PtTIP1.6/589502, PtTIP1.7/558321, PtTIP1.8/828458, PtTIP2.1/548890,

PtTIP2.2/645978, PtTIP2.3/817166, PtTIP2.4/676397, PtTIP3.1/584517, PtTIP3.2/811826, PtTIP4.1/561759, PtTIP5.1/414059, PtTIP5.2/423803; Gupta & Sankararamakrishnan, 2009) e 10 sequências de TIPs de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; AtTIP1.1/ AAD31569, AtTIP1.2/ BAB01832, AtTIP1.3/ T01947, AtTIP2.1/ BAB01264, AtTIP2.2/ F71442, AtTIP2.3/ BAB0907, AtTIP3.1/ AAF18716, AtTIP3.2/ AAF97261, AtTIP4.1/ AAC42249, AtTIP5.1/ T12999 ;Quigley *et al.*, 2001). Essas sequências foram inicialmente utilizadas para classificar e estudar as relações filogenéticas do gene minerado no banco FORESTs (*EgTIP2*), e posteriormente, dos demais genes identificados em eucalipto.

3.2 Alinhamento das Sequências geradas e Análise Filogenética

As sequências foram alinhadas através do programa CLUSTAL W (Jeanmougin, 1998), a filogenia e as análises evolucionárias foram conduzidas utilizando-se o pacote MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). As predições das regiões transmembrânicas foram realizadas no servidor TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993) disponível em http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html.

As filogenias foram estimadas empregando as sequências protéicas alinhadas e utilizando o método de *Neighbor-Joining*, o qual é mais vantajoso para reconstrução de árvores filogenéticas sem raiz a partir de uma matriz de distâncias e de acordo com o princípio da evolução mínima (*minimum evolution*) (Saitou & Nei, 1987).

A reconstrução filogenética foi realizada de modo que uma árvore foi gerada usando sequências de aquaporinas de monocotiledônea (*Arabidopsis*) e dicotiledôneas (*Populus*, carvalho e uva) juntamente com aquaporinas putativas de eucalipto. Como teste de confiança utilizou-se a metodologia de bootstrap para 1000 réplicas.

3.3 Modelagem por homologia

A modelagem por homologia da aquaporina EgTIP2 foi realizada no servidor SWISS-MODEL Workspace (Arnold *et al.*, 2006) e visualizada e editada nos algoritmos Swiss-PdbViewer 4.1.0 e RasMol 2.7.5.2

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estruturas tridimensionais de proteínas são essenciais para a compreensão da função da proteína a um nível molecular. Para tal, as técnicas de modelagem comparativa podem fornecer os modelos mais precisos em casos onde as estruturas experimentais relacionadas com a proteína de interesse estavam disponíveis. A arquitetura das aquaporinas tem sido descrita como uma estrutura em forma de ampulheta composta de quatro unidades funcionais que funcionam como canais de água, sendo esta estrutura altamente conservada dentre essas proteínas nos diferentes organismos. Deste modo, a análise da estrutura dos monômeros obtida para a aquaporina putativa de eucalipto em estudo corrobora a idéia de que esta proteína corresponde a uma proteína transportadora de água da superfamília MIP.

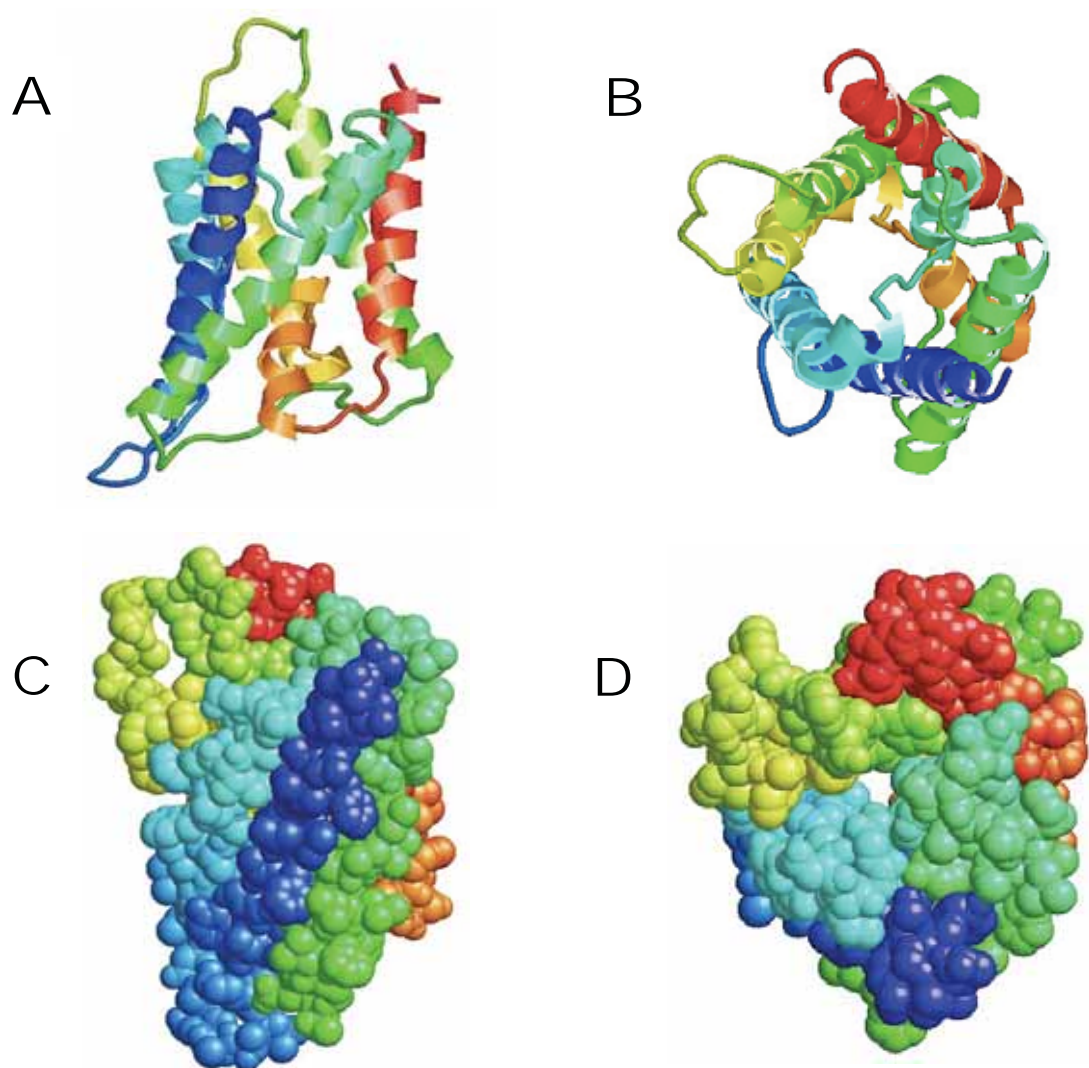


Figura 03. Representação gráfica do monômero da aquaporina de *E. grandis* em estudo em vista longitudinal (A) e transversal (B). Modelagem da superfície do monômero em vista longitudinal (C) e transversal (D).

No genoma de *Eucalyptus grandis* (Browser v9.0 Phytozome) foram identificadas cinco sequências com similaridade à aquaporinas da subfamília TIP a partir de BLAST utilizando sequências de *A. thaliana* como iscas. Com base na análise filogenética e similaridade com as sequências padrão de Arabidopsis, os genes identificados como AQP de eucalipto foram nomeados de acordo com a nomenclatura padrão para MIPs. Diante do exposto, os genes identificados foram classificados como: uma TIP1 (TIP1,1), uma TIP2

(TIP2,1), uma TIP3 (TIP3,1), uma TIP4 (TIP4,1) e uma TIP5 (TIP5, 1), sendo portanto, um integrante de cada um dos cinco grupos constituintes dessa subfamília. De um modo geral, a construção da árvore filogenética confirmou a nomenclatura proposta a partir das sequências de *Arabidopsis*, e demonstrou ainda que essas sequências apresentam maior similaridade com as sequências de uva e álamo (*Populus*).

Em análises prévias verificou-se que a sequência de aminoácidos da proteína de eucalipto (cujo EST foi minerado no banco FORESTs) apresenta mais de 80 % de identidade com as aquaporinas do grupo 2 da subfamília TIP dentre as demais TIPs dispostas no banco de dados de proteínas do NCBI. Compartilha similaridade com as TIPs de grupo 2 de *Arabidopsis*, álamo e mais estritamente de uva e carvalho. Devido ao fato das OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) relativas à EgTIP 2.1 de eucalipto e 2.1 de carvalho estarem agrupadas juntas na árvore gerada (Figura 04), nos leva a acreditar que ambas compartilhem da mesma função fisiológica, cada qual em sua respectiva espécie.

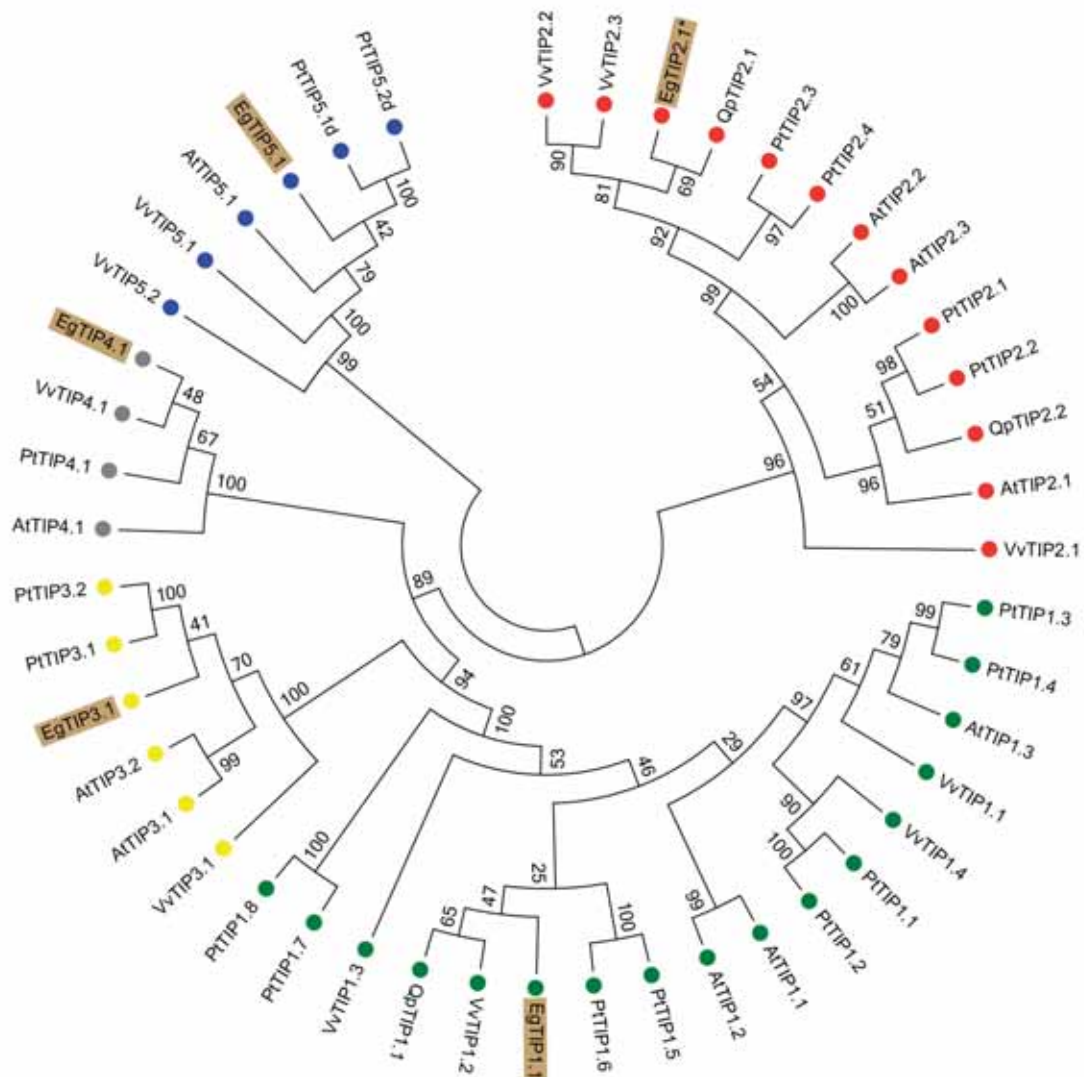


Figura 04- Árvore filogenética construída a partir de sequências de aminoácidos de aquaporinas da subfamília TIP(*tonoplast intrinsic proteins*) de *Arabidopsis thaliana*, *Quercus petraea*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* e a sequência em estudo (*EgTIP2), assim como outras 4 sequências de TIP proveniente de *Eucalyptus grandis*, destacadas em marrom. Análise realizada usando Neighbor-Joining, com 1000 réplicas de bootstrap.

Quando a sequência deduzida de aminoácidos de EgTIP2 foi alinhada com as de outras TIPs de grupo 2 das espécies vegetais utilizadas na construção da árvore foi possível confirmar a presença, em EgTIP2, de oito segmentos conservados que definem a arquitetura do núcleo de seis hélices transmembranares e dos dois laços funcionais B (LB) e E (LE) (Figura 05). Estes se projetam para dentro do plano da membrana e, somados aos resíduos da

tétrade que compõem a região do filtro ar/R, satisfazem a arquitetura de uma aquaporina típica.

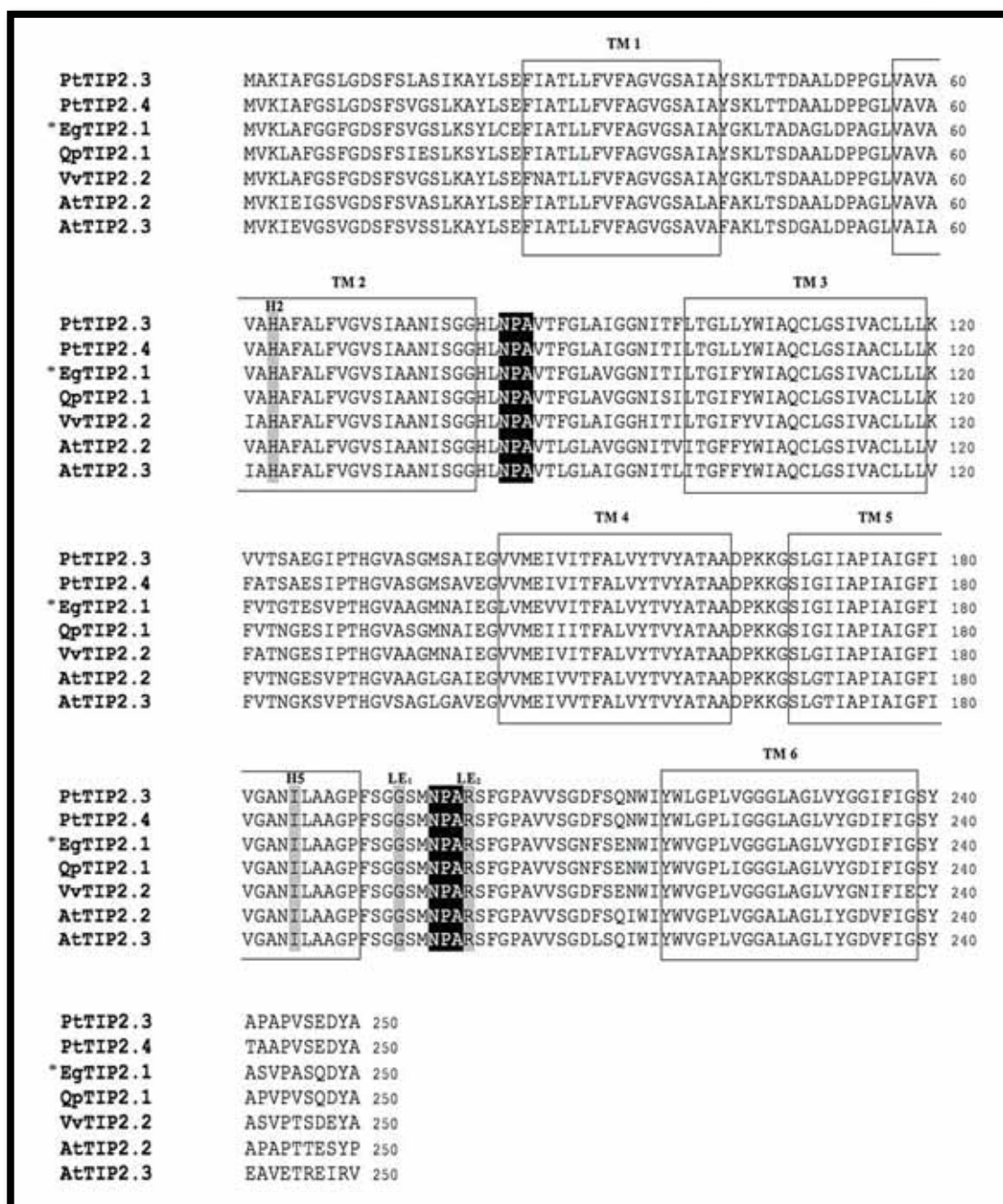


Figura 05. Alinhamento comparativo de seqüências preditas de aminoácidos da proteína EgTIP2 (*) de *Eucalyptus grandis* com outras TIP2 de espécies representativas em plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Quercus petraea*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*). Retângulos representam as hélices transmembrânicas preditas. Os resíduos correspondentes aos sítios canônicos NPA estão marcados em preto. Os aminoácidos conservados tipicamente encontrados na região de constrição do poro (filtro seletivo aromático/Arginina) estão marcados em cinza.

