



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS
CAMPUS PATOS**

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

**ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (AQUAPORINAS) EM *Mimosa
tenuiflora* (Willd.) Poir.**

PATOS-PARAÍBA-BRASIL

2015

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

**ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (AQUAPORINAS) EM *Mimosa
tenuiflora* (Willd.) Poir.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, na Área de Ecologia, Manejo e Utilização dos Recursos Florestais, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo A. Soares

Patos – Paraíba – Brasil

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

S719i

Souza, Tássia Laicya Vieira de

Isolamento parcial, identificação e caracterização de genes de proteínas transportadoras de água (aquaporinas) em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir./ Tássia Laicya Vieira de Souza. – Patos, 2015.
45f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

“Orientação: Prof.º Dr. Carlos Eduardo Alves Soares”

“Coorientação: Prof.ª Drª. Valesca Pandolfi”

Referências.

1. *Mimosa tenuiflora*. 2. MIPs. 3. Resposta e estresse. I. Título.

CDU 574

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

**ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (AQUAPORINAS) EM *Mimosa
tenuiflora* (Willd.) Poir.**

Aprovada em: 21 de maio de 2015.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares

Universidade Federal de Campina Grande (UACB/CSTR)
(Orientador)

Prof. Dr^a. Valesca Pandolfi

Universidade Federal de Pernambuco (CCB/Departamento de Genética)
(1º Examinador)

Prof. Dr. Éder Ferreira Arriel

Universidade Federal de Campina Grande (UAEF/CSTR)
(2º Examinador)

Dedico

Aos meus pais, Ana Rita e Valdemar, por sempre terem investido em minha educação e por estarem certos de que através dela seria capaz de alcançar voos maiores. Obrigada. Amo vocês.

Ofereço

À minha irmã Tudeana, por ser exemplo de esforço e superação. E a Jefferson, pela presença constante, com quem divido momentos difíceis e alegres. Com vocês quero compartilhar esta vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu maior mestre e principal fonte de inspiração, quem me faz acreditar sempre no melhor e me ajudar a sair de minha zona de conforto, indo além de minhas limitações. Amo-te.

À minha família, meus pais Ana Rita e Valdemar, as minhas irmãs Tudeana e Tacyana, aos meus sobrinhos Fábio e Samuel, por estarem ao meu lado e me apoiarem nos momentos de dificuldade, me fazendo superá-los.

Ao meu noivo Jefferson, por toda a sua compreensão e paciência nos momentos de ausência. E por sempre me apoiar.

Ao meu cunhado Fábio Kioshy, por me mostrar que disciplina e estudo é a melhor forma para conseguirmos o que desejamos.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo, por ter aceitado me orientar e por me abrir as portas em um ótimo centro de pesquisa em biologia molecular na UFPE, com a professora Dr^a Ana M^a Benko Iseppon.

À professora Dr^a Ana M^a Benko Iseppon, da UFPE, por ter permitido o desenvolvimento da parte de bancada no laboratório de genética e biotecnologia vegetal, CCB, departamento de genética da UFPE, onde tive uma experiência ímpar na parte molecular. Por trás dessa ótima pesquisadora existe também uma ótima equipe – Dr^a Valesca Pandolfi, Rebeca, Neto, Filipe, Lidiane, João Pacífico, Sheyla e Stephane. Agradeço também em especial a Valesca e Rebeca, por terem tido a paciência e bondade de me ensinar o que era necessário.

Ao Sr. Romildo, funcionário da UFPE, por todo seu auxílio e aos momentos de conversa.

Agradeço mais uma vez a Dr^a Valesca Pandolfi, por ter disponibilizado um tempo em sua agenda lotada para participar da minha defesa e contribuir mais uma vez com sua experiência na área.

Ao professor Dr. Éder Arriel, que além de professor sempre foi um bom incentivador e amigo, desde a minha graduação. Por ser um exemplo de professor e por me prestigiar com sua presença na banca de defesa.

À minha família de Recife Harue, Willian, Eiki e Luizete pela acolhida na época em que precisei ficar em Recife. Obrigada pela companhia e incentivo.

A minha amiga Manoela pelo incentivo e por todo o apoio quando precisei.

À professora Dr^a Maria das Graças, por ter sido minha supervisora no estágio de docência e por ensinar com tanta generosidade.

Ao secretário da Pós-Graduação de Ciências Florestais, Paulo, por toda a sua competência, profissionalismo e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À CAPES, pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, por me proporcionar crescimento pessoal e profissional.

A escola Municipal Monsenhor Manoel Vieira da cidade de Patos, em especial ao diretor Ralph, ao vice-diretor Hermano Marinho e a supervisora Jaqueline por toda a compreensão nos momentos em que precisei me ausentar, dando todas as condições necessárias para isso e não sendo em nenhum momento nesta época de estudo empecilho, mais sim incentivo e apoio.

A escola SESI da cidade de Patos também por terem me liberado no momento em que precisei me ausentar para desenvolver os trabalhos de laboratório em Recife.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

Souza, Tássia Laicya Vieira de. **ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (AQUAPORINAS) EM *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.** 2015. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. CSTR/UFCG, Patos-PB, 45p.