O filtro de seletividade, uma região de constrição formada por quatro resíduos perto da entrada extracelular, fornece características distintivas que identificam as diferentes subfamílias de aquaporinas. Com base na comparação dos resíduos de aminoácidos presentes na região do filtro de seletividade (ar/ R), os membros das quatro subfamílias filogenéticas das aquaporinas de *Arabidopsis* puderam ser classificados em oito grupos (Wallace & Roberts, 2004). Utilizando-se desse mesmo padrão, a aquaporina de eucalipto em estudo foi classificada como uma TIP pertencente ao grupo IIA por apresentar uma combinação específica dos resíduos His na posição da hélice H2, Ile na posição da hélice H5, Gly em LE1 e Arg em LE2 (Figura 6). Cabe salientar que nas TIPs do grupo II, os resíduos presentes no LE do filtro ar / R incluem uma Arg altamente conservada em LE2, como em outras aquaporinas, contudo uma Ala (Grupo IIB) ou Gly (Grupo IIA) encontra-se presente na posição de LE1.

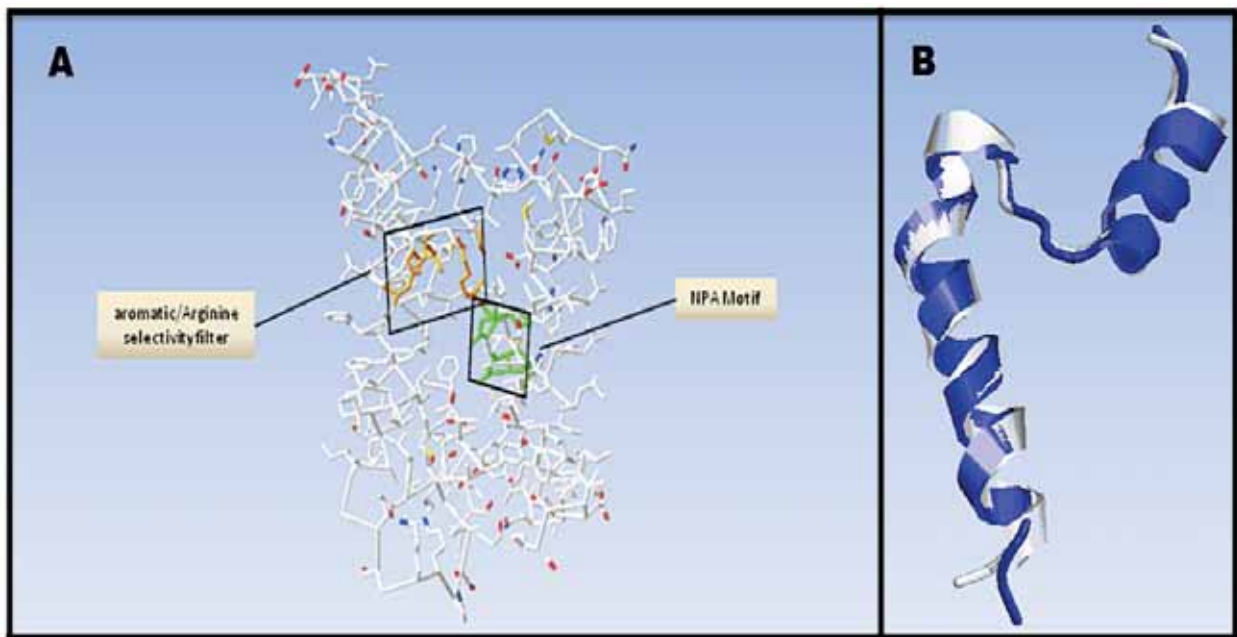


Figura 06. Análise estrutural da TIP2 de *E. grandis*; A) modelo tridimensional do transportador EgTIP2 em vista perpendicular ao poro enfocando os motivos NPA e o filtro seletivo aromático/Arginina; B) superposição estrutural da porção seletiva do canal TIP2 de *E. grandis* (em branco) e PIP2 de *Spinacia oleracea* (em azul) (PDB – 2B5F) cuja estrutura foi resolvida experimentalmente.

A presença de resíduos de aminoácidos envolvidos na especificidade do transporte de água, incluindo os resíduos da região ar / R correspondente ao filtro seletivo e os domínios conservados NPA, identificados na EgTIP2.1, sugerem que essa putativa AQP de eucalipto exibe atividade de canal de água.

As demais funções dessa aquaporina de eucalipto ainda precisam ser estudadas, visto que as aquaporinas da subfamília TIP apresentam diversas funções além de regulador no transporte de água vacuolar (Chrispeels & Maurel, 1994; Maurel, 1997). Estudos demonstraram, por exemplo, que as TIP1 e TIP2 podem interagir com a proteína 1a do vírus do mosaico do pepino (CMV) no sistema Sos de recrutamento nas membranas do vacúolo. Provavelmente essas proteínas TIP1 e TIP2 participam especificamente no processo de ancoragem do complexo de replicação viral ao tonoplasto (Kim *et al.*, 2006). Já em *Arabidopsis*, dois genes que codificam aquaporinas de tonoplasto, *AtTIP2;1* e *AtTIP2;3*, foram descritos como envolvidos no transporte de metilamônia ou amônia para fora do citoplasma (Loqué *et al.*, 2005).

5) CONCLUSÃO

As análises filogenéticas conduzidas nesse trabalho permitem classificar a proteína codificada pelo gene *EgTIP2* como uma aquaporina pertencente à subfamília TIP do grupo IIA. A análise da estrutura modelada indica que *EgTIP2* apresenta todas as características estruturais requeridas para atuar como um canal de água. Além disso, a análise realizada permitiu identificar ao menos 5 diferentes genes codificando TIPs no genoma de eucalipto.

CAPITULO 2 – Caracterização Molecular de *EgTIP2* e resposta ao estresse osmótico

1) INTRODUÇÃO

1.3. As aquaporinas e os estresses abióticos

A percepção de estresses abióticos e a transdução de sinais são passos importantes na determinação da sobrevivência e na reprodução de plantas expostas a diferentes ambientes (Chinnusamy *et al.*, 2004). A comparação da expressão gênica em diferentes células, tecidos e tratamentos, fornecem informações importantes para a análise e a compreensão de processos biológicos que controlam as respostas dos organismos às diferentes situações (Liang & Pardee, 1995) (Figura 07).

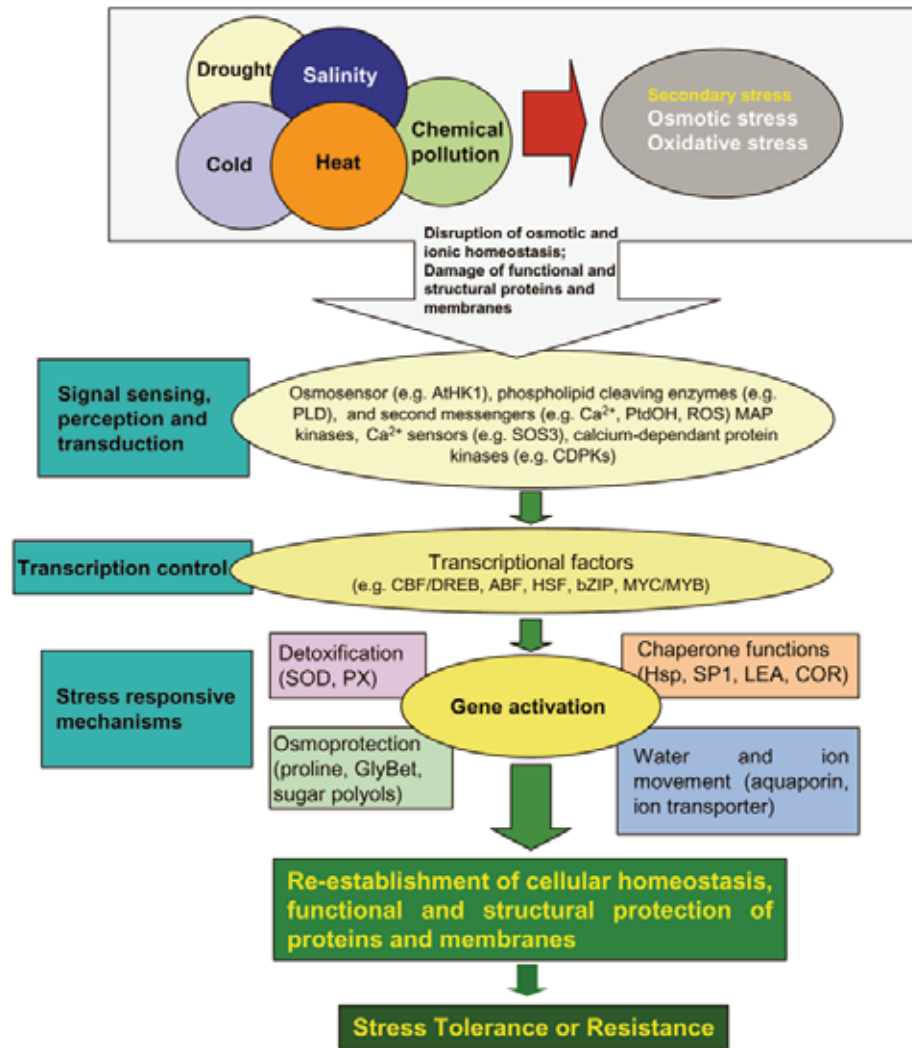


Figura 07. Complexidade da resposta das plantas aos estresses abióticos. Estresses primários, como seca, salinidade, calor, frio e poluição química são frequentemente interligados, e causam dano celular e estresses secundários, como osmótico e oxidativo. Os sinais iniciais de estresse desencadeiam processos de sinalização que culminam em alterações de expressão gênica que irão ativar mecanismos de resposta para restabelecer a homeostase e proteger e reparar proteínas e membranas danificadas. Respostas inadequadas a um, ou vários passos, da via de sinalização e da regulação gênica podem resultar em alterações irreversíveis na homeostase celular, levando a célula morte (Wang *et al.*, 2003).

Neste contexto, diferentes estudos de expressão gênica em diversas espécies de plantas têm mostrado respostas variáveis de isoformas de aquaporina ao estresse hídrico, evidenciando tanto um aumento, quanto uma diminuição na expressão gênica (Yamada *et al.*, 1997; Mariaux *et al.*, 1998; Sarda *et al.*, 1999; Suga *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2004; Alexandersson *et al.*, 2005). Nas folhas, raízes e ramos de oliveira (*Olea europaea*), por

exemplo, a expressão dos genes *OePIP1; 1*, *OePIP2; 1*, e *OeTIP1; 1* foi significativamente reduzida após 3 e 4 semanas de retirada da água (Secchi *et al.*, 2007). Diversas evidências na literatura sugerem que os genes TIP estão associados com a tolerância das plantas aos estresses abióticos, especialmente seca e salinidade. No entanto, a relação entre TIPs e a tolerância das plantas aos estresses abióticos permanece ambígua. Evidências experimentais revelam que os níveis de expressão de genes TIP são regulados de forma espacial e temporal, e por condições de estresse variadas (Ludevid *et al.*, 1992; Boursiac *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2005. Li *et al.*, 2008b, 2009; Liu *et al.*, 2008).

A regulação rápida de cada um dos genes que codificam aquaporina em resposta ao estresse salino ou seca tem sido relatada em várias espécies (Yamada *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2000;. Kawasaki *et al.*, 2001; Smart *et al.*, 2001; Maurel *et al.*, 2002). Boursiac e colaboradores (2005) mostraram que a exposição das raízes de *Arabidopsis* ao sal induz mudanças na expressão da aquaporina em vários níveis. Estas alterações incluem uma regulação coordenada da transcrição e realocização subcelulares de ambas as PIPs e TIPs. Estes mecanismos podem agir em conjunto para regular o transporte de água da raiz, principalmente em longo prazo (~ 6 h) (Boursiac *et al.*, 2005).

A regulação transcricional dos genes que codificam aquaporina por hormônios como ácido abísico (ABA) ou GA₃, ou ainda por estímulos ambientais diversos como a baixa temperatura, seca, salinidade, ritmo circadiano, luz e privação ou fornecimento de nutrientes também foi revelada (Figura 07). Essas análises foram realizadas em muitas espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2003; Maathuis *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2004), arroz (Lian *et al.*, 2004), milho (Gaspar *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2003, 2004), cevada (Katsuhara *et al.*, 2002, 2003), rabanete (Suga *et al.*, 2003), noqueira (Sakr *et al.*, 2003). Contudo as aquaporinas também podem ser reguladas em nível pós-traducional, incluindo fosforilação, glicosilação e proteólise (Johansson *et al.*, 2000).

Apesar dos estudos demonstrando que as aquaporinas têm a sua expressão regulada em condições desfavoráveis ao desenvolvimento da planta, os relatos sobre os efeitos de sua

atividade na tolerância das plantas aos estresses abióticos que promovem perda de água, como salinidade e seca, são ainda bastante limitados. Nesse cenário, o presente trabalho busca elucidar a regulação da expressão do gene *EgTIP2*, que codifica uma aquaporina intrínseca de tonoplasto do grupo 2 em *E. grandis*, sob diferentes condições de estresse osmótico e sob tratamento com fitohormônio.

2) OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular do gene *EgTIP2* de *Eucalyptus grandis*. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- A) Investigar a tecido-especificidade do promotor do gene *EgTIP2* empregando plantas de *Nicotiana tabacum* transgênicas.
- B) Analisar a atividade da região promotora do gene *EgTIP2* em resposta ao estresse osmótico e ao ácido abscísico em diferentes linhagens de plantas transgênicas de tabaco.
- C) Investigar o perfil de expressão do gene *EgTIP2* em plantas de *E. grandis* submetidas ao estresse osmótico.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e cultivo das sementes

Utilizou-se sementes de *Nicotiana tabacum* SR1 selvagens assim como 3 linhagens transgênicas transformadas com um cassete de expressão contendo a região promotora do gene *EgTIP2* (aqui denominada AQUA) em fusão com o gene repórter *uidA* que codifica a β -glucuronidase (GUS) (Plantas AQUA:GUS; Rodrigues *et. al.*, 2010) (Figura 08). As linhagens empregadas representam eventos independentes de transformação. Todas as sementes foram inicialmente esterilizadas com embebição em água Milli-Q pelo período de uma hora, e posteriormente colocadas em etanol 70% por 1 minuto e lavadas 2x com água Milli-Q autoclavada. As sementes foram então mantidas em solução de hipoclorito 35% por 7 minutos e lavadas 5x com água Milli-Q autoclavada. Após esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1992) adicionado de 0,23% de Phytigel (Sigma), e mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas de luz artificial e temperatura entre $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

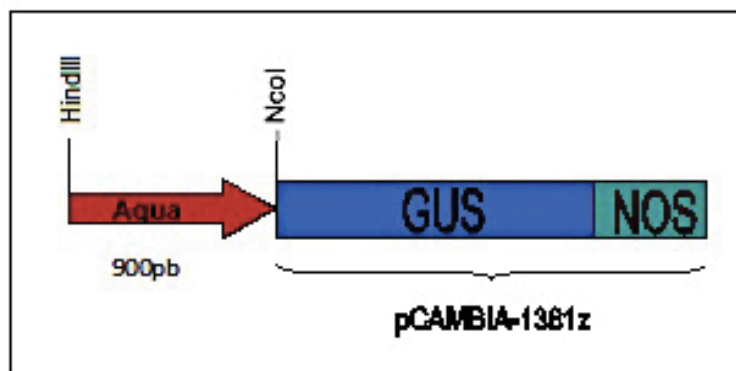


Figura 08. Representação esquemática do cassete de expressão contendo o promotor do gene *EgTIP2* [AQUA; 900 pares de base (pb)] em fusão transcricional com o gene *uidA* (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z. O terminador da nopalina sintetase (NOS) está representado.

Para a realização dos ensaios em eucalipto foram utilizadas mudas de *Eucalyptus grandis* com 2 meses de idade (clone SP0791) fornecidas pela empresa SUZANO PAPEL E CELULOSE e provenientes de área de produção de mudas da empresa em Itapetininga-SP. As mudas encontravam-se acondicionadas em tubetes de polietileno com 30x120 mm de dimensão. Nos ensaios posteriores, essas mudas foram cultivadas em condições hidropônicas em casa de vegetação com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pertencente ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) do Campus de Botucatu-SP.

3.2. Ensaios histoquímicos da atividade GUS

Os ensaios histoquímicos para detecção da atividade GUS nos órgãos/tecidos de tabaco transformado foram realizados empregando-se um substrato halogênico (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide; XGluc), que em contato com a enzima se torna azulado (Jefferson *et al.*, 1987). O objetivo nesse caso foi investigar a especificidade de expressão determinada pelo promotor em estudo em um sistema heterólogo (tabaco). Para tal, plântulas

inteiras de três linhagens transgênicas AQUA:GUS (geração T2), em diferentes fases de desenvolvimento (plântulas apresentando 2, 3, e 4 folhas), foram submetidas ao ensaio GUS. Como controle positivo foram utilizados tabacos transgênicos transformados com um cassete de expressão contendo o promotor constitutivo 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) fusionado transcricionalmente ao gene repórter GUS (cedidos pelo Prof. Dr. Márcio de Castro Silva-Filho – Departamento de Genética - ESALQ-USP). O ensaio histoquímico foi baseado em Jefferson *et al.* (1987) e Lacorte & Romano (1998).

3.3. Análises da região promotora

A sequência de nucleotídeos do promotor do gene *EgTIP2* foi analisada quanto à presença de elementos *cis*-regulatórios utilizando o banco de dados do PlantCARE (a plant *cis*-acting regulatory element database; Lescot *et al.*, 2002).

3.4. Indução de estresse osmótico e tratamento com ácido abscísico

Esses ensaios tiveram por objetivo investigar a resposta da região promotora do gene *EgTIP2* ao tratamento com ácido abscísico e em resposta ao estresse osmótico. Quinze dias após a germinação, as plântulas das linhagens transgênicas foram transferidas para gerbox de polietileno preto fosco contendo solução nutritiva (Hoagland 25%) com oxigenação constante, onde permaneceram por duas semanas para adaptação. Em seguida foram submetidas aos tratamentos com manitol (estresse osmótico) e ABA. Para tal foram adicionados à solução nutritiva 0,1 mM de ABA, 250 mM de manitol ou a combinação de ambos (ABA 0,1 mM e manitol 250 mM), respectivamente. Em todos os casos, as plantas foram acondicionadas a temperatura de 25±2°C em câmara de crescimento sob condições controladas. As plântulas foram coletadas nos tempos 0, 3 e 24 horas para análises posteriores. O tempo 0 (zero) corresponde ao controle não tratado em ambos os experimentos. As concentrações de ABA e manitol foram definidas em testes preliminares realizados por Hussein (2008). O RNA total das plântulas coletadas nos diferentes tempos foi extraído para

posterior quantificação da expressão de GUS por PCR em tempo real (qPCR) como descrito no item abaixo.

3.5. Ensaios de cultivo hidropônico de eucalipto

Esses ensaios visaram determinar as melhores condições para cultivo hidropônico de mudas de eucalipto, tendo em vista que o cultivo hidropônico não é uma técnica comumente utilizada no cultivo de espécies florestais. Para tal, mudas de *E. grandis* foram transferidas para caixas de polietileno prata fosca (23 L), com dimensões de 48 cm de comprimento x 32 cm de largura x 15 cm de altura, contendo solução nutritiva em forma de cultivo hidropônico. Para os testes foram utilizadas diferentes concentrações da solução nutritiva de Hoagland (25, 50, 75 e 100%), empregando um total de 5 mudas de eucalipto para cada concentração testada. As mudas foram acondicionadas em potes confeccionados com garrafas pets (pintadas de prata fosco e contendo tampa) contendo a solução nutritiva a ser testada. As mudas foram mantidas sobre oxigenação constante pelo uso de um borbulhador acoplado a um compressor de ar durante o período de 20 dias (Figura 09). Posteriormente a esse período, o desenvolvimento dessas mudas foi acompanhado para determinar a concentração de solução mais adequada para o cultivo hidropônico de eucalipto.

O valor do pH da solução nutritiva foi monitorado com o uso de um medidor de pH de bancada (Hanna- Modelo pH 21) e ajustado a $5,5 \pm 0,5$, utilizando-se de solução NaOH ou HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Na mesma ocasião foi monitorada a condutividade elétrica da solução nutritiva com um condutivímetro portátil (CG220), mantendo-a com valor inferior a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, $1,5 \text{ dS m}^{-1}$, $1,0 \text{ dS m}^{-1}$, $0,5 \text{ dS m}^{-1}$, conforme indicação de cada concentração da solução de Hoagland (100%, 75%, 50% e 25% respectivamente). Utilizou-se água deionizada para compor a solução nutritiva e para a reposição da água evapotranspirada. A solução nutritiva foi renovada quinzenalmente.



Figura 09. Sistema de cultivo hidropônico de eucalipto em garrafas pets para teste-piloto de adaptação a hidroponia e estabelecimento da melhor concentração da solução de Hoagland para essa espécie.

3.6. Mensuração das trocas gasosas foliares

A avaliação das trocas gasosas foi realizada utilizando-se equipamento de sistema aberto de fotossíntese e transpiração com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Essas medidas foram realizadas no período das 9 às 12 h, as 15 h, as 21 h em dia ensolarado. As medidas foram realizadas num período de 24 horas após início do estresse hídrico e 4 dias após a recuperação desse estresse, selecionando-se 9 plantas (repetições) por tratamento, nas quais foi escolhida e padronizada a 2ª folha completamente expandida. As características de trocas gasosas analisadas foram: taxa de assimilação de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), adotando-se $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (PAR) de luminosidade fixados no aparelho. A eficiência do uso da água (WUE , $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) foi determinada através da relação entre assimilação de CO₂ e taxa de transpiração

(A_{net}/E), descrita por Berry & Downton (1982), e a eficiência instantânea de carboxilação (A_{net}/C_i) determinada através da metodologia descrita por Von caemmerer & Farquhar (1981).

3.7. Indução de estresse osmótico em mudas de Eucalipto

Esses ensaios tiveram por objetivo investigar a expressão do gene *EgTIP2* em resposta ao estresse osmótico curto. Após um mês de adaptação em cultivo hidropônico em solução de Hoagland 75%, as mudas de eucalipto foram submetidas ao tratamento com polietileno glicol 8000 (PEG) para indução de estresse osmótico (Figura 10). As mudas foram transferidas para caixas de polietileno contendo solução nutritiva com adição de 215 g de PEG8000/L, respectivamente, visando atingir o potencial osmótico de -0,6 Mpa de acordo com Villela & Beckert (2001). As mudas foram acondicionadas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em casa de vegetação com condições controladas. As coletas foram realizadas nos tempos 0, 6 e 24 horas de estresse, e uma coleta adicional realizada após um período de recuperação das mudas por quatro dias em solução sem a presença de PEG8000.

Em seguida, o RNA total das raízes das mudas submetidas aos referidos tratamentos foi extraído empregando metodologia descrita no item 3.8 conforme Korimbocus *et al.* (2002). Aliquotas do RNA total extraído foram submetidas à reação de transcrição reversa como descrito no item 3.9, e a quantificação da expressão relativa do gene *EgTIP2* foi realizada por qPCR utilizando oligonucleotídeos específicos para esse gene.

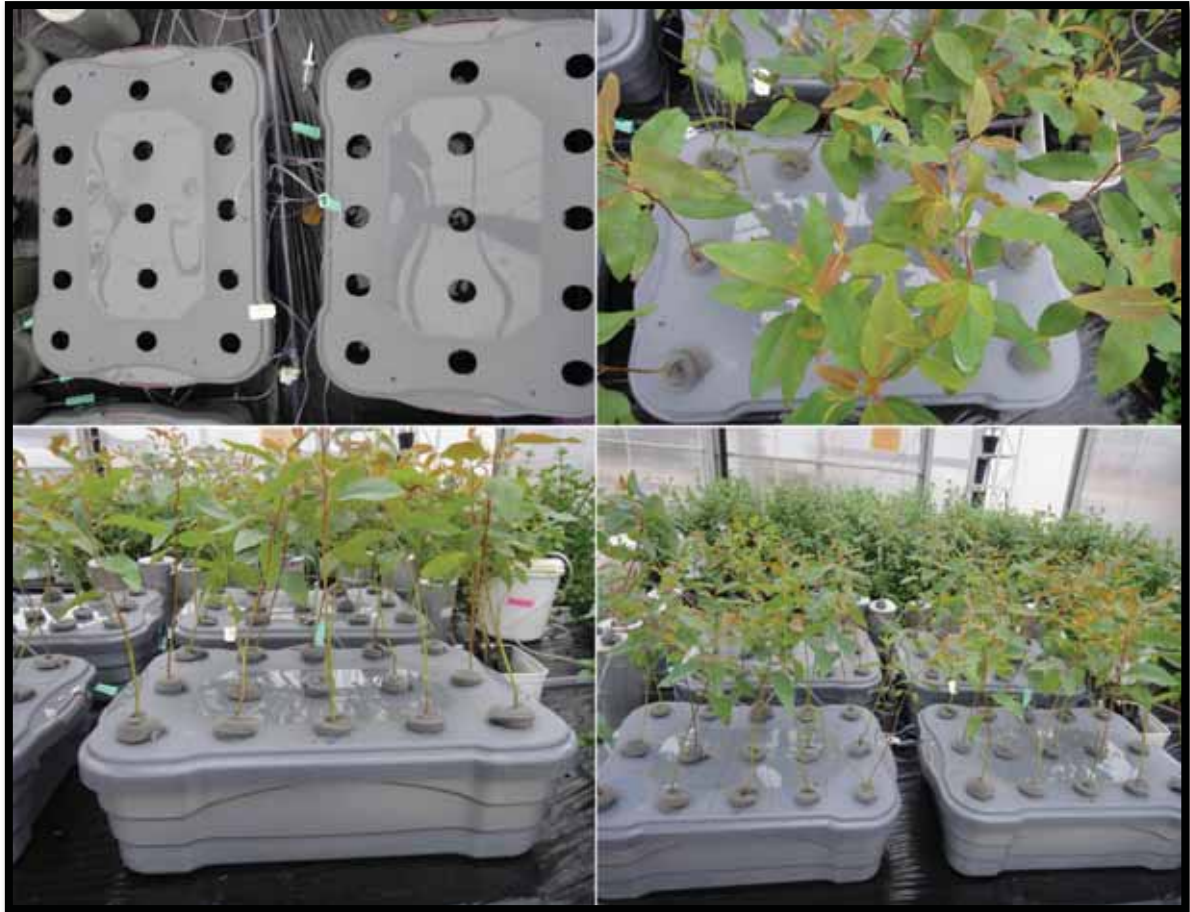


Figura 10. Vista geral do ensaio de estresse osmótico empregando mudas de eucalipto realizado em casa de vegetação controlada do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP- Botucatu, SP).

3.8. Extração de RNA total

O RNA total das plântulas de tabaco e mudas de eucalipto tratadas foi extraído empregando metodologia descrita por Korimbocus *et al.* (2002) (baseado em Chang *et al.*, 1993) com modificações. Utilizou-se aproximadamente 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido com posterior solubilização em 700 μ l do tampão de extração CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) pré-aquecido e incubação por cerca de 30 min a 65°C. Um volume de 500 μ l de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) foi adicionado e a solução submetida a homogeneização. Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 min à 4°C e coletou-se o sobrenadante, aplicando-se novamente o passo anterior de CIA seguido de uma nova

centrifugação. Um volume de cloreto de lítio (LiCl 5M) foi adicionado ao volume de sobrenadante coletado, e o RNA total foi precipitado a -20°C por no mínimo 12 h com posterior centrifugação a 12000 rpm por 30 min (4°C). Lavou-se o sedimento em 200 µl de Tris-EDTA (TE)-SDS 1%, 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol. A amostra foi precipitada durante 2 h a -20°C e centrifugada a 12000 rpm por 20 min (4°C). Uma lavagem foi realizada com 500 µl de etanol 70% e um novo passo de centrifugação a 10000 rpm por 5 min (4°C) foi realizado. O RNA total extraído foi diluído em 25 µl de H₂O DEPC. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) usando absorvância a 260 nm, e a 280 nm como indicador de pureza, e sua qualidade e integridade foram verificadas por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

3.9. Transcrição reversa (RT)

Para as análises empregando RT-qPCR, alíquotas de 1 µg do RNA total extraído foram tratadas com DNase I segundo as recomendações do fabricante (MBI Fermentas), visando degradar todo DNA genômico presente nas mesmas. Após o tratamento com DNase I, cada alíquota de RNA foi submetida à transcrição reversa (RT) empregando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) que utiliza *primers* randômicos e oligo-dT. As amostras de cDNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND- 1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) usando absorvância a 260 nm. No caso do tabaco, a qualidade do cDNA obtido foi verificada pela amplificação do gene constitutivo *18S rRNA* de *N. tabacum* empregando PCR convencional.

3.10. PCR quantitativa em tempo real

A quantificação da expressão relativa do gene repórter *uidA* (GUS) nos tabacos tratados foi realizada por PCR em tempo real. Para tal, utilizou-se os cDNAs obtidos no item

anterior. As amostras de cDNA quantificadas com auxílio do espectrofotômetro (Nanodrop) foram ajustadas para 80 ng/μl. O reagente utilizado na reação foi o *SYBR Green Master Mix* conforme recomendação do fabricante (Applied Biosystems), e os oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados usando o programa “Primer Express” (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene repórter GUS foram: RT GUS-R 5'- GCCAGTGGC GCGAAATATT -3' e RT GUS-F 5'- TTGCCAACGAACCGGATAC -3'. Um gene de tabaco que codifica um fator *heat shock* (*NtHSF2*; AB014484) responsivo ao estresse osmótico (Agarwal *et al.*, 2010) foi usado como controle positivo de indução. Para sua amplificação foram empregados os seguintes oligonucleotídeos: RT HSF2-R 5'- CACTGTCTACTGGTTTGCTTTC-3' e RT HSF2-F 5'- AGAGTTGGATGAATCTACAAGTTG-3'. Diversos genes de tabaco foram testados para atuar como normalizadores (Tabela 02). Após tais testes, o gene *18S rRNA* foi selecionado e usado na normalização.

O aparelho *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) foi utilizado como plataforma para a qPCR. A expressão relativa do gene alvo (GUS) foi determinada empregando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A eficiência dos *primers* e os valores ótimos do CT (*cycle threshold*) foram estimados usando a ferramenta *on line real-time PCR Miner* (Zhao and Fernald, 2005). Os níveis de expressão e o desvio padrão foram calculados e estatisticamente testados usando o software REST© (Pfaffl *et al.*, 2002).

Tabela 02. Descrição dos oligonucleotídeos testados nas reações de PCR em tempo real para diferentes genes normalizadores de tabaco.

Nome	Sequência de nucleotídeos	Tm	Amplificação
ntACT F	5'-GGG AGG ACA TTC AAC CCC TT -3'	57.00°C	NÃO
ntACT R	5'- ATC ATC ACC AGC AAA TCC AGC -3'	55.80°C	NÃO
ntTB F	5'- TCC TGG TAC TGC TGA TAC TCC GA -3'	58.90°C	NÃO
ntTB R	5'- CCT GGT ACT GCT GAT ACT CCG AA -3'	58.00°C	NÃO
nt18S 2 F	5'- ATC GCA CGG CCA TCG T -3'	66.90°C	SIM
nt18S 2 R	5'- TCG AAA GTT GAT AGG GCA GAA AT -3'	65.50°C	SIM
ntACTIN 1 F	5'- TCC GTT GTC CTG AGG TCC TT -3'	66.00°C	SIM
ntACTIN 1 R	5'- GAT TCC GGC AGC TTC CAT T -3'	66.30°C	SIM
ntB.TUB1 F	5'- AAG CTG AAA GCA ACA TGA ACG -3'	64.20°C	SIM
ntB.TUB1 R	5'- TCA GCA GTG GCA TCC TGA TAT T - 3'	65.60°C	SIM
ntALFA TUB F	5'- CAA GAC TAA GCG TAC CAT CCA -3'	61.70°C	SIM
ntALFA	5'- TTG AAT CCA GTA GGG CAC CAG -3'	66.10°C	SIM

No caso da quantificação da expressão relativa do gene *EgTIP2* utilizou-se os cDNAs obtidos por transcrição reversa a partir de RNA total extraído de raízes de mudas tratadas e não tratadas. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos transcritos do gene *EgTIP2* foram: RT TIP-R 5' CGGCGAACACGAAGAGG 3' e RT TIP-F 5' TGGCTTTGGTGA CTCTTC 3'. O método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) foi utilizado para as análises, nas quais a expressão relativa do gene alvo foi calculada com base na expressão de um gene normalizador. Nesse caso foi usado um gene que codifica uma Actina de *E. grandis* (RT ACT-R 5' AACATAGGCATCCTTCTGAC 3' e RT ACT-F 5' GTCTTTCCAGTATTGTTGGT 3'). A eficiência dos *primers* e os valores ótimos do CT (*cycle threshold*) foram estimados usando a ferramenta *on line real-time* PCR Miner (Zhao and Fernald, 2005). Os níveis de expressão e o desvio padrão foram calculados e estatisticamente testados usando o software REST© (Pfaffl *et al.*, 2002).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio histoquímico da atividade GUS nas plantas de tabaco transformadas com o cassete AQUA:GUS

Com a disponibilidade de sementes de diferentes linhagens de tabaco transformadas com o cassete de expressão AQUA:GUS (geração T2) foi possível realizar ensaios histoquímicos da atividade GUS para verificação do padrão de expressão determinado pelo promotor em estudo. Nesse experimento foi usado como controle negativo, plântulas de tabaco selvagem (*N. tabacum* SR1), e como controle positivo, plântulas transformadas com um cassete de expressão contendo GUS sob controle do promotor 35S de CaMV. As análises *in situ* demonstraram que as linhagens transgênicas contendo o cassete AQUA:GUS

apresentaram, nos diferentes estágios do desenvolvimento, um padrão de expressão de GUS no feixe vascular e na região meristemática localizada na ponta da raiz, como pode ser observado na Figura 11 (Painéis C, D e E). O referido padrão de expressão de GUS contrasta com o padrão constitutivo verificado nas plantas controle (35S:GUS; Figura 11A). Estes resultados indicam que o promotor AQUA é transcricionalmente ativo e determina em tabaco um padrão de expressão predominantemente vascular.

A tecido-especificidade da expressão de membros da subfamília TIP de aquaporinas ainda não foi estudada em detalhes, mas alguns estudos relatam padrões de expressão iniciais nas raízes laterais, no tecido meristemático localizado junto à ponta da raiz ou ao longo de toda raiz, e em células do periciclo que formam os pólos do xilema (Gattolin *et al.*, 2009). No nosso trabalho, a atividade GUS dirigida pelo promotor não ficou restrita ao sistema radicular como seria esperado, tendo sido detectada tanto na ponta da raiz, como já descrito por outros, e ao longo do sistema vascular de toda a planta. A não manutenção em tabaco da expressão raiz-específica validada em eucalipto pode ser atribuída à ausência na região promotora clonada de elementos *cis*-regulatórios necessários para tal. Uma outra hipótese estaria relacionada à ausência no tabaco de fatores de transcrição raiz-específicos do eucalipto. De qualquer maneira, a identificação de um promotor vascular-específico pode ser considerada como uma ferramenta potencial para atingir a expressão do transgene nos tecidos vasculares, evitando efeitos secundários indesejáveis causados pelo uso de promotores constitutivos.