RESUMO

A jurema-preta pertence à família Fabaceae, com importância em áreas semiáridas. É utilizada, principalmente, na produção de lenha, carvão e estacas, também na recuperação de áreas degradadas por ser uma espécie pioneira. Entretanto, o estresse hídrico, principal adversidade ambiental em regiões semiáridas, faz com que esta espécie apresente adaptações morfológicas e fisiológicas, fazendo com que ela suporte um longo período de seca. Neste sentido, é necessário o estudo de proteínas que atuam como facilitadoras da passagem de água entre as membranas, como as aquaporinas. Apesar da grande quantidade de dados sobre as aquaporinas nos vegetais, nada se sabe sobre estes transportadores de membrana na jurema-preta. Dessa forma, a identificação de genes que controlam os mecanismos de defesa e adaptação desta espécie, a falta de água será de grande utilidade para melhor manejo da espécie. A área da bioinformática possui várias ferramentas que permite analisar os dados moleculares, como os genes ou proteínas e uma delas é o programa BLAST, que faz uma busca por sequências similares dentro de um banco de dados público. Assim, através das técnicas biotecnológicas e da bioinformática podemos identificar quais genes de aquaporinas são induzidos pelo estresse hídrico, permitindo que a planta suporte sobreviver no bioma Caatinga, que passa a maior parte do ano em período de estiagem.

Palavras chaves: *Mimosa tenuiflora*, MIPs, resposta a estresse.

Souza, Tássia Laicya Vieira de. **INSULATION PARTIAL, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN WATER CARRIER GENES (AQUAPORINS) IN *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.** In 2015. Dissertation in Forest Science. CSTR / UFCG, Patos-PB, 45p.

ABSTRACT

Jurema belongs to the Fabaceae family, with importance in semi-arid areas. It is used mainly in the production of firewood, coal and pilings, also the recovery of degraded areas to be a pioneer species. However, water stress, major environmental adversity in semi-arid regions, makes this species present morphological and physiological adaptations, causing her to support a long drought. Therefore, it is necessary to study proteins that act as facilitating the passage of water between the membranes, such as aquaporins. Despite the large amount of data on aquaporins vegetables, nothing is known about these membrane transporters in Jurema. Thus, the identification of genes that control the defense mechanisms and adaptation of this species, the lack of water will be very useful to better management of the species. The field of bioinformatics has various tools that can analyze molecular data, such as genes or proteins and one of them is the BLAST program, which is a search for similar sequences in a public database. Thus, with biotech and bioinformatics techniques we can identify which genes are aquaporins induced water stress, allowing the plant to survive in support Caatinga biome, which spends most of the year in the dry season.

Key words: *Mimosa tenuiflora*, MIPs, response to stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Detalhes das folhas (A), de um ramo com inflorescência (B) e de um ramo com frutos (C) da espécie jurema-preta..... 16
- Figura 2 - Exemplo do transporte de moléculas de água por meio das aquaporinas nas membranas celulares..... 20
- Figura 3 - Esquema de localização das subfamílias de aquaporinas nas organelas vegetais. PIPs: localizadas na membrana plasmática; TIPs: localizadas no vacúolo; NIPs: localizadas no retículo endoplasmático e membrana plasmática; SIPs: Localizada no retículo endoplasmático. Além do transporte de água, transportam: PIP (CO₂ e uréia), TIP (uréia, amônia, glicerol e H₂O₂), NIP (amônia, uréia, glicerol, boro e lactato)..... 21
- Figura 4 - Diagrama da estrutura de uma aquaporina, demonstrando as principais características estruturais. Alfa-hélices representadas pelos retângulos azuis. Onde estão presentes os seis domínios transmembrana (H1-H6), conectados pelos cinco loops (LA-LE). Dois domínios alfa-hélices nos loops B e E, contendo os dois motivos NPA, formadores do poro..... 23
- Capítulo I - ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (Aquaporinas) em *Mimosa tenuiflora* (willd.) Poir**
- Figura 1 - Gel de agarose 2,5% com as principais bandas isoladas para sequenciamento, representando as subfamílias PIP, TIP (A), bem como as bandas representativas de NIP e SIP (B)..... 37
- Figura 2 – Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da sequência de interesse PIP1-4..... 38
- Figura 3 -Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da sequência de interesse PIP1-4..... 39
- Figura 4 - Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da sequência de interesse NIP1-2..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos programas presentes no algoritmo BLAST para comparação de sequências.....	26
 Capítulo I - ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (Aquaporinas) em <i>Mimosa tenuiflora</i> (willd.) poir	
Tabela 1 - Sequências após o BLASTx da sequência PIP1-4, com a descrição, acesso, identidade, <i>query cover</i> e <i>E-value</i>	38
Tabela 2- Sequências após o blastx da banda PIP2-1, com a descrição, acesso, identidade, <i>query cover</i> e <i>E-value</i> das <i>subjects</i>	39
Tabela 3- Sequências após o BLASTx da banda NIP1-2, com a descrição, acesso, identidade, <i>query cover</i> e <i>E-value</i> das <i>subjects</i>	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 A Caatinga	15
2.2 <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.)Poir.	16
2.2.1 Características botânicas	16
2.2.2 Importância econômica e ecológica	16
2.3 Relações hídricas e resposta ao déficit hídrico	17
2.3.1 Relação entre a água e as plantas	17
2.3.2 Resposta ao déficit hídrico	18
2.3.3 Resposta molecular ao déficit hídrico	19
2.4 Aquaporinas: diversidade, classificação e atividade	19
2.4.1 Estrutura e localização das aquaporinas	23
2.5 Bioinformática e os bancos de dado	24
3 REFERÊNCIAS	27
Capítulo I – ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (Aquaporinas) em <i>Mimosa tenuiflora</i> (willd.) poir	
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2.MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1.Obtenção do material vegetal	35
2.2.Reação em cadeia da polimerase – PCR	35
2.3.Eletroforese, purificação dos fragmentos e Sequenciamento	36
2.4.Análises de Bioinformática	36
3.RESULTADOS	37
4.DISSCUSSÃO	41
5.CONCLUSÕES	43
6.REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A vegetação Caatinga contém várias adaptações fisiológicas às condições estressantes do semiárido, sendo assim, estudá-las é de suma importância para o conhecimento desse ecossistema. A compreensão dessas variáveis fisiológicas possibilita o entendimento de como as espécies vegetais são capazes de se estabelecer neste ambiente, com fenótipos determinados pelo seu patrimônio genético, consentindo-lhes a permanência e a sua evolução nos diversos ambientes, muitas vezes considerados inóspitos e inviáveis à sobrevivência (TROVÃO et al., 2007). Comumente as espécies de caatinga exibem adaptações morfológicas e/ou fisiológicas que permitem a sobrevivência em condições de seca (TROVÃO et al., 2007).