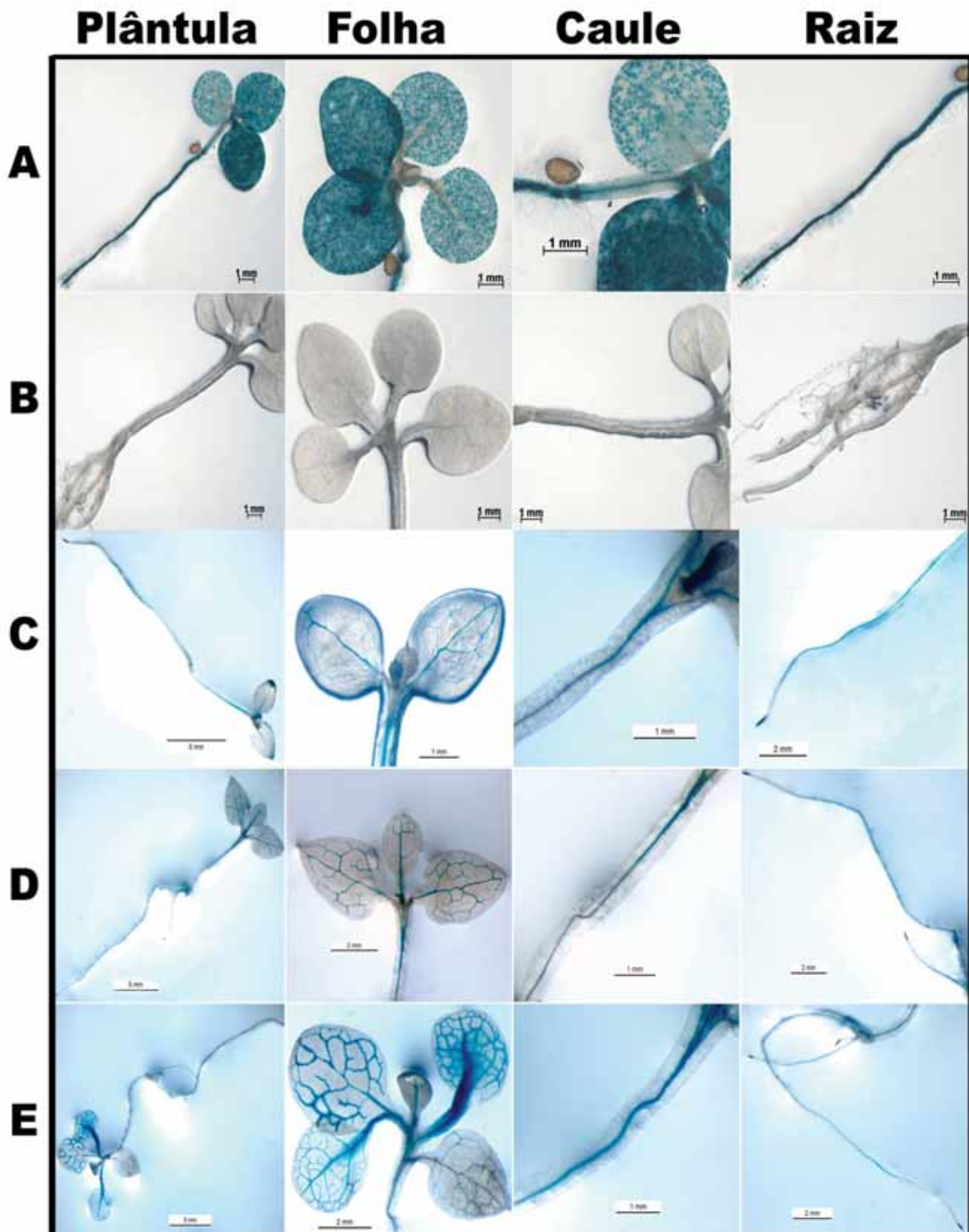


Figura 11. Padrão predominante de expressão de GUS sob controle do promotor investigado em plântulas de tabaco transgênico em diferentes estágios de desenvolvimento: plântulas com 2 (C), 3 (D), e 4 (E) folhas. Plântulas transformadas com um cassete 35S:GUS (A) e plântulas do tipo selvagem (B) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. A coloração azul indica a presença de expressão GUS.

4.2. Análise da sequência promotora em bancos de dados

A análise da região promotora (900 pb) do gene *EgTIP2* permitiu a identificação de alguns elementos *cis*-regulatórios que a caracterizam como uma região promotora possivelmente regulada em condições de estresse e na presença de ácido abscísico (ABA). Na Tabela 03 destacamos os elementos *cis*-regulatórios mais relevantes encontrados empregando o banco de dados PlantCARE.

Tabela 03. Elementos *cis*-regulatórios relevantes encontrados na região promotora em estudo.

Elementos regulatórios	Sequência consenso (posição/fita)	Função predita
ABRE	TACGTG -359/-	Envolvido na resposta ao ácido abscísico.
CAT-BOX	GCCACT -139/+	Relacionado com expressão no meristema
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA -522/+	Envolvido na defesa e resposta a estresse
Motif I Ib	CCGCCGCGCT -262/+	Envolvido na resposta ao ácido abscísico
MYB AT1	(A/T)AACCA -/+	Envolvido na regulação de genes responsivos a desidratação

A regulação da transcrição de genes expressos é conseguida pela interação sequência-específica de fatores de transcrição e de proteínas reguladoras que se ligam a elementos *cis* (Griffiths et al., 2009). Deste modo, a presença dos elementos *TC-rich repeats*, ABRE e

Motif Iib nós levaram a investigar a regulação do promotor em estudo frente a indução de estresse osmótico e pelo tratamento com fitohormônio ABA, respectivamente. Ainda foram encontrados no promotor *EgTIP2* dois elementos do tipo MYB AT1, os quais foram previamente caracterizados como sendo sítios de ligação para fatores de transcrição MYB envolvidos na ativação de genes responsivos a desidratação (Abe *et al.*, 1997).

4.3 Indução de estresse osmótico e tratamento com fitohormônio e extração de RNA total

Para verificar se o promotor do gene *EgTIP2* é responsivo ao estresse osmótico e ao tratamento com ABA foram realizados ensaios empregando plântulas de três linhagens transgênicas AQUA:GUS da geração T2. Para tal, as plântulas em solução hidropônica foram submetidas aos tratamentos que consistiram de adição de 250 mM de manitol (Figura 12), 0,1 mM de ABA, ou de 250 mM de manitol + 0,1 mM de ABA, respectivamente. As coletas foram efetuadas nos tempos de 0, 3 e 24 horas após início do tratamento, com duas repetições biológicas, cada qual compreendendo um pool de três plantas.

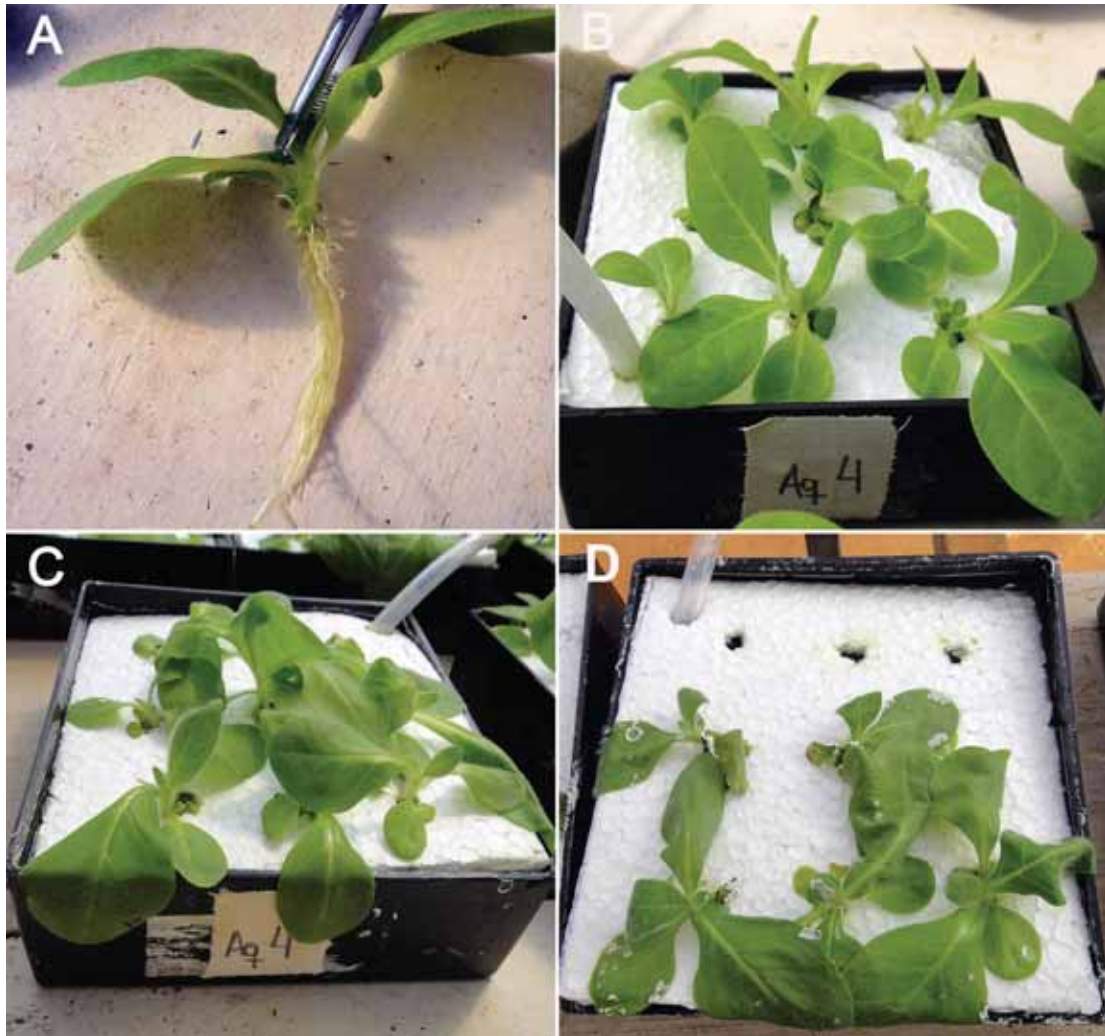


Figura 12. Fenologia das plântulas transgênicas de tabaco submetidas ao estresse osmótico com 250 mM de manitol nos diferentes tempos de coleta: 0 (A e B), 3 (C) e 24 horas (D). A mesma fenologia foi observada no tratamento de 250 mM de manitol + 0,1 mM de ABA.

Visando avaliar quantitativamente a expressão relativa do gene GUS nas plântulas tratadas realizou-se a extração do RNA total pelo método de CTAB. Esse RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua qualidade e integridade verificadas por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio (Figura 13). O cDNA obtido a partir do RNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro. Após a quantificação, as amostras de cDNA foram diluídas para uma concentração final de 80 ng/ μ L.

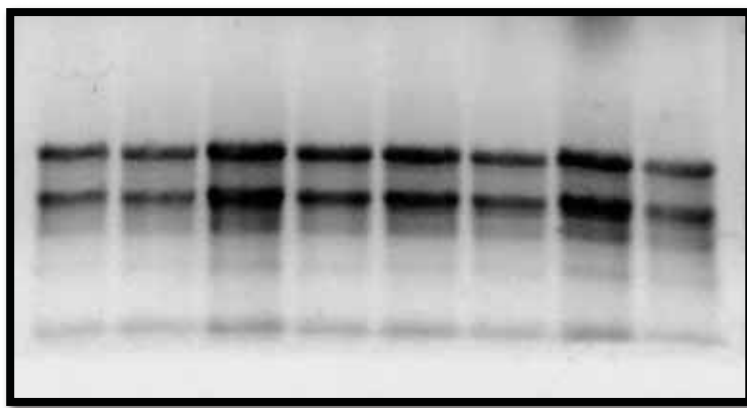


Figura 13. Avaliação da qualidade do RNA total extraído utilizando método de CTAB. Gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio.

4.4. Análise da expressão relativa do gene repórter GUS em resposta aos tratamentos

O normalizador a ser utilizado como referência nas reações de qPCR foi selecionado a partir de sete genes candidatos de tabaco relatados como apresentando expressão constitutiva (Tabela 02). Os normalizadores selecionados foram validados empregando o cDNA obtido das plântulas tratadas com manitol e ABA. O gene *18S rRNA* foi aquele que apresentou a menor variação de expressão nas condições testadas.

Pelos resultados de expressão relativa obtidos para o estresse osmótico (Figura 14) foi possível observar que a expressão do gene repórter em plântulas inteiras aumentou após a adição de manitol na solução hidropônica. Um pico de expressão pode ser detectado após 3 horas de tratamento, o que indica uma resposta efetiva frente ao estresse curto. Já no estresse longo, correspondente ao período de 24 horas de tratamento, ocorreu um aumento significativo da expressão se comparado ao controle não tratado, contudo ligeiramente menor que o observado em 3 h. O mesmo padrão geral foi observado para mais de uma linhagem testada. Esse padrão parece representar uma resposta rápida (de curto prazo) do promotor ao estresse, e outra resposta mais tardia induzida pela perpetuação da situação estressante.

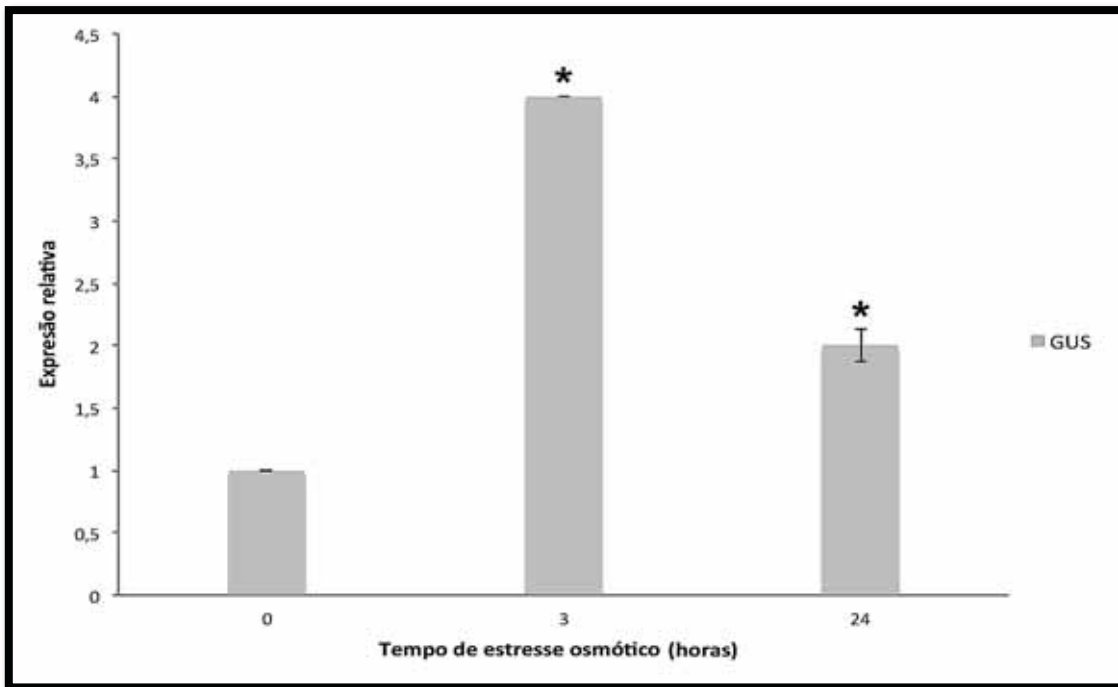


Figura 14. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas. O tempo zero representa plântulas cultivadas na ausência de manitol. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

Entretanto, não foi possível observar o mesmo padrão de expressão nas plântulas das linhagens transgênicas analisadas sob o tratamento com fitohormônio (Figura 15). Neste caso, contrariamente ao esperado, foi constatada uma queda no acúmulo de transcritos do gene repórter no tempo de 3 h após o tratamento, com posterior restauração em 24 h. Deste modo a regulação positiva do promotor por ABA não pode ser confirmada. Ao contrário, os dados obtidos sugerem que o ABA atue como um controlador negativo, já que uma repressão da expressão do gene repórter foi observada no tempo de 3 h. Esse tipo de regulação negativa das aquaporinas por ABA já foi descrito em rabanete (Suga *et al.*, 2002). Os autores demonstraram que em raízes de plântulas tratadas com ABA os níveis de transcritos dos genes *RsPIP2* e *RsTIP1-1* foram reduzidos para um valor 30% inferior ao nível observado no controle não tratado. Interessantemente, os níveis de transcritos destes genes apresentaram padrão constitutivo em condições normais. O mesmo perfil de expressão também pode ser observado em *Craterostigma plantagineum*, uma vez que o nível de transcrito do gene *CpTIP*

foi regulado negativamente por este fitohormônio (Mariaux *et al.*, 1998). No entanto é importante salientar que as isoformas de aquaporina são reguladas diferencialmente em resposta a fitohormônios.

A presença no promotor *EgTIP2* dos elementos *cis*-regulatórios ABRE e Motif Iib, descritos como responsivos a ABA, não foi suficiente para determinar uma resposta do promotor a este fitohormônio. Uma situação similar foi observada em cevada, onde o promotor do gene ABA-responsivo *hva22*, apesar de apresentar dois motivos ABREs, não apresentou qualquer ativação em resposta ao tratamento com ABA. No entanto, foi observado que um ABRE complexado a um elemento de acoplamento confere um elevado nível de capacidade de resposta a ABA (Shen, & Ho, 1995). Múltiplos motivos ABRE são necessários para a expressão de genes ABA-responsivos em sementes e tecidos vegetais. Sendo assim, uma cópia adicional do ABRE ou de um elemento de acoplamento (ABRE, DRE, G box, EE ou CE3) são necessários para a expressão de genes ABA-responsivos (Marcotte *et al.*, 1989; Gómez-Porrás *et al.*, 2007). Em promotores de genes induzidos por desidratação em arroz, o elemento ABRE está frequentemente associado ao motivo CE3 (ACGCGT ou CGCGTC) (Maruyama *et al.*, 2012). Em contraste, alguns genes foram caracterizados por terem sua expressão induzida por ABA sem apresentarem o motivo ABRE nos seus promotores (Michel *et al.*, 1993).

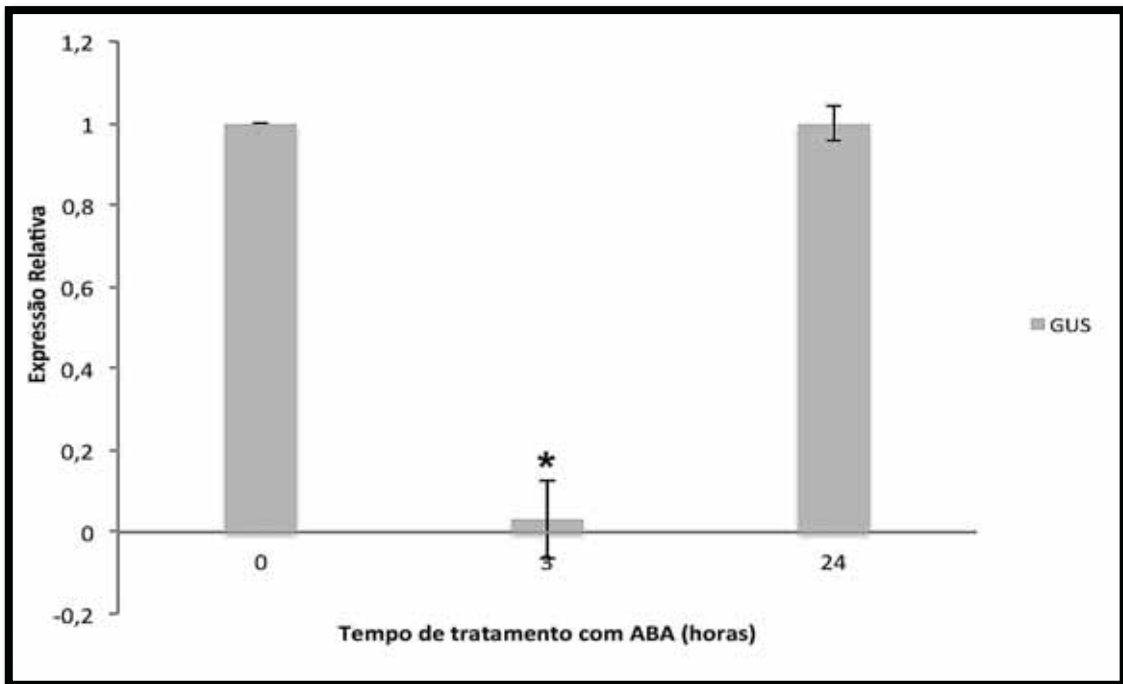


Figura 15. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao tratamento com fitohormônio ABA por um período de 24 horas. O tempo zero representa plântulas cultivadas na ausência de ABA. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

Já no tratamento em que se procurou avaliar o efeito conjunto do estresse osmótico com a aplicação do fitohormônio ABA, a expressão relativa do gene GUS manteve o padrão observado no ensaio inicial em que se empregou só o estresse osmótico. Neste caso, um maior acúmulo de transcritos do gene repórter foi observado após 3 h de aplicação do tratamento (Figura 16). Esses resultados confirmam que o promotor é altamente responsivo ao estresse osmótico, sendo induzido de maneira rápida, e indicam que um possível efeito da aplicação de ABA é mascarado pelo referido estresse.

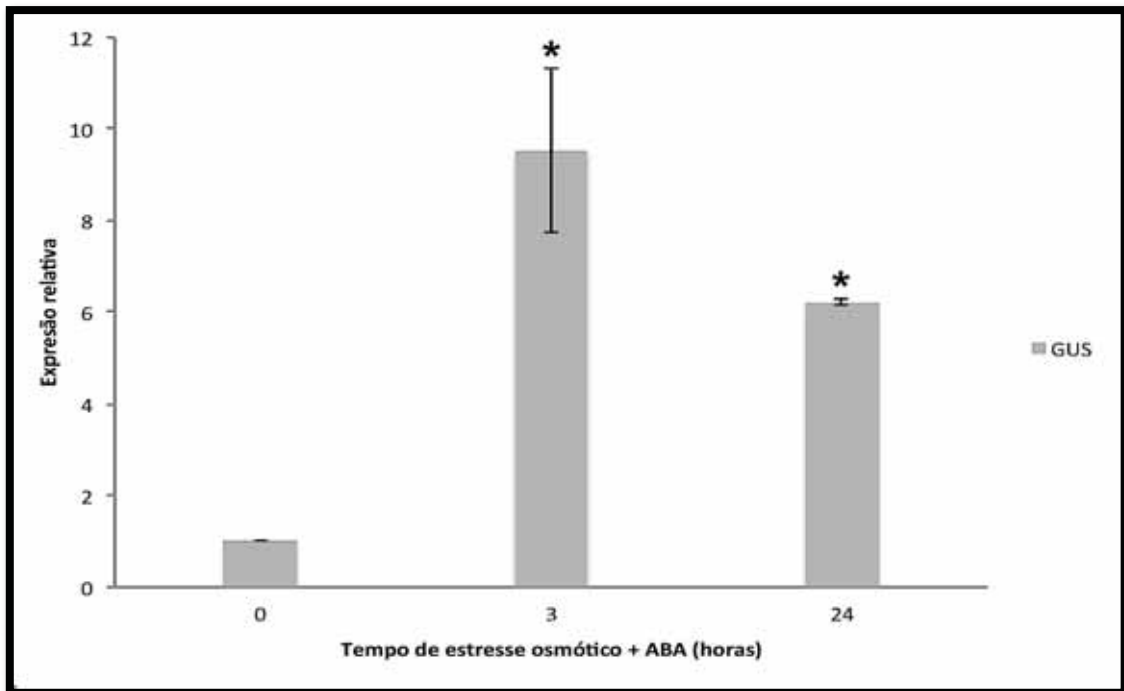


Figura 16. Quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao efeito conjunto do estresse osmótico e do fitohormônio ABA por um período de 24 horas. O tempo zero representa plântulas cultivadas na ausência de manitol e ABA. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

Com o objetivo de analisar a efetividade do estresse osmótico induzido pela adição de 250 mM de manitol, a expressão relativa de um gene de tabaco conhecidamente responsivo a estresses abióticos (gene *NtHSF2*; Agarwal *et al.*, 2010), foi avaliada em paralelo. Na Figura 17 é possível observar que a expressão do referido gene foi induzida nas plântulas submetidas ao estresse osmótico. Neste caso, um aumento no acúmulo de transcritos em relação ao controle foi constatado nos tempos de 3 e 24 h após a aplicação do manitol.

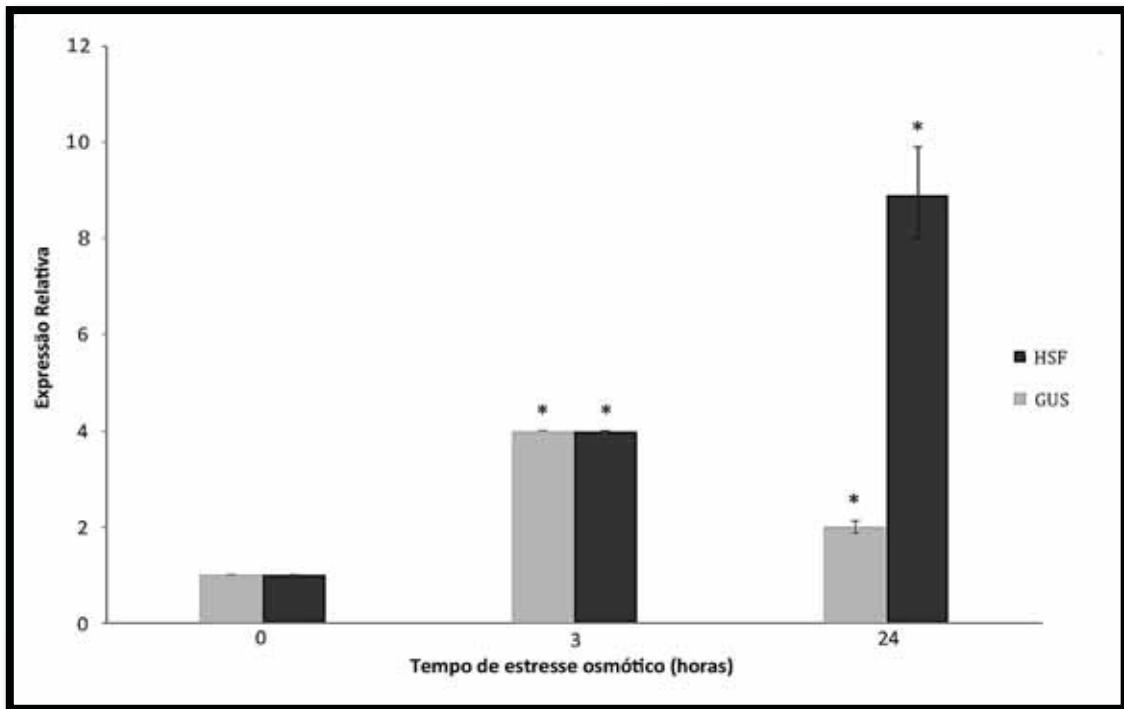


Figura 17. Comparação da expressão relativa do gene repórter GUS e do gene *NtHSF2* em plântulas transgênicas de tabaco expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas. O tempo zero representa plântulas cultivadas na ausência de manitol. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

4.5 Estabelecimento do cultivo hidropônico para eucalipto

Visando estabelecer uma condição adequada para o cultivo hidropônico de eucalipto foi conduzido um ensaio experimental que consistiu no emprego de 20 mudas de *E. grandis* com 2 meses de idade, mantidas em cultivo hidropônico sob diferentes concentrações da solução nutritiva de Hoagland (25, 50, 75 e 100%). Essas mudas foram mantidas em cultivo hidropônico por um período de 20 dias. Ao final deste período, as mudas foram analisadas quanto ao seu desenvolvimento sendo avaliado o número de folhas, o diâmetro do caule (altura do colo), o comprimento e tamanho das raízes e número de raízes novas. Com base nesses parâmetros foi determinada a concentração de solução nutritiva que mais se adequou ao cultivo hidropônico dessa espécie.

Assim, com base nos dados fenológicos e anatômicos obtidos (Figura 18 e Tabela 04) foi possível determinar que a solução de Hoagland na concentração de 75% proporcionou

maior desenvolvimento das mudas. Destaca-se, dentre os critérios avaliados, o desenvolvimento de raízes novas que é um ponto fundamental para melhor adaptação da muda ao cultivo hidropônico, e também pelo fato deste órgão constituir a parte que será amostrada para avaliar os efeitos do estresse osmótico na expressão gênica.

Tabela 04. Média dos dados coletados de mudas de eucalipto cultivadas em solução hidropônica com diferentes concentrações de solução de Hoagland: 25%, 50%, 75% e 100%.

	Solução 25%	Solução 50%	Solução 75%	Solução 100%
Comprimento da raiz (cm)	15	16	21	17
Comprimento da parte aérea (cm)	32	35	32	33
Diâmetro do caule (mm)	0,38	0,40	0,39	0,40
Número de folhas (unidade)	10	12	14	9
Número de raízes novas (unidade)	11	10	> 20	8

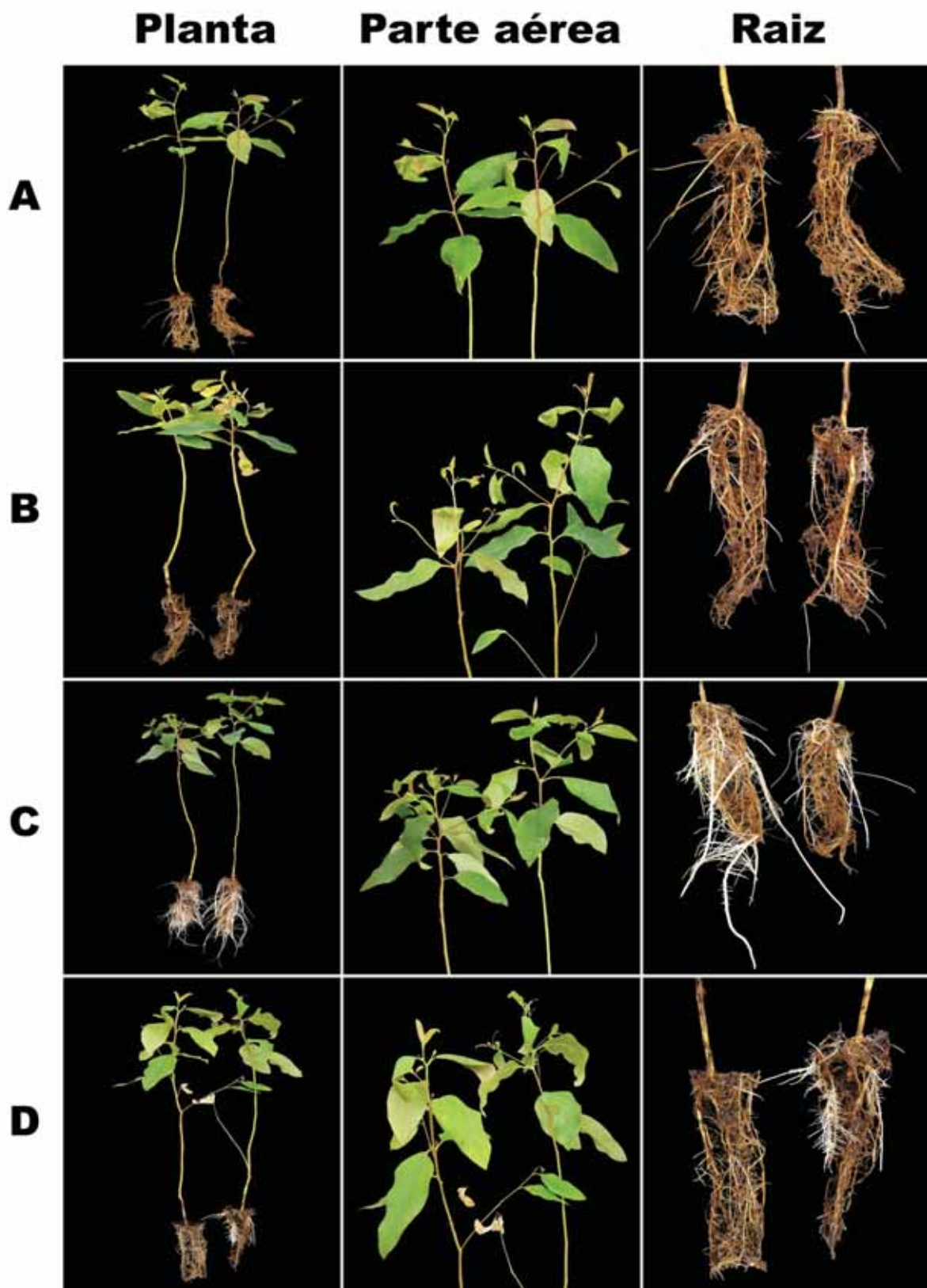


Figura 18. Mudas de *E. grandis* após 20 dias de cultivo hidropônico em solução de Hoagland a 25% (A), 50% (B), 75% (C) e 100% (D).

4.6 Indução de estresse osmótico e análise dos parâmetros fisiológicos das mudas de eucalipto tratadas

Visando a indução de um estresse osmótico capaz de promover uma resposta da planta em curto prazo, mudas de *E. grandis* com um mês de aclimatação ao cultivo hidropônico em solução de Hoagland 75% foram submetidas ao experimento de indução de estresse osmótico decorrente da adição de PEG8000 (215g/L). O PEG foi administrado para se atingir um potencial osmótico de -0,6 Mpa, previamente definido como adequado para interferir nas relações hídricas da planta e promover alterações na expressão gênica (Granda *et al.*, 2011). A utilização de cultivo hidropônico em combinação com PEG permite o estudo da escassez de água em condições uniformes, as quais não são afetadas pelo ambiente (Sanguineti *et al.*, 2006). Além disso, o PEG não é absorvido pelas raízes, o que confere algumas vantagens, dentre as quais, a não ocorrência de efeito tóxico na planta (Michel & Kaufmann, 1973; Michel, 1983).

Como mencionado no Material e Métodos, as medições das trocas gasosas foram realizadas a cada hora após a instalação do experimento até o meio dia. Posteriormente a esse período, as medições ocorreram as 15, 21 e as 9 horas. As coletas das raízes para posterior análise da expressão do gene *EgTIP2* foram executadas nos tempos 0, 6 e 24 horas após a aplicação do estresse, e após um período de recuperação das mudas por quatro dias em solução sem a presença de PEG8000.

Pela análise da Figura 19 é possível perceber que nas condições de realização do ensaio não foi detectada variação significativa da temperatura, tanto do ar quanto da folha, e da umidade relativa do ar e da folha. Logo a diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPVfolha-ar) não é significativa, não exercendo influência sobre os demais parâmetros fisiológicos avaliados: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO₂ (Ci). Por outro lado, a medida da

densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF) dentro da câmara de medição, que abrange uma área foliar de 6 cm² (2x3 cm), mostrou uma diferença importante entre as mudas tratadas e aquelas usadas como controle. Neste caso, as mudas tratadas apresentaram um valor quase duas vezes maior, só convergindo após um período de 12 horas de estresse, o qual corresponde às 21 horas, ocorrendo uma queda brusca desse fluxo. Também ocorre uma convergência após o período de recuperação de 4 dias entre as mudas tratadas e as controle.