O homem explora a vegetação caatinga de forma empírica, não levando em conta os riscos e a fragilidade a que a mesma está exposta. Por outro lado, dados sobre a diversidade e/ou estrutura genética de suas espécies de plantas são extremamente importantes, antes que decisões sobre manejo sejam adotadas. A caracterização genética pode também prover informações para o planejamento de tais atitudes.

A jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. faz parte da família Fabaceae, da subfamília Mimosoideae, distribuída nas vastas área do bioma Caatinga. Por ser uma planta pioneira exige menos nutrientes do ambiente, sendo adequada para recuperação de áreas degradadas. Devido as suas potencialidades, é muito usada em nossa região, especialmente para produção de lenha, carvão e como forrageira, sendo que na maioria das vezes é utilizada de maneira indevida, o que poderá causar sua extinção, fazendo com que o bioma perca uma das espécies mais adaptáveis a seus fatores abióticos extremos.

O estresse hídrico que essa espécie está submetida diariamente se torna uma ferramenta importante para uma possível caracterização de genes, envolvidos na produção de proteínas e no transporte de água. Um dos genes com essa função são as aquaporinas, que produzem as proteínas da família MIPs (Proteínas Intrínsecas da Membrana), sendo subdividida em PIPs (proteínas intrínsecas de membrana plasmática), TIPs (proteínas intrínsecas do tonoplasto), NIPs (membrana de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio na raiz), SIPs (proteínas pequenas intrínsecas) e XIPs (proteínas intrínsecas desconhecidas).

Da identificação funcional da primeira aquaporina de plantas, em 1993 aos dias atuais, uma ampla quantidade de informações sobre a estrutura, a localização e a função dos diferentes membros desta família multigênica de proteínas de membrana foi disponibilizada pela comunidade científica. A princípio, consideradas como “simples canais de água”, as aquaporinas são capazes de transportar gases e pequenos solutos neutros, como glicerol, uréia

e silício. Devido à redundância dos genes de aquaporinas e à sua distribuição em todos os órgãos e tecidos vegetais, essas proteínas são importantes na manutenção de funções vitais, como absorção de água e nutrientes em raízes, germinação de sementes, fotossíntese, transpiração e reprodução (GASPAR, 2011).

Há disponibilização de grande quantidade de informações genéticas e foram desenvolvidas técnicas de bioinformática permitindo a interpretação devida dos dados, mostrando grande demanda por parte dos que se interessam pela análise comparativa das sequências. A ferramenta mais usada para o exame das sequências é o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que identifica rapidamente a presença de sequências semelhantes entre si. Essas podem indicar homologia e identificar a função (AMARAL, 2007).

Assim, através das técnicas biotecnológicas e da bioinformática podemos identificar quais genes de aquaporinas são induzidos pelo estresse hídrico, permitindo com que a planta suporte sobreviver no bioma Caatinga que passa a maior parte do ano em período de estiagem. Como a *M. tenuiflora* é uma espécie encontrada vastamente nessa região, podemos considerá-la altamente adaptável às suas condições inóspitas e poderá ser utilizada em estudos de melhoramento genético.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Caatinga

A Caatinga ocupa aproximadamente 11% do território nacional, sendo o mais importante ecossistema/bioma da região nordeste e o único totalmente brasileiro (BRASIL, 2007). Segundo Sampaio e Rodal (2000), a área deste bioma é de aproximadamente 935 mil Km² que vai do norte de Minas Gerais, passando pela Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí.

Apresentando os seguintes dados catalogados: 932 espécies de plantas, 148 espécies de mamíferos e 510 espécies de aves, que demonstram sua grande riqueza, tanto para o ecossistema local como para a economia nacional, onde se encontra jazidas de minérios e petróleo. Entretanto, como outros ecossistemas, a caatinga está ameaçada pela ação antrópica, sem a devida ciência total da sua biodiversidade (ARAÚJO et al., 2005).

Essa região é denominada ‘polígono das secas’, devido ao seu clima semiárido, quente, seco e com baixa pluviosidade (entre 250 e 800 mm anuais) e com duas estações bem distintas durante o ano: uma estação seca (verão), com sete a nove meses sem ou quase nenhuma chuva e uma estação chuvosa (inverno), com três a cinco meses de chuvas irregulares, torrenciais, locais e de pouca duração. Além disso, as plantas e animais da caatinga apresentam propriedades especiais que lhes permitem viver nessas condições desfavoráveis (MAIA, 2004).