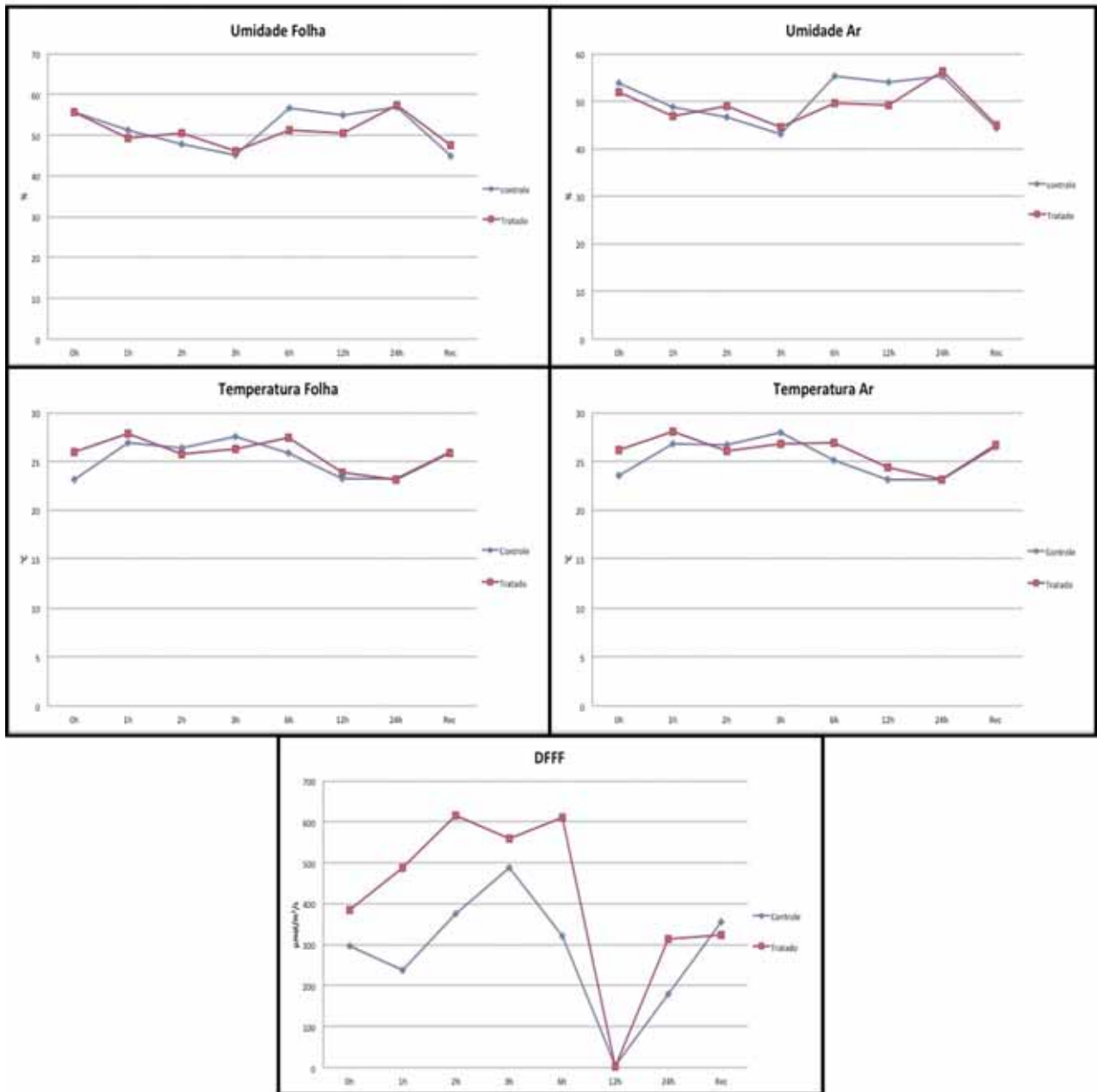


Figura 19. Variáveis ambientais da casa de vegetação na qual foram realizados os ensaios de cultivo hidropônico de eucalipto sob estresse osmótico: umidade relativa da folha (UR% folha), umidade relativa do ar (UR% ar), temperatura da folha (Tfolha), temperatura do ar (Tar) e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF). As barras representam o desvio padrão (n=9).

A taxa fotossintética corresponde à quantidade de CO₂ que é assimilado num determinado período de tempo para transformação pela planta para manutenção do metabolismo. Assume-se que quanto maior for a taxa fotossintética, maior é o desenvolvimento da planta. Os dados obtidos para esse parâmetro mostram que as mudas sob

tratamento apresentaram uma queda abrupta na taxa fotossintética a partir de 1 hora da indução do estresse, seguida por uma queda lenta e gradual durante todo o tratamento. Uma recuperação dessa taxa só foi observada na coleta realizada após 4 dias de recuperação das mudas em cultivo hidropônico sem PEG (Figura 20). De um modo geral, as taxas obtidas para as mudas estressadas nos diferentes tempos de coleta foram cerca de duas vezes menor que as taxas do controle não tratado, exceto na última coleta correspondente ao período de recuperação das mudas. A redução na assimilação de CO₂, ocasionada pela deficiência hídrica, pode ser devida ao fechamento dos estômatos, restringindo o influxo de CO₂ nas células do mesófilo e/ou a efeitos do estresse diretamente sobre os mecanismos fotossintéticos (Kaiser, 1987; Chaves, 1991).

Na Figura 20 é possível observar ainda que a taxa de transpiração das mudas tratadas sofre uma queda drástica a partir do início do estresse (até as 2 horas de tratamento), a qual é seguida de uma queda gradual e lenta. Um aumento desse parâmetro só é observado após o período de recuperação, permanecendo próximo ao valor inicial. Ou seja, esses dados demonstram a necessidade das mudas sob estresse de minimizar ao máximo a perda de água para a atmosfera. Assim, quanto maior o nível de estresse sofrido, menor é a taxa de transpiração. Além disso, pode-se perceber que a depressão na taxa de transpiração ocasionou-se pelo fechamento parcial ou total dos estômatos, dado que foi avaliado pela condutância estomática discutida a seguir. Cabe ressaltar ainda que a redução na taxa de transpiração das mudas estressadas não se correlacionou com a temperatura do ar (Tar), com a umidade relativa do ar (UR), com a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), nem com o déficit de pressão de vapor (DPV); visto que essas condições eram estáveis. Isso demonstra que a disponibilidade de água para a raiz nessa espécie foi o fator que realmente influenciou a redução da transpiração.

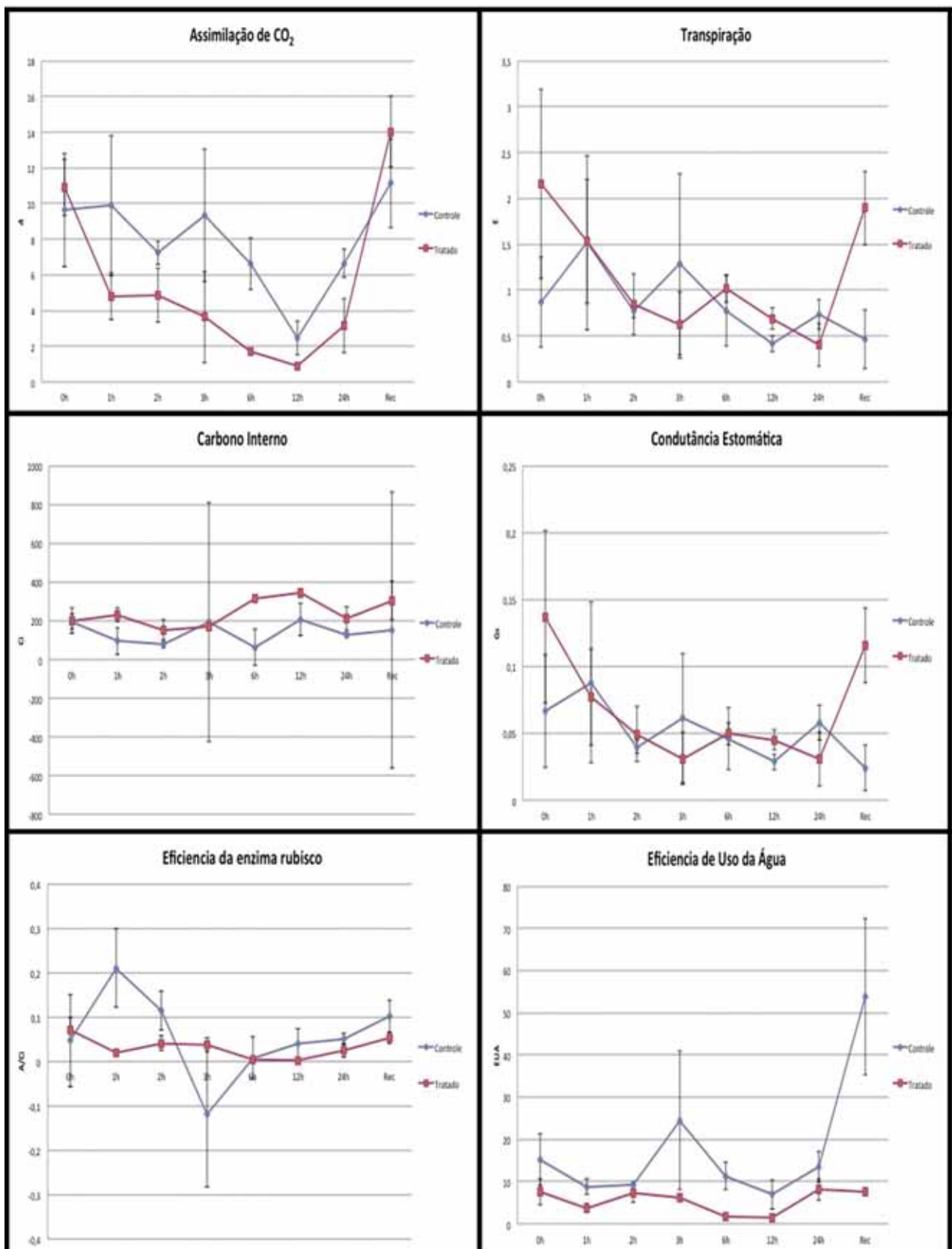


Figura 20. Taxa fotossintética líquida, transpiração (E), conteúdo de carbono interno (Ci), condutância estomática (Gs), eficiência da enzima rubisco e a eficiência do uso da água em folhas de mudas de *E. grandis* submetido a estresse osmótico. As barras representam o desvio padrão (n=9).

A condutância estomática revela a quantidade de estômatos que estavam abertos nas folhas, havendo uma relação direta entre a condutância e a taxa de trocas gasosas. Num aspecto geral não ocorreu uma diferença significativa na condutância estomática de mudas em situação controle e tratadas, entretanto, as mudas tratadas apresentam uma queda na condutância a partir da indução do estresse. Neste caso, a condutância diminuiu cerca de três vezes em duas horas de tratamento, ocorrendo um aumento apenas após o período de recuperação do estresse. Esses resultados, apresentados na Figura 20, mostram uma variação grande no início do tratamento, o que demonstra a forte influência do estresse osmótico sobre a fisiologia das mudas, contudo, há uma tendência à adaptação com o passar do tempo, havendo uma homogenização dos dados das coletas subsequentes.

Sabe-se que a limitada reserva de água nas folhas e a taxa potencial de transpiração influenciam a regulação da abertura estomática para restringir os danos nos tecidos, como resultado da desidratação, o que é de grande importância para a planta (Ferreira, 1997). O fechamento dos estômatos, como tentativa de manter o conteúdo hídrico favorável nos tecidos por maior tempo possível, é uma das primeiras linhas de defesa contra a dessecação. Essa redução da abertura do poro estomático, porém, restringe a troca de gases entre o interior da folha e a atmosfera causando diminuição na assimilação de CO₂ que é utilizado no processo fotossintético (Krieg, 1993; Larcher, 2000).

A taxa de carbono interno revela a quantidade de carbono que não foi utilizado nos processos metabólicos, e conseqüentemente, indica a eficiência de atuação da enzima Rubisco *i.e.* quanto maior a taxa de carbono interno, menor é a eficiência da Rubisco. Os dados obtidos para esse parâmetro mostram pouca variação nas mudas usadas como controle (Figura 20). Nas mudas tratadas, entretanto, os valores obtidos foram superiores aos das mudas na situação controle sendo o maior aumento observado após 3 h de tratamento (~400).

Pelo fato de as taxas de carbono interno para as mudas-controle terem permanecido praticamente homogêneas ao longo dos tempos de coleta, foi possível constatar uma

eficiência regular da Rubisco. Porém, o mesmo não é verdadeiro para as plantas tratadas que apresentaram eficiência da referida enzima inferior à do controle, principalmente nas três primeiras horas de tratamento como pode ser observado na Figura 20.

A eficiência do uso da água (EUA) que corresponde à razão da biomassa produzida e a evapotranspiração (ETm) (Cunha *et al.*, 1994), resume o processo de transpiração da água absorvida pelo sistema radicular e assimilação do carbono via fotossíntese, o que, segundo Farquhar & Lloyd (1993), pode ser avaliado pela composição dos isótopos de carbono na matéria seca. Após análise dos dados fisiológicos obtidos foi possível constatar uma eficiência muito maior nas mudas mantidas na situação controle do que nas tratadas. O fechamento parcial do poro estomático pode resultar em um aumento nessa eficiência do uso da água, entretanto, mesmo com a diminuição da condutância estomática nas mudas tratadas, esta não foi suficiente para aumentar a eficiência do uso da água nas mesmas.

Os comprometimentos na assimilação fotossintética do carbono e na taxa de transpiração, por meio da ação estomática, podem afetar o crescimento e diminuir a produtividade das plantas. Por isso faz-se primordial uma resposta aos efeitos do estresse para que não haja prejuízo à planta. Diversas evidências experimentais demonstram que as aquaporinas têm participação no transporte de muitas moléculas essenciais às plantas, como H₂O e CO₂ (Noctor & Foyer, 1998, Nielsen *et al.*, 2005, Bakker *et al.*, 2006). Neste contexto, Maki Katsuhara e colaboradores (2003) apontaram as PIPs como sendo os fatores mais importantes relacionados às características de absorção de água celular ou perda de água.

4.7 Expressão relativa do gene *EgTIP2* nas mudas de eucalipto tratadas

Visando avaliar a expressão relativa do gene *EgTIP2* em raízes de mudas submetidas ao estresse osmótico realizou-se a extração do RNA total e obtenção do cDNA. A expressão relativa foi então determinada empregando qPCR. Pelos resultados obtidos (Figura 21) foi possível observar uma maior acumulação de transcritos do gene *EgTIP2* nas raízes das mudas

tratadas com PEG8000 em relação ao controle não tratado (tempo 0). Um aumento de expressão foi detectado com 6 e 24 h após a indução do estresse osmótico. Por outro lado, uma redução na expressão foi observada após o período de recuperação das mudas (REC). Esse padrão de expressão é similar àquele observado para o gene repórter GUS sob controle do promotor do gene *EgTIP2* em tabaco, e, como já realçado, sugere que o gene é ativado rapidamente (em curto prazo) bem como tardiamente pela manutenção da condição estressante.

Alguns genes TIPs de outras espécies vegetais têm sido relatados como sendo responsivos aos estresses abióticos que causam perda de água, tais como a seca e alta salinidade (Peng *et al.*, 2007; Sade *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Wang e colaboradores (2011), por exemplo, mostraram que a expressão do gene *GsTIP2; 1* foi induzida por estresses abióticos, assim como ocorrido em nossas análises. Todavia, essa expressão foi estimulada em folhas e suprimida em raízes em condições de seca.

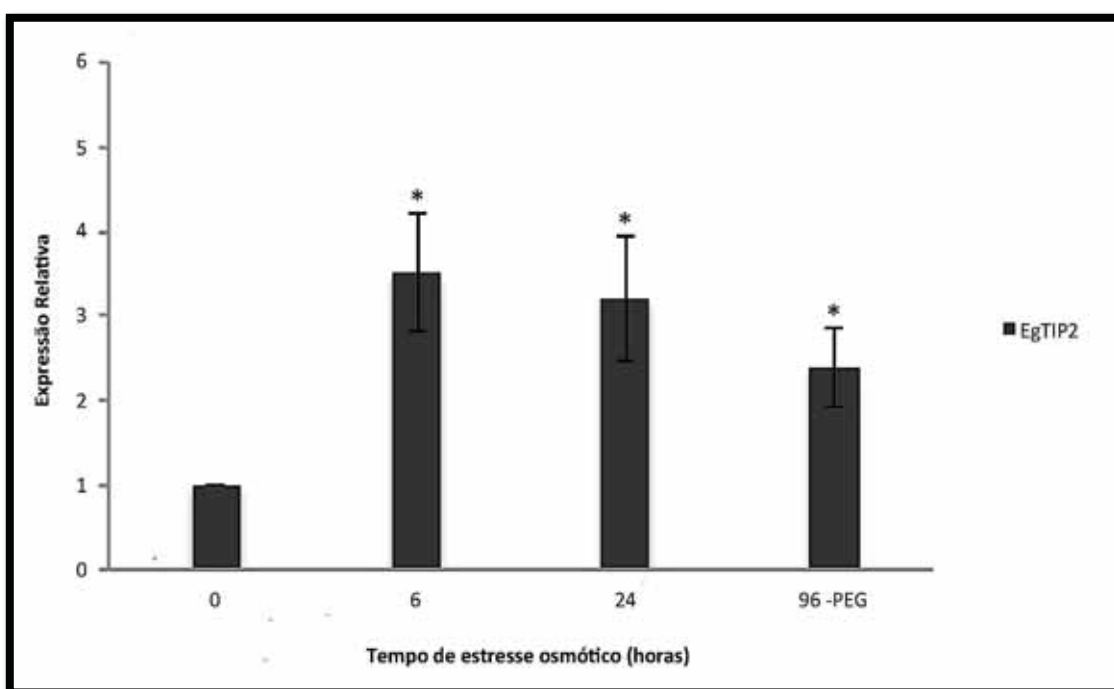


Figura 21. Expressão relativa do gene *EgTIP2* em raízes de mudas de eucalipto expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas. O tempo zero representa mudas cultivadas na ausência de PEG. REC representa mudas submetidas à recuperação como descrito no Material e Métodos. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

Com o objetivo de analisar a efetividade do estresse osmótico induzido pela adição de PEG8000, a expressão relativa de um gene que codifica uma PIP de eucalipto (*EgPIP*), conhecidamente responsivo ao estresse abiótico (Tsuchihira *et al.*, 2010), foi avaliada em paralelo. Na Figura 22 é possível observar que a expressão do referido gene nas raízes de mudas tratadas é aumentada em resposta ao estresse osmótico. Neste caso, um padrão de expressão similar ao observado para o gene *EgTIP2*, com picos de expressão após 6 h e 24 h foi detectado. Adicionalmente, uma redução considerável na expressão, com retorno aos níveis do controle não tratado (0 h) foi observada após a recuperação das mudas.

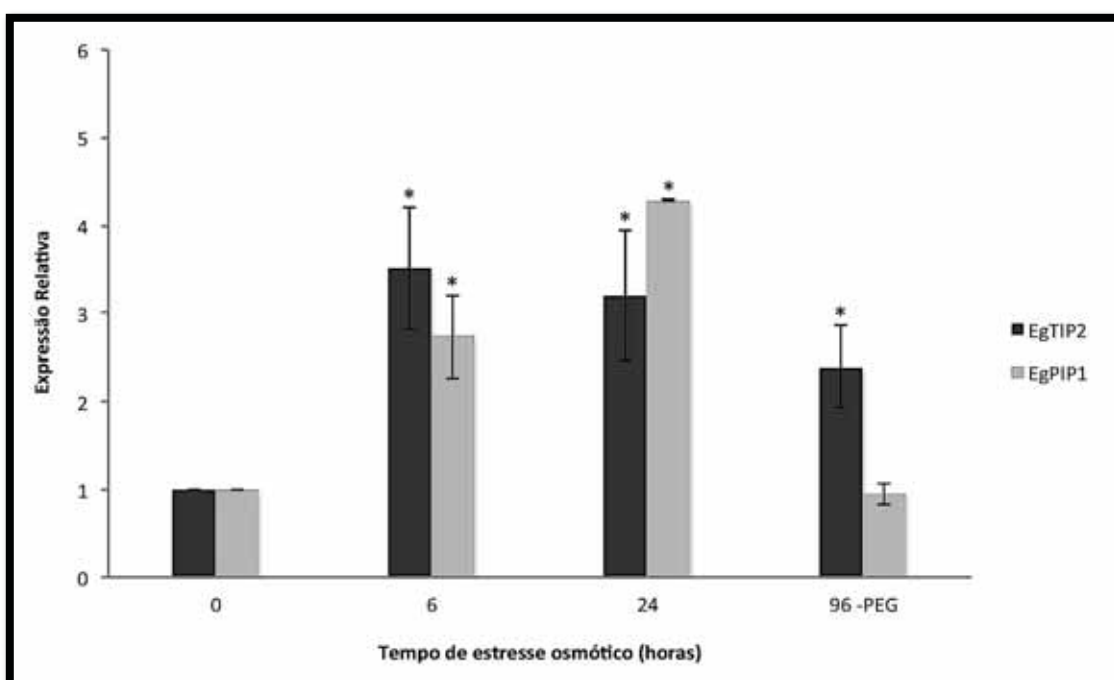


Figura 22. Comparação do perfil de expressão relativa dos genes *EgTIP2* e *EgPIP* em raízes de eucalipto expostas ao estresse osmótico por um período de 24 horas. O tempo zero representa mudas cultivadas na ausência de PEG. REC representa mudas submetidas à recuperação como descrito no Material e Métodos. As barras correspondem à média, e respectivos desvios, para três repetições independentes. * representa significância estatística ($P < 0,05$).

Como relatado anteriormente, o padrão de expressão das aquaporinas mediante condições de estresse são variáveis. Boursiac e colaboradores (2005), por exemplo, verificaram que os transcritos das aquaporinas PIP e TIP apresentaram uma diminuição em abundância (de 75% para 60%) entre 2 e 4 h de exposição ao sal em *Arabidopsis*. Em contrapartida, ensaios de

microarranjos usando mRNA isolado a partir de plantas de *Arabidopsis* inteiras submetidas ao estresse de seca revelaram que os genes *AtPIP2, 3*, *AtPIP2, 6* e *AtTIP1, 2* foram positivamente regulados enquanto que *AtTIP2; 1* foi negativamente regulado (Onno *et al.*, 2003). Kreps *et al.* (2002) observaram ainda que os genes *AtPIP2, 2* e *AtTIP2, 2* foram induzidos mais do que duas vezes em folhas tratadas com manitol. Em uva (*Vitis vinifera*), Pou *et al.* (2012) constataram um aumento da expressão dos genes *VvTIP1, 1*, *VvPIP2, 1* e *VvPIP2, 2* com o início do estresse osmótico e uma diminuição de *VvTIP2, 1*, como também um aumento da expressão de *PIP2, 1*, *PIP2, 2*, *PIP2, 3* e *TIP2, 1* durante o período de recuperação.

Alterações na expressão gênica sob condições de estresse abiótico podem refletir um comportamento de sobrevivência e de autodefesa das plantas, ou podem resultar dos danos causados pelo estresse propriamente dito (Wang *et al.*, 2011). Estudo realizado por Peng e colaboradores (2007) indica que a superexpressão do gene *PgTIP1* de ginseng em *Arabidopsis* reforça a tolerância ao estresse salino e a desidratação pelo fato das plantas transgênicas apresentarem raízes mais longas e com maior área de superfície, garantindo assim maior capacidade de absorção de água e evitando a murcha após 4 dias de estresse.

No caso das aquaporinas, o padrão de expressão complexo desses genes sugere que a manutenção de um estado da água adequado, sob condições normais ou sob estresse, requer tanto o transporte de água através do aumento de aquaporinas em algumas células, como um transporte de água reduzido através de outras aquaporinas em outras células e tecidos (Thumma *et al.*, 2012). Nossos resultados sugerem que a indução do gene *EgTIP2* reflete uma tentativa de resposta de defesa da planta ao estresse osmótico, buscando auxiliar na manutenção do fluxo da água, ou evitando a perda desta. Em geral, uma regulação positiva da expressão das aquaporinas é entendida como uma necessidade de aumentar a permeabilidade da membrana ao transporte de água, quando essa se encontra menos disponível. Sendo assim, numa condição de estresse mais severo, quando a condutância estomática já é baixa e a disponibilidade de água no solo é fortemente reduzida, um aumento da expressão dos genes

codificadores de aquaporinas pode ajudar a aumentar a permeabilidade da membrana para o transporte de água, otimizando assim o status de água na planta (Yamada *et al.*, 1997).

Nosso estudo identificou um gene que codifica uma TIP de eucalipto, *EgTIP2*, e caracterizou seu perfil de expressão em resposta ao estresse osmótico nessa espécie, fornecendo informações sobre seu possível papel na tolerância ao estresse osmótico. Contudo, estudos sobre o papel dos membros da subfamília TIP na tolerância aos estresses abióticos continuam limitados. Sendo assim, informações sobre a estrutura e a regulação dos genes dessa subfamília sob condições de estresse serão úteis para melhor compreender os efeitos de diferentes TIPs na tolerância aos estresses abióticos especialmente em eucalipto.

5) CONCLUSÕES

1) O promotor do gene *EgTIP2* foi capaz de modular a transcrição do gene repórter GUS dirigindo a sua expressão para os feixes vasculares e para a região meristemática da raiz de plântulas de tabaco transgênicas.

2) O referido promotor não só é ativado de forma rápida e num curto intervalo de tempo (3 h) pelo estresse osmótico como também é responsivo tardiamente frente a persistência do estresse (24 h).

3) Uma aparente regulação negativa deste promotor na presença do fitohormônio ABA foi observada, sendo constatada uma rápida redução da expressão relativa no período de três horas do tratamento.

4) A suposta regulação negativa do promotor por ABA foi suprimida em presença do estresse osmótico.

5) O PEG8000 foi capaz de induzir um estresse severo em mudas de eucalipto em cultivo hidropônico. As respostas de condutância estomática (G_s) e de transpiração (E) acompanharam as variações da assimilação de CO_2 (A), as quais foram fortemente afetadas pelo estresse osmótico.

6) A expressão aumentada do gene *EgTIP2* aconteceu nos períodos de maior baixa de tais parâmetros fisiológicos, sendo observado dois picos de expressão (6 h e 24 h).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H., URAO, T., ITO, T., SEKI, M., SHINOZAKI, K., AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, 15, 63. 2003.

AGARWAL, P., AGARWAL, P.K., JOSHI, A.J., SOPORY,S.K., REDDY, M.K.Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. **Mol Biol Rep**, 37:1125–1135, 2010.

AGRE, P. AND KOZONO, D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. **FEBS Lett**, 555:72-78, 2003.

AHARON, R., SHAHAK, Y., WININGER, S., BENDOV, R., KAPULNIK, Y., GALILI, G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. **The Plant Cell**, v.15, p.439–447, 2003.

ALEXANDERSSON, E., FRAYSSE, L., SJOVALL-LARSEN, S., GUSTAVSSON, S., FELLERT, M., KARLSSON, M., JOHANSON, U., AND KJELLBOM, P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. **Plant Mol. Biol.** 59: 469–484, 2005.

ALTPETER, F., VARSHNEY, A., ABDERHALDEN, O., DOUCHKOV, D., SAUTTER, C., KUMLEHN, J., DUDLER, R., SCHWEIZER, P. Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. **Plant Molecular Biology**, v.57, p.271–283, 2005.

ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J., AND SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22,195-201, 2006.

BAKKER, EG., TOOMAJIAN, C., KREITMAN M, BERGELSON, J. A Genome-Wide Survey of R Gene Polymorphisms in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, 18(8):1803–1818, 2006.

BERRY, J.A. & DOWNTON, W.J.S. Environmental regulation of photosynthesis. In: GOVINDJEE, E. *Photosynthesis: development, carbon metabolism, and plant production*. New York, **Academic Press**, 1982. v.2, p.306-308.

BIELA, A., GROTE, K., OTTO, B., HOTH, S., HEDRICH, R. & KALDENHOFF, R. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. **Plant J**, 18, 565–570, 1999.

BOTS, M., VERGELDT, F., WOLTERS-ARTS, M., WETERINGS, K., VAN AS, H. AND MARIANI, C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. **Plant Physiol**. 137, 1049–1056, 2005.

BRANDALISE, M, SEVERINO, F. E., MALUF, M.P. AND MAIA, I.G. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. **Plant Cell Rep**. 28,1699–1708, 2009.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. DE C. Manual de transformação genética de plantas embrapa. Brasília embrapa-SPI/ **Embrapa-cenargen**, 114p., 1998.

BOURSIAC, Y., CHEN, S., LUU, D.T., SORIEUL, M., VAN DEN DRIES, N., MAUREL, C. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots molecular and cellular features of aquaporin expression. **Plant Physiol**, 139:790–805, 2005.

CAI, M., WEI, J., XIANGHUA, L., CAIGUO, X., SHIPING, W. A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue- specific gene expression in transgenic plants, **Plant Biotechnol. J.** v.5: p664 e 674, 2007.

CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol Biol Rep** 11:113–116, 1993.

CHAUMONT, F., BARRIEU, F., WOJCIK, E., CHRISPEELS, M.J. AND JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiol**. 125, 1206–1215, 2001.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **42**:1-16, 1991.

CHEN H, LIN Y. Promise and issues of genetically modified crops. **Curr Opin Plant Biol**. 2013.

CHINNUSAMY, V., SCHUMAKER, K., ZHU, J.K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **J Exp Bot.**55:225–236, 2004.

CHRISPEELS, M.J. and MAUREL, C. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. **Plant Physiol.**, v.105, p.9-13, 1994.

CUNHA, A.R. E MARTINS, D. Classificações Climáticas para os municípios de Botucatu e São Manuel. **Irriga**, Botucatu, v.14, n.1, p. 1-11, 2009.

CUNHA, G.R., PAULA, J.R.F., BERGAMASCHI, H. et al. Evapotranspiração e eficiência no uso da água em alfafa. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.2, p.23-27, 1994.

DANIELSON, J.A.H., JOHANSON, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. **BMC Plant Biol**, 8:45, 2008.

DEAN, R.M., RIVERS, R.L., ZEIDEL, M.L. AND ROBERTS, D.M. Purification and functional reconstitution of soybean Nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. **Biochemistry**, 38, 347–353, 1999.

DOYLE, J. J. & GAUT, B. S. Evolution of genes and taxa: a primer. **Plant Molecular Biology**, 42: 1-23. 2000.

FARQUHAR, G.D.; LLOYD, J. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and atmosphere. In: EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds.) **Stable isotope and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press,. p.47-70. 1993.

FERREIRA, V. M. **Aspectos de crescimento, nutrição e relações hídricas em dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) em função da disponibilidade de água no solo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1997.

FORREST, K.L. AND BHAVE, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. **Functional Integrative Genomics**, 7, 263–289, 2007.

FOUQUET, R., LEON, C., OLLAT, N., BARRIEU, F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. **Plant Cell Rep** 27: 1541–1550, 2008.

FU, D., LIBSON, A., MIERCKE, L.J.W., WEITZMAN, C., NOLLERT, P., KRUCINSKI, J., STROUD, R.M. Structure of a glycerol conducting channel and the basis for its selectivity. **Science**, 290: 481–486, 2000.

GATTOLIN, S., SORIEUL, M., HUNTER, P. R., KHONSARI, R. H., FRIGERIO, L. In vivo imaging of the tonoplast intrinsic protein family in Arabidopsis roots. **BMC Plant Biology**, v.9,p.133, 2009.

GERBEAU, P., GUCLU, J., P. RIPOCHE, MAUREL, C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes, **Plant J.** 18 577–587, 1999.

GASPAR, M., BOUSSER, A., SISSOËFF, I., ROCHE, O., HOARAU, J. & MAHE, A. Cloning and characterization of ZmPIP1–5b, an aquaporin transporting water and urea. **Plant Science** 165, 21–31, 2003.

GOMES,D., AGASSE, A., THIÉBAUD, P., DELROT, S., GERÓS, H., FCHAUMONT, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **BBAMEM-79938**, n° of pages:16; 4C, 2009.

GÓMEZ-PORRAS, J.L., RIANO-PACHON, D.M., DREYER, I., MAYER, J.E. AND MUELLER-ROEBER, B. Genome- wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. **BMC Genomics**, 8, 260, 2007.

GONZALEZ- DUARTE, R. & ALBALAT, R. Merging protein, gene and genomic data: the evolution of the MDR-ADH family. **Heredity** 95: 184-197. 2005.

GOODSTEIN, D.M., SHU, S., HOWSON, R., NEUPANE, R., HAYES, R.D., FAZO, J., MITROS, T., DIRKS, W., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., AND ROKHSAR, D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, **Nucleic Acids Res.** 40 (D1): D1178-D1186, 2012.

GRANDA,V., CUESTA, C., ÁLVAREZ, R., ORDÁS, R., CENTENO, M.L., RODRÍGUEZ, A. MAJADA, J.P., FERNÁNDEZ, B., ISABEL FEITO, I. Rapid responses of C14 clone of Eucalyptus globulus to root drought stress: Time-course of hormonal and physiological signaling. **Journal of Plant Physiology**, 168 :661–670. 2011.

GRATTAPAGLIA, D., PLOMION, C., KIRST, M., SEDEROFF, R.R. Genomics of growth traits in forest trees. **Curr Opin Plant Biol**, 12:148–156. 2009.

GRIFFITHS A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M. Introdução à genética. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 9^a ed, 2009.

GUPTA AB AND SANKARARAMAKRISHNAN R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. **BMC Plant Biol**, 9: 134, 2009.

HARFOUCHE, A., MEILAN, R. E ALTMAN, A. Tree genetic engineering and applications to sustainable forestry and biomass production. **Trends in Biotechnology**. 29, 9–17. 2011.

HEYMANN, J.B., ENGEL, A. Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of 1177 water channels. **News. Physiol. Sci.**, v.14, p.187–193, 1999.

HIGO, K., UGAWA, Y., IWAMOTO, M., KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. **Nucleic Acids Res**, v.27, p.297-300, 1999.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water - culture method for growing plants without soil. Berkeley. University of California. 1950.

HOFMANN, K. and STOFFEL, W. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 374,166, 1993.

HOSHINO, A. A. Isolamento e Caracterização de Promotores Tecido-específicos a partir das Informações do SUCEST (“Sugarcane Expressed Sequence Tags”). **Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista**, Botucatu. 143f, 2007.

HUKIN, D., DOERING-SAAD, C., THOMAS, C.R. AND PRITCHARD, J. Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. **Planta** 215, 1047–1056, (2002).

HUSSEINI, N.M. Análise da expressão dos genes que codificam a proteína mitocondrial desacopladora em *Arabidopsis thaliana* (*AtUCPI-6*), estudos in vivo empregando plantas transgênicas e mapeamento do sinal de endereçamento da proteína AtUCPI. 83p. **Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2008.

ILAN, B., TAJKHORSHID, E., SCHULTEN, K., VOTH, G.A. The mechanism of proton exclusion in aquaporin channels. **Proteins**, 55, 223–228, 2004.

ISHIKAWA, F., SUGA, S., UEMURA, T., SATO, M.H. AND MAESHIMA, M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett.** 579, 5814–5820, 2005.

JANG, J.Y., KIM, D.G., KIM, Y.O., KIM, J.S., KANG, H.S. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol** 54: 713–725, 2004.

JAVOT, H. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. **Plant Cell**, 15, 509–522. 2003.

JEFFERSON RA, KAVANAGH TA, BEVAN MW. GUS fusions: beta- glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J**, 6:3901–3907, 1987.

JIANG, L., PHILLIPS, T.E., HAMM, C.A., DROZDOWICZ, Y.M., REA, P.A., MAESHIMA, M., ROGERS, S.W., ROGERS, J.C. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. **J Biol Chem** 155:991–1002, 2001.

JOHANSSON, I., KARLSSON, M., JOHANSON, U., LARSSON, C., KJELLBOM, P. The role of aquaporins in cellular whole plant water balance. **Biochim Biophys Acta**, 1465:324–342, 2000.