Os fatores abióticos da caatinga apresentam um aspecto agressivo da vegetação, indicando uma rápida adaptação das plantas às condições de aridez, com um colorido variado das flores arbóreas no período seco e a exibição da beleza e riqueza do estrato herbáceo sazonal durante a estação úmida (PAZ, 2010). As condições ambientais podem provocar vários estresses nas plantas, um deles é o déficit hídrico (LARCHER, 2000).

Por possuir um domínio climático distinto, as plantas da caatinga desenvolveram mecanismos de defesa para sobreviverem, tais como: transpiração cuticular reduzida; plantas decíduas; plantas esparsas para evitar a competição de água e nutrientes; plantas de porte baixo; forma compacta; raízes profundas; raízes e tecidos de reservas de água, presença de espinhos e acúleos (LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.2 *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir.

2.2.1 Características Botânicas

Mimosa tenuiflora (Willd) Poir., popularmente conhecida como jurema-preta, faz parte da família Fabaceae, subfamília Mimosoideae (JUDD et al., 2009). É um arbusto com cerca de 5 a 7 metros, espinhos esparsos, caule ereto ou um pouco inclinado, casca de cor castanha-escuro, grossa, rugosa, fendida longitudinalmente e entrecasca vermelho-escuro. As folhas são: compostas, alternas e bipinadas, de 4 a 7 pares de pinas com comprimento de 2 a 4 cm. Possui flores pequenas de cor clara, arranjadas em espigas isoladas, de 4 a 8 cm de comprimento. O fruto é vagem, tardiamente deiscente, com 2,5 a 5 cm de comprimento, casca fina e frágil quando maduro (Figura 1) (MAIA, 2004).



FIGURA 1 – Detalhes das folhas (A), de um ramo com inflorescência (B) e de um ramo com frutos (C) da espécie jurema-preta. Adaptado Azevêdo, 2011.

2.2.2 Importância econômica e ecológica

No Nordeste, a jurema-preta tem sido amplamente usada para fabricação de estacas e de lenha, devido a sua alta densidade básica (ARAÚJO et al., 2004). A lenha é removida de comunidades nativas, sendo usada como energia em fornos de padarias, olarias, cerâmicas e residências, colaborando com cerca de 30% da matriz energética do estado da Paraíba (FERREIRA, 1994).

Também se destaca como um importante nutriente na alimentação de ruminantes locais (caprinos, ovinos e bovinos), tendo nessa, principalmente pastejando as rebrotas mais jovens no período das chuvas, como também as folhas e vagens secas durante a época de

estiagem (PEREIRA, 2010). Por ser uma planta facilmente encontrada nessa região, destaca-se como uma importante forrageira para os animais, especialmente na época de estiagem.

Outro recurso florestal que possui é a grande quantidade de tanino, especialmente na casca, sendo de muito valor para a indústria de curtumes de peles (MAIA, 2004). Também apresenta atividade antimicrobica, onde já há estudos na literatura (PEREIRA, 2010).

A jurema-preta encontra-se em locais de desenvolvimento secundário, com baixo teor de umidade, de solos profundos, alcalinos, com baixa fertilidade e de crescimento lento. Sua capacidade de enraizamento em terrenos compactos torna essa espécie uma excelente candidata na regeneração de áreas degradadas. É uma planta indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e tende ao longo do processo a diminuição da densidade (BEZERRA, 2008).

De uma forma geral, pode-se dizer que esta espécie apronta uma região nos primeiros estágios de sucessão para o surgimento de espécies mais exigentes dos estágios sucessionais mais progredidos observados na Caatinga (BAKKE, 2005). Fornece, dentre outros fatores, sombra, proteção ao solo e a produção de uma fina camada de húmus, por meio da deposição da sua serapilheira, o que contribui para o desenvolvimento de outras espécies vegetais (MAIA, 2004).

A região semiárida do Nordeste do Brasil é muito pobre em nitrogênio e fósforo. A fixação do nitrogênio atmosférico (N_2) pelas leguminosas, quando ligadas a bactérias dos gêneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*, diminui ou não necessita da adubação nitrogenada (BAKKE, 2005). Portanto, pode ser utilizada para alternar em plantios de espécies que possuem dificuldade de fixar o nitrogênio, adubando-o.

2.3 Relações hídricas e resposta ao déficit hídrico

2.3.1 Relação entre a água e as plantas

As plantas necessitam de água para que o seu metabolismo e seu desenvolvimento ocorram adequadamente. Assim, o nível de água determina a estrutura de muitas proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e ainda outros componentes citológicos. Segundo Taiz e Zeiger (2009), a água é importante no desenvolvimento da planta em todo o seu ciclo de vida, pois, influencia no conteúdo celular e no turgor da planta.

A absorção de água pela planta ocorre em toda a sua superfície, sendo a maior parte advinda do solo (PAIVA; OLIVEIRA, 2006). A quantidade de água absorvida pela raiz depende de diversos fatores, tais como: água disponível no solo para a planta, do arejamento, da temperatura do solo, da concentração da solução e da taxa de transpiração (KERBAUY, 2004).

A entrada da água na planta através do sistema radicular ocorre através de processos osmóticos (não envolvendo, portanto, gasto de energia), ou seja, é transportada do meio menos concentrado para o meio mais concentrado em solutos, sendo necessária para o equilíbrio hídrico – a diferença entre a água absorvida e a água perdida num determinado espaço de tempo (RAVEN et al., 2007).

Na caatinga, a condição ambiental que mais influencia nas respostas das plantas ao ambiente é a quantidade de água (ARAÚJO, 2005). O mesmo autor explana que estas respostas podem vir a contribuir ou não para a sobrevivência e a reprodução destas plantas nestes locais.

2.3.2 Resposta ao déficit hídrico

Do ponto de vista fisiológico, o estresse é compreendido como uma alteração das condições ótimas para a vida, vindo a induzir modificações em todos os níveis funcionais do organismo, em resposta às novas condições (LARCHER, 2000; ARAÚJO, 2005). Não há um mecanismo universal de tolerância à seca, pois as plantas respondem por meio de processos adaptativos distintos à escassez de água (TAIZ; ZEIGER, 2009; VELLINI et al., 2008).

A diversidade da caatinga contém características fisiológicas que apresentam adaptações complexas e peculiares às condições ambientais únicas (TROVÃO et al., 2007). O mecanismo de fechamento estomático, nas horas mais quentes do dia, é uma tática utilizada por muitas espécies que habitam regiões áridas e semiáridas, evitando a perda excessiva de água por meio da transpiração (SILVA et al., 2004).

Condições de déficit hídrico reduz a taxa fotossintética determinada pelo fechamento dos estômatos. A regulação do fechamento e abertura estomática é controlada pelos hormônios ácidos abscísicos e citocininas, respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2002). Ocorrendo, devido ao declínio de turgor da folha, um déficit da pressão de vapor de água na atmosfera ou ainda à recepção de sinais de seca pelas raízes.

Para evitar uma condição de seca, as plantas otimizam os seus processos de absorção e retenção de água. Permanecem desenvolvendo suas raízes, de forma a ampliar sua área de

captação de água, fecham os estômatos, modificam os ângulos das folhas, até mesmo perdem as folhas por inteiro, reduzindo a perda de água (CHAVES et al., 2002).

2.3.3 Resposta molecular ao déficit hídrico

A percepção de sinais que indicam déficit hídrico nas plantas desencadeiam vários mecanismos de resposta. Estes mecanismos serão processados em diferentes graus, tendo como objetivo diminuir as lesões que este tipo de estresse pode provocar na planta. A amplitude da resposta muda de acordo com a capacidade de percepção do sinal e com a resposta que ocorre ao nível de expressão gênica; ou ainda de outros processos metabólicos, que possam ser peculiares a algumas plantas, como as que são tolerantes à seca (BARTELS; SUNKAR, 2005).

Estresses abióticos quase sempre levam a ativação de genes de vias de sinalização celular (KNIGHT; KNIGHT, 2001; ZHU, 2002) e respostas celulares, como a expressão de proteínas de estresse e a de substâncias antioxidantes (CUSHMAN; BOHNERT, 2000). Alguns desses são membros das aquaporinas, canais específicos para água, íons e outros pequenos solutos. À medida que as proteínas canal empilham-se no tonoplasto (membrana do vacúolo) durante o estresse, há uma modificação no movimento da água e dos solutos do vacúolo para o citoplasma, alterando tanto o teor de água quanto o potencial osmótico do citoplasma (NEPOMUCENO et al., 2001).

2.4 Aquaporinas: diversidade, classificação e atividade

Desvendada na década de 90, as aquaporinas são proteínas de membrana responsáveis pela condução de moléculas de água, constituindo um verdadeiro canal proteico (MAUREL; CHRISPEELS, 2001). O papel das aquaporinas é de suma importância, sendo componentes centrais nas relações hídricas das plantas e como uma opção para difusão facilitada da água pela membrana plasmática, ampliando a permeabilidade da mesma (Figura 2) (JAVOT; MAUREL, 2002; TYERMAN et al., 2002; MENESES et al., 2006).

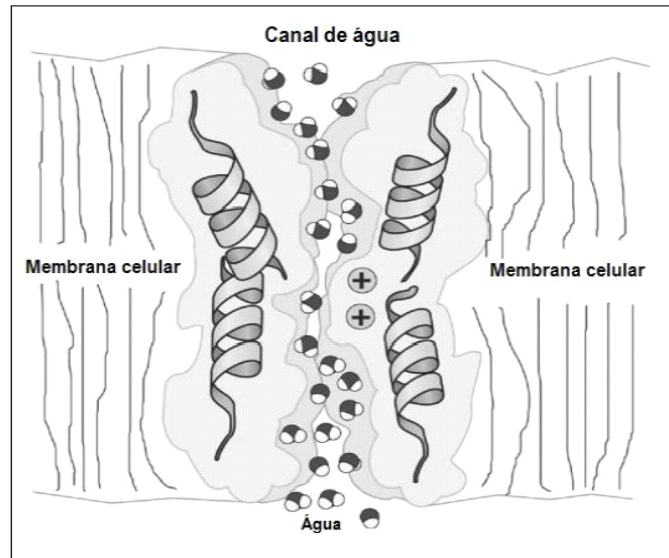


FIGURA 2 - Exemplo do transporte de moléculas de água por meio das aquaporinas nas membranas celulares. (Adaptada de Zhao et al., 2008).

Presentes em diversos seres vivos, tais como animais e fungos, a expressão dos genes para aquaporinas é regulada de forma distinta. Alguns destes genes são essenciais, tendo expressão contínua, outros são acionadas em determinadas condições, como quando na imposição de estresse (PARK et al., 2010).

A superfamília MIPs (Major Intrinsic Proteins - Proteínas Intrínsecas de Membrana) é mais diversa e complexa em plantas do que em animais, isso pode estar relacionado com a forma sésil das plantas e a falta de um sistema circulatório (FORREST;BHAVE, 2007). Segundo Wudick et al. (2009). Essa ampla variedade de aquaporinas em plantas poderia ser pertinente à seletividade e aos diferentes substratos, como também aos vários padrões de localização celular e tecidual, ao alto nível de compartimentalização das células vegetais e às várias funções celulares que requerem o equilíbrio hídrico e osmótico entre os compartimentos.