JOHANSON, U., KARLSSON, M., JOHANSSON, I., GUSTAVSSON, S., SJOVALL, S, L. FRAYSSE, WEIG, A.R., KJELLBOM, P, The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants, **Plant Physiol.** 126 1358–1369, 2001.

JOHANSON, U., GUSTAVSSON S. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants, **Mol. Biol. Evol.** 19:456–461, 2002.

JUNG, J.S., PRESTON, G.M., SMITH, B.L., GUGGINO, W.B., AGRE, P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. **J Biol Chem.** 269: 14648–14654, 1994.

KAISER, W.M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 71:142- 149, 1987.

KALDENHOFF, R., GROTE, K., ZHU, J.J., ZIMMERMANN, U. Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.14, p.121–128, 1998.

KATSUHARA M., AKIYAMA Y., KOSHIO K., SHIBASAKA M. & KASAMO K. Functional analysis of water channels in barley roots. **Plant and Cell Physiology**. 43, 885–893, 2002.

KATSUHARA M., KOSHIO K., SHIBASAKA M., HAYASHI Y., HAYAKAWA T. & KASAMO K. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. **Plant and Cell Physiology** 44, 1378–1383, 2003.

KAWASAKI, S., BORCHERT, C., DEYHOLOS, M., WANG, H., BRAZILLE, S., KAWAI, K., GALBRAITH, D., BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell** 13: 889–905, 2001.

KJELLBOM, P., LARSSON, C., JOHANSSON II, KARLSSON, M., JOHANSON, U. Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.308–314, 1999.

KIM, M.J., KIM, H.R., PAEK, K-H. Arabidopsis tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein. **Journal of General Virology**, v.87, p.3425–3431, 2006.

KRIEG, D. R. Stress tolerance mechanisms in above ground organs. p. 65–79. 1993. In: **Proceedings of the Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stress**. INTSORMIL, Nebraska.

KORIMBOCUS, J. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **J. Virol. Meth.**, v.103, p.109–20, 2002.

KREPS, J.A., WU, Y., CHANG, H.S., ZHU, T., WANG, X. AND HARPER, J.F. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiol.** 130: 2129–2141, 2002.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Capítulo 6: Transferência de vetores para *Agrobacterium*. Em: BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. Manual de Transformação Genética de Plantas. **EMBRAPA** – Brasília, DF, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. RIMA, São Carlos. 2000.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. AND HIGGINS, D.G. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Bioinformatics**, 23(21): 2947-2948, 2007.

LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZÉ P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Res**. 1;30(1):325-7, 2002.

LI, G.W., PENG, Y.H., YU, X., ZHANG, M.H., CAI, W.M., SUN, W.N. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. **J Plant Physiol**;165:1879–88, 2008a.

LI, G.W., ZHANG, M.H., CAI, W.M., SUN, W.N., SU WA. Characterization of OsPIP2;7, a water channel protein in rice. **Plant Cell Physiol** 2008b;49:1851–8.

LI, L., LI, S., TAO, Y., KITAGAWA, Y. Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. **Plant Sci** 154: 43–51, 2000.

LIAN, H.-L., YU, X., YE, Q., DING, X.-S., KITAGAWA, Y., KWAK S.-S., SU, W.-A. & TANG, Z.-C. The Role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant and Cell Physiology** .45: 481– 489, 2004.

LIANG, P. & PARDEE, A. B. Recent advances in *Differential Display*. **Current Opinion in Immunology** 7: 274-280, 1995.

LIBERLES, D. A. evaluation of methods for determination of a reconstructed history of gene sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**. 18: 2040- 2047, 2001.

LIU, L.H., LUDEWIG, U., GASSERT, B., FROMMER, W.B., VON WIREN, N.. Urea transport by nitrogen- regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*, **Plant Physiol**. 133; 1220–1228, 2003.

LIU D, TU L, WANG L, LI Y, ZHU L, ZHANG X. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in elongating cotton fibers. **Plant Cell Rep**, v.27:p.1385–94, 2008.

LIVAK, K.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOPEZ, T., A. BOUSSER, I. SISOËFF, M. GASPAR, B. LACHAISE, J. HOARAU AND A. MAHÉ. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. **Plant Cell Physiol**. 44:1384–1395, 2003.

LOPEZ, F., BOUSSER, A., SISOËFF, I., HOARAU, J., MAHÉ, A. Characterization in maize of ZmTIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.539-541, 2004.

LOQUE, D., LUDEWIG, U., YUAN, L., VON WIREN, N., Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole, **Plant Physiol**. 137 671–680. 2005.

LUDEVID, D., HÖFTE, H., HIMELBLAU, E., CHRISPPEELS, M.J. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein gamma-TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. **Plant Physiol**, v.100:p.1633–9, 1992.

MAATHUIS F.J., FILATOV V., HERZYK P., *et al.* Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. **Plant Journal** 35, 675–692, 2003.

MAESHIMA M, HARA-NISHIMURA I, TAKEUCHI Y, NISHIMURA M Accumulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and H⁺-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. **Plant Physiol** 106:61–69, 1994.

MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 52:469–497, 2001.

MAESHIMA, M. & ISHIKAWA, F. ER membrane aquaporins in plants. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**. v. 456, p.709–716. 2008.

MARUYAMA, K., TODAKA, D., MIZOI, J., YOSHIDA, T., KIDOKORO, S., MATSUKURA, S., TAKASAKI, H., SAKURAI, T., YAMAMOTO, Y.Y., YOSHIWARA, K., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H., SHINOZAKI, K. E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of Cis-Acting Promoter Elements in Cold- and Dehydration- Induced Transcriptional Pathways in Arabidopsis, Rice, and Soybean. **Dna Research**, 19, 37–49, 2012.

MARCOTTE, W.R. JR, RUSSELL, S.H. AND QUATRANO, R.S. Abscisic acid-responsive sequences from the em gene of wheat. **Plant Cell**, 1, 969–76, 1989.

MARIAUX, J.B., BOCKEL, C., SALAMINI, F., BARTELS, D. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant Mol Biol** 38: 1089–1099, 1998.

MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 399–429, 1997.

MAUREL, C., JAVOT, H., LAUVERGEAT, V., GERBEAU, P., TOURNAIRE, C., SANTONI, V., HEYES, J. Molecular physiology of aquaporins in plants. **Int Rev Cytol** 215: 105–148, 2002.

MAUREL, C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. **FEBS Lett**, v.1539 581, p.2227–2236, 2007.

MAUREL, C., SANTONI, V., LUU, D-T., WUDICK, M. M. AND VERDOUCQ, L. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. **Plant Biology**, 12:690–698. 2009.

MICHEL BE. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. **Plant Physiol**, 72: 66–70, 1983.

MICHEL BE, KAUFMANN MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiol**, 51:914–6, 1973.

MICHEL, D., SALAMINI, F., BARTELS, D., DALE, P., BAGA, M., SZALAY, A. Analysis of a desiccation and ABA-responsive promoter isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant J**, 4:29–40, 1993.

MORTON, B. R. GAUT, B. S. AND CLEGG, M. T. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the Palm and Grass families. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 11735- 11739. 1996.

MURATA, K., MITSUOKA, K., HIRAI, T., WALZ, T., AGRE, P., HEY- MANN, J.B., ENGEL, A. & FUJIYOSHI, Y. Structural de- terminants of water permeation through aquaporin-1. **Nature**, 407, 599-605, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiol Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

NEWTON, R.J., PADMANABHAN, V., LOOPSTRA, C. A., DIAS, M. A. D. L. Molecular Responses to Water-Deficit Stress in Woody Plants. **Handbook of plant and crop stress**. 2a. ed. 641p., 1999.

NIELSEN, R., BUSTAMANTE, C., CLARK, A.G., GLANOWSKI, S., SACKTON, T.B., HUBISZ, M.J., FLEDEL-ALON, A., TANENBAUM, D.M., CIVELLO, D., WHITE, T.J., et al: A Scan for Positively Selected Genes in the Genomes of Humans and Chimpanzees. **PLoS Biol**, 3(6):e170, 2005.

NOCTOR, G., FOYER, C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. Annual **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49(1):249–279, 1998.

OHTA, T. Genes families: Multigene families and Superfamilies. **Encyclopedia of the human genome**. 2003.(on-line).

OHSHIMA, Y., IWASAKI, I., SUGA, S., MURAKAMI, M., INOUE, K., MAESHIMA, M. Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.1119-1129, 2001

ONNO, Y., SEKI, M., NANJO, T., NARUSAKA, M., FUJITA, M., SATOH, R., SATOU, M., SAKURAI, T., ISHIDA, J., AKIYAMA, K., IIDA, K., MARUYAMA, K., SATOH, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AND SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA micro- array. **Plant J**. 34: 868–887, 2003.

PENG, Y.H., LIN, W.L., CAI, W.M., ARORA, R. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, 226:729–40, 2007.

.PFAFFL, M.W., HORGAN, G.W., DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results. 2002.

POU, A., MEDRANO, H., FLEXAS, J. e TYERMAN, S.D. A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering. **Plant, Cell and Environment**, 2012.01

PRESTON, G.M., JUNG, J.S., GUGGINO, W.B. & AGRE, P. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. **J Biol Chem** 269, 1668-1673, 1994.

QUIGLEY, F., ROSENBERG, J.M., SHACHAR-HILL, Y. AND BOHNERT, H.J. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. **Genome Biol.** 3, 1–17, 2001.

RASHEED-DEPARDIEU, C., PARENT, C., CRE`VECOEUR, M., PARELLE, J., TATINFROUX, F., LE PROVOST, G. AND CAPELLI, N. Identification and Expression of Nine Oak Aquaporin Genes in the Primary Root Axis of Two Oak Species, *Quercus petraea* and *Quercus robur*. **PLoS ONE** 7(12): e51838, 2012.

REIZER, J., REIZER, A., SAIER, M.H. Jr. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 28: 235–257, 1993.

RIBEIRO C. L., SASSAKI F.T., SOPRANO A. S., MAIA, I. G. Molecular Characterization of a Promoter Root-Especific of *Eucalyptus*. **Anais XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2009.

RODRIGUES,M.I. Amplificação, clonagem e sequenciamento do promotor de um gene que codifica uma aquaporina com expressão específica em raiz de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). 56p. **Dissertação (Bacharelado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2010.

SADE, N., VINOCUR, B.J., DIBER, A., SHATIL, A., RONEN, G., NISSAN, H., WALLACH, R., KARCHI, H., MOSHELION, M. Improving plant stress tolerance and yield

production: is the tonoplast aquaporin SIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? **New Phytol.** 181:651–61, 2009.

SAITOU, N. AND NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Mol. Biol. Evol.** 4(4):406-425, 1987.

SAKR S., ALVES G., MORILLON R., MAUREL K., DECOURTEIX M., GUILLIOT A., FLEURAT-LESSARD P., JULIEN J.-L. & CHRISPPEELS M.J. Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. **Plant Physiology** 133, 630–641, 2003.

SANGUINETI MC, DUVICK DN, SMITH S, LANDI P, TUBEROSA R. Effects of long-term selection on seedling traits and ABA accumulation in commercial maize hybrids. **Maydica**, 51:329–38, 2006.

SARDA, X., TOUSCH, D., FERRARE, K., CELLIER, F., ALCON, C., DUPUIS, J.M., CASSE, F., LAMAZE, T. Characterization of closely related d-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. **Plant Mol Biol** 40: 179–191, 1999.

SASSAKI, F. T. Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do banco forests (*eucalyptus* genome sequencing project consortium). 111p. **Dissertação (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.**

SAKURAI, J., ISHIKAWA, F., YAMAGUCHI, T., UEMURA, M. AND MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant Cell Physiol.** 46, 1568–1577. 2005.

SANTAMARIA M, LANAVE C AND SACCONI C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family. **Gene** 333: 51–59, 2004.

SCHAFFNER, A.R. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? **Planta** 204: 131–139, 1998.

SECCHI, F., LOVISOLO, C., SCHUBERT, A. EXPRESSION OF OEPIP2.1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stress and recovery, **Ann. Appl. Biol.** 150 163–167, 2007.

SÉGUIN, A., LAPOINTE, G., CHAREST, P.J. Chapter 8: Transgenic Trees. Em: Bruce A. & Palfreyman J. W. Forest Products Biotechnology. **Taylor & Francis Ltd.**, p.287-303, 1998

SHELDEN, M.C., HOWITT, S. M., KAISER, B. N. AND TYERMAN, S D. Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. **Functional Plant Biology**, 36, 1065–1078, 2009.

SHEN, Q. HO, D.H.D. Functional dissection of an abscisic acid inducible gene reveals two independent ABA responsive complexes each containing a G-Box and a novel cis-acting element. **Plant Cell** 7:295–307, 1995.

SMALL RL AND WENDEL JF. Copy number lability and evolutionary dynamics of the *Adh* gene family in diploid and tetraploid cotton (*Gossypium*). **Genetics** 155: 1913- 1926. 2000a

SMART, L.B., MOSKAL, W.A., CAMERON, K.D., BENNETT, A.B. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca* , **Plant Cell Physiol.** 42: 686-693, 2001.

SIEFRITZ F, TYREE MT, LOVISOLO C, SCHUBERT A, KALDENHOFF R. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. **Plant Cell** 14: 869–876, 2002.

STROUD, R.M., SAVAGE, D., MIERCKE, L.J.W., LEE, J.K., KHADEMI, S., HARRIES, W. Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels. **FEBS Lett**, 555:79-84, 2003.

SUGA, S., KOMATSU, S. AND MAESHIMA, M. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. **Plant Cell Physiol.** 43:1229–1237, 2002.

SUGA, S., MURAI, M., KUWAGATA, T. AND MAESHIMA, M. Differences in aquaporin levels among cell types of radish and measurement of osmotic water permeability of individual protoplasts. **Plant and Cell Physiology.** 44, 277–286, 2003.

SUI, H., HAN, B.G., LEE, J.K., WALIAN, P., JAP, B.K. Structural basis of water- specific transport through the AQP1 water channel. **Nature**, 414: 872–878, 2001.

TAJKHORSHID, E., NOLLERT, P., JENSEN, M.O., MIERCKE, L.J., O'CONNELL, J., STROUD, R.M., SCHULTEN, K. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. **Science**, 296, 525–530, 2002.

TAKANO J, WADA M, LUDEWIG U, SCHAAF G, VON WIREN N, 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.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p.2731-2739, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p.2731-2739, 2011.

THOMAS, D., BRON, P., RANCHY, G., DUCHESNE, L., CAVALIER, A., ROLLAND, J.P., RAGUENES-NICOL, C., HUBERT, J.F., HAASE, W., DELAMARCHE, C. Aquaglyceroporins, one channel for two molecules. **Biochim Biophys Acta**, 1555: 181–186, 2002.

Thompson, C. E. Divergência Funcional da Família Gênica da Álcool Desidrogenase em Plantas. 122p **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2006.

THUMMA, B.R., SHARMA, N., SOUTHERTON, S.G. Transcriptome sequencing of Eucalyptus camaldulensis seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms and genes under selection. **BMC Genomics**, 13:364, 2012.

TSUCHIHARA, A., HANBA, Y.T., KATO, N., DOI, T., KAWAZU, T., e MAESHIMA, M. Effect of overexpression of radish plasma membrane aquaporins on water-use efficiency, photosynthesis and growth of Eucalyptus trees. **Tree Physiology**. 30, 417–430, 2010.

TYERMAN, S.D., BOHNERT, H.J., MAUREL, C., STEUDLE, E. AND SMITH, J.A.C. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. **J. Exp. Bot.** 50: 1055–1071,1999.

TYERMAN SD, NIEMIETZ CM, BRAMLEY H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant Cell Environ** 25: 173–194, 2002.

UEHLEIN, N., LOVISOLO, C., SIEFRITZ, F., KALDENHOFF, R. The tobacco aquaporin NtAQPI is a membrane CO₂ pore with physiological functions. **Nature** 425, 734–737, 2003.
Vander Willigen *et al.*, 2006

VICENTINI, R., SASSAKI, F.T., GIMENES, M.A., MAIA, I.G., MENOSSI, M. *In silico* evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.487-495, 2005.

VILLELA, F.A. e BECKERT, O.P. Potencial Osmótico de soluções aquosas de polietileno glicol 8000. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, no 1, p.267-275, 2001.

VON CAEMMERER, S., FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas-exchange of leaves. **Planta**, 153, 376–387, 1981.

WAGNER, A. Selection and gene duplication: a view from the genome. **Genome Biology**, Vol 3 No 5, :reviews1012.1–1012.3, 2002.

WALLACE , I.S. AND ROBERTS, D.M. Homology Modeling of Representative Subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic/Arginine Selectivity Filter. **Plant Physiol**. Vol. 135, 2004

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.

WANG, W., VINOCUR, B., ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, 218: 1–14, 2003.

WANG, X., LI, Y., JI, W., BAI, X., CAI, H., ZHU, D., SUN, X-L., CHEN, L-J., ZHU, Y-M. A novel Glycine soja tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology** v.168: p.1241–1248, 2011.

WERNER, T. Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. **Mammalian Genome**, v.10, p.168–175, 1999.

YAMADA S, KATSUHARA M, KELLY W, MICHALOWSKI CB, BOHNERT HJ. A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue specific expression in the common ice plant. **Plant Cell**, **7**:1129-1142, 1995.

YAMADA, S., NELSON, D., LEY, E., MARQUEZ, S., BOHNERT, H.J. The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. **Plant Cell Physiol**, 38:1326-1332, 1997.

YE, X., BUSOV, V., ZHAO, N., MEILAN, R., MCDONNELL, L.M., COLEMAN, H.D., MANSFIELD, S.D., CHEN, F., LI, Y., E CHENG, Z-M. Transgenic Populus Trees for Forest Products, Bioenergy, and Functional Genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 30:415–434, 2011

ZHAO S, FERNALD RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **J Comput Biol**. 12:1047–1064, 2005.