As aquaporinas são representadas pela superfamília das MIPs, a qual é dividida em 5 grupos: PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins) são proteínas intrínsecas de membrana plasmática; TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins) proteínas intrínsecas do tonoplasto; NIPs (Nodulin-26-like Intrinsic Proteins) presente na membrana de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio na raiz, sendo encontrada também em plantas não leguminosas; SIPs (Small basic Intrinsic Proteins) são proteínas pequenas intrínsecas; e XIPs (X Intrinsic Proteins) ou proteínas intrínsecas desconhecidas, recentemente descobertas e presentes especialmente em

musgos, fungos e plantas dicotiledôneas (Figura 3) (MAUREL et al., 2008; PARK et al., 2010).

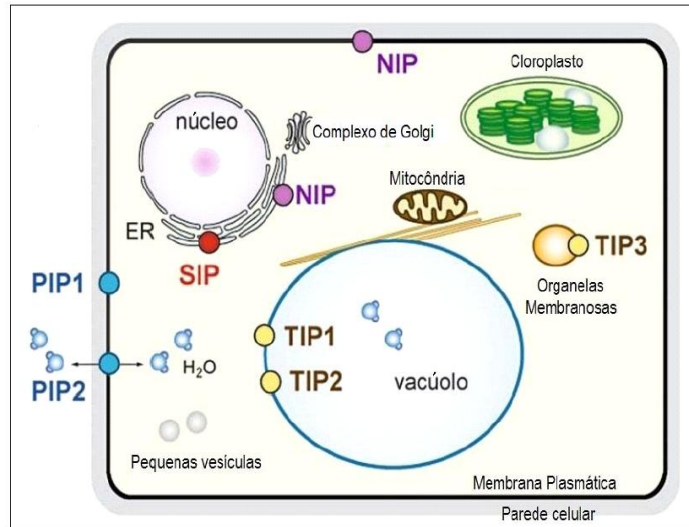


FIGURA 3 - Esquema de localização das subfamílias de aquaporinas nas organelas vegetais. PIPs: localizadas na membrana plasmática; TIPs: localizadas no vacúolo; NIPs: localizadas no retículo endoplasmático e membrana plasmática; SIPs: Localizada no retículo endoplasmático. Além do transporte de água, transportam: PIP (CO_2 e ureia), TIP (ureia, amônia, glicerol e H_2O_2), NIP (amônia, ureia, glicerol, boro e lactato). Adaptado de Maeshima e Ishikawa (2008).

As aquaporinas têm função muito importante em situações de seca. Foram realizados diversos estudos em casos de déficit hídrico, demonstrando que a transcrição das PIPs é alterada, tendo a expressão destes genes de acordo com a tolerância das plantas (MAUREL et al., 2008; ZHANG et al., 2007). Também é observada indução na expressão, como por diferentes fatores de estresse abiótico (déficit hídrico) (MAUREL et al., 2002).

Muitas proteínas de membrana da família MIP transportam outras substâncias como: NH_3 , CO_2 e outros pequenos solutos (TYERMAN et al., 2002; LUDEWIG; DYNOWSKI, 2009). Membros da subfamília PIP agem na condução de água, enquanto que os membros da subfamília TIP conduzem água, amônia, uréia e glicerol. Os membros da subfamília NIP estão interligados ao transporte de água, glicerol ou boro (raízes), enquanto SIP tem afinidade no transporte de pequenos solutos básicos (MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008).

Há uma variedade de isoformas de aquaporinas em plantas, permitindo-lhes vantagens adaptativas para o crescimento sob as mais variadas condições, provavelmente como resultado das diferentes seletividades e mecanismos regulatórios (CHAUMONT et al., 2005).

Plantas como: arroz, milho e *Arabidopsis*, apresentam mais de 30 homólogos identificados (CHAUMONT et al. 2001, JOHANSON et al. 2001, SAKURAI et al.

2005), enquanto que em *Populus* e algodão foram identificados 55 e 63 genes de aquaporinas, respectivamente (GUPTA et al. 2009, PARK et al. 2010).

As proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP) estão presentes em tecidos com alto fluxo de água, como tecidos vasculares, célula guarda de estômatos e flores. Membros da subfamília PIP são expressos em raízes, elementos de floema e folhas, podendo ter importante papel na comunicação célula-a-célula (DYNOWSKI et al., 2008). As PIPs dividem-se em duas subfamílias, as PIP1 e as PIP2. As PIP1 possui menos capacidade no transporte de água quando comparadas com as PIP2 (CHAUMONT et al., 2001).

A subfamília TIP de aquaporinas são canais de transporte para água, mas que também são permeáveis para uréia, glicerol e amônia. Encontram-se na membrana do vacúolo celular, com a função de transportar água e pequenos solutos através da membrana, atuando também nos processos de regulação do turgor, sinalização e degradação celular. Várias TIPs estão associadas com a osmorregulação, além do transporte de pequenos solutos e gases, junto com o transporte de metabólitos para vias importantes como o ciclo da uréia ou de produção de aminoácidos (KALDENHOFF; FISCHER, 2006).

A expressão de membros da subfamília TIP ocorre especialmente na membrana do tonoplasto, sendo importante para a movimentação intracelular de água e outras pequenas moléculas. Trata-se de proteínas em maior quantidade no tonoplasto, consentindo o rápido ajustamento osmótico, operando na manutenção da osmolaridade e do turgor (GOMES et al., 2009).

Em diversos experimentos, membros das NIPs mostraram-se funcionais para o transporte de água e glicerol, mas exibem primariamente baixa permeabilidade para a água. Seus transcritos são identificados em sementes, caules e raízes, além das membranas do simbiossomo, quando estas existem (KALDENHOFF; FISCHER, 2006; GOMES et al., 2009).

A expressão dos membros da subfamília NIP é inferior à de PIP e TIP, estando interligado a especializações celulares, tais como zonas de alongação radicular. Devido à sua localização e expressão particulares, os processos em que este grupo atua ainda são em grande parte desconhecidos (GOMES et al., 2009).

A subfamília SIP é representada por pequenas proteínas básicas intrínsecas de membrana, sendo o menor grupo dentre as MIPs. A função das SIPs vegetais por enquanto não foi definida, porém, estudos *in vitro* mostraram que estas agem no transporte de água através da membrana do retículo endoplasmático, controlando o volume e a concentração iônica do lúmen, assim como a morfologia da organela (FORREST; BHAVE, 2007).

2.4.1 Estrutura e localização das aquaporinas

Apresenta um tamanho de 26-30 kDa, presentes em todos os reinos (FORREST; BHAVE, 2007). Estes transportadores especializaram-se em termos de localização, função (envolvidos no transporte de uma diversidade de substratos), além de apresentarem diversos efeitos na fisiologia vegetal (JOHANSON et al., 2001; FORREST; BHAVE, 2007; GOMES et al., 2009). As aquaporinas apresentam estrutura tetramérica, composta por 4 monomeros, cada um com um poro ativo (MAUREL et al., 2008).

As estruturas das MIPs (Figura 4) são bem conservadas, constituídas por: seis alfa-hélices hidrofóbicas que compõem os domínios transmembrana (H1-H6); cinco loops entre as alfa-hélices (A-E, onde os loops B e E são hidrofóbicos, parcialmente inseridos nas membranas e os demais são hidrofílicos), havendo dois motivos NPA (asparagina-prolina-alanina) altamente conservados nos loops B e E (FORREST; BHAVE 2007; GOMES et al., 2009).

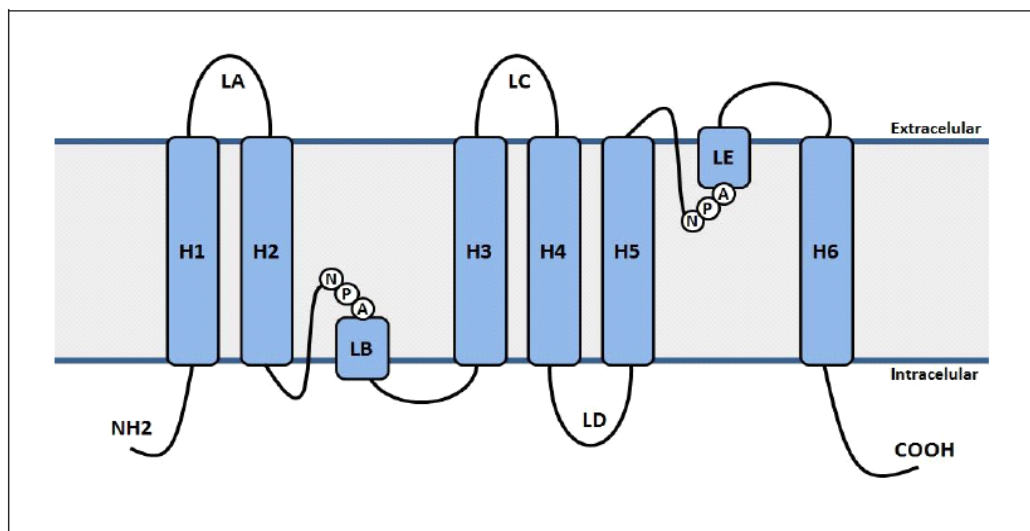


FIGURA 4 - Diagrama da estrutura de uma aquaporina, demonstrando as principais características estruturais. Alfa-hélices representadas pelos retângulos azuis. Onde estão presentes os seis domínios transmembrana (H1-H6), conectados pelos cinco loops (LA-LE). Dois domínios alfa-hélices nos loops B e E, contendo os dois motivos NPA, formadores do poro. Adaptado de Bezerra -Neto (2011).

Outra estrutura relacionada à seletividade de substrato nas diferentes MIPs para água ou outras moléculas polares são os resíduos de aminoácidos conservados, abrangendo a região arginina/aromática (ar/R). Esta região compreende uma tétrade formada por dois resíduos conservados localizados nas alfa-hélices H2 e H5, bem como duas no loop E (LE1 e LE2),

encontrada no centro do poro, formando uma segunda constrição, separada do motivo NPA, atuando na afinidade por substratos (FORREST; BHAVE, 2007). O resíduo de arginina conservado é importante por conter pontes de hidrogênio para o transporte de moléculas de água ou glicerol ou ainda desviar cátions do poro (SUI et al., 2001).

2.5 Bioinformática e os bancos de dados

De maneira simplificada, podemos definir a bioinformática como uma área interdisciplinar da ciência que envolve tecnologia da informação, biologia, matemática, estatística, química, física e outras disciplinas, sendo principalmente aplicada nas questões da biologia molecular. Assim, a bioinformática faz a utilização de programas computacionais para reconhecer, caracterizar e mapear genes, interpretando a estrutura de suas respectivas proteínas (SABBATINI, 1999). De acordo com Sabbatini (1999), a bioinformática apareceu devido à necessidade de acessar e manusear, de maneira eficaz, uma ampla quantidade de dados, objetivando a geração de novos conhecimentos.

Desse modo, com o objetivo, não apenas de guardar a grande quantidade de dados produzidos pelas diferentes ‘ômicas’, mas também de acessar de forma acelerada e eficiente esse grande volume de dados, teve início a produção de bancos de dados públicos e privados e de redes de acesso que admitissem a interação entre estes grupos, bem como o acesso e depósito contínuo de dados (PROSDOCINI et al., 2002).

Nas últimas décadas, vários bancos de dados têm sido construídos objetivando armazenar e organizar esta grande quantidade de dados, ademais, a maior parte destes dados disponibilizam ferramentas que permitem a análise das sequências. Embora existam vários bancos de dados com acesso restrito, recentemente a tendência é que estes dados estejam disponibilizados e sejam acessíveis a todos os pesquisadores.

Há três bancos de dados: EMBL-Bank (European Molecular Biology Laboratory Databank; Banco de Dado do Laboratório de Biologia Molecular Europeu), DDBJ (DNA DataBank of Japan; Banco de Dados de DNA do Japão), dentre outros. O GenBank faz parte do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI; National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo um banco de dados público integrativo e abrangente, apresentando informações de diferentes tipos e origens. Ultimamente, este banco contém sequências nucleotídicas de mais 380.000 organismos, obtidas especialmente por meio da submissão de grupos de pesquisa individuais e também de

projetos de sequenciamento em larga escala, que incluem ESTs e WGS (Whole Genome Shotgun; Fragmentação do Genoma Inteiro) (BENSON et al., 2011).

Juntamente à criação dos bancos de dados, muitas ferramentas consentem o acesso e análise deste grande número de dados e foram produzidas pela bioinformática. Estas ferramentas permitem, por exemplo, uma análise *in silico* de sequências desconhecidas e novos genes, através da análise de alinhamentos comparativos (KENT et al., 2002).

O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Ferramenta de Busca por Alinhamento Local) é a técnica mais comum de comparação de sequências de DNA com os bancos de dados genômicos (ALTSCHUL et al., 1990). Este algoritmo proporciona comparar uma sequência (DNA ou proteína) qualquer (definida “Query”) com todas as sequências genômicas armazenadas no banco público. O resultado da busca (em que a pesquisa pode ser restringida a um dado organismo, por exemplo) retorna aquelas sequências (DNA ou proteínas), depositado na base de dados (“Subject”) com maior homologia.

O algoritmo BLAST permite comparar e alinhar uma sequência de DNA ou proteína com todas as sequências armazenada sem um banco de dados público ou privado, o qual faz uma busca por sequências similares. Esta ferramenta possui várias versões: BLASTp, compara sequências de aminoácidos com o banco de proteínas; BLASTn, compara sequências de nucleotídeos contra o banco de dados de DNA; BLASTx, traduz a sequência de DNA para proteína e a compara com banco de dados proteico; tBLASTn, compara sequências proteicas com o banco de dados de DNA traduzido; tBLASTx; traduz tanto a sequência nucleotídica quanto o banco de dados de DNA e os compara (Tabela 1).

Outra ferramenta disponível no NCBI é o ORF-Finder (Open Reading Frame Finder; Identificador de Quadros Abertos de Leitura), sendo uma técnica de análise gráfica, responsável pela tradução de sequências nucleotídicas (DNA/RNA) em todos os seis quadros abertos de leitura (NCBI, 2014).

TABELA 1 - Descrição dos programas presentes no algoritmo BLAST para comparação de sequências

Programa	Descrição
Blastp	Compara sequências de aminoácidos de entrada (<i>query</i>) contra um banco de dados de sequências de proteínas (<i>Subject</i>)
Blastn	Compara sequências de nucleotídeos de entrada contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos.
Blastx	Compara a sequência de nucleotídeos de entrada traduzida para todas as sequências de leitura possíveis contra um banco de dados de sequências de proteínas.
tBlastn	Compara sequências de aminoácidos de entrada contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzidas para todas as sequências de leitura possíveis.
tBlastx	Compara as seis sequências de leitura possíveis de um nucleotídeo contra um banco de dados de nucleotídeos traduzidas para todas as sequências de leitura possíveis.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.org

3 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMARAL, A.M.; REIS M.S.; SILVA F.S. O programa BLAST: guia prático de utilização. **Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**, Brasília, 1676 -1340; 224, 24p., 2007.
- ARAÚJO, L. V. C.; LEITE, J. A. N.; PAES, J. B. Estimativa da produção de biomassa de um povoamento de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (willd.) poiret. com cinco anos de idade. **Biomassa & Energia**. v. 1, n. 4, p. 347-352, 2004.
- ARAÚJO, F.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. (Orgs.) **Análise das variações da biodiversidade do bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- BAKKE, I.A. **Potencial de Acumulação de Fitomassa Ecomposição Bromatológica da Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret.) Na região semiárida da paraíba**. 2005 Tese de Doutorado em Agronomia Área de Concentração em Ecologia Vegetal e Meio Ambiente. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil. 2005.
- BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**.24: 23-58, 2005.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. *Nucleic Acids research*, v. 39, p. D32-D37, 2011.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**, 2008, 63f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semiárido) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.
- BRASIL. **Mapas de cobertura vegetal dos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M.J.; JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1206-1215, 2001.
- CHAUMONT, F.; MOSHELION, M.; DANIELS, M.J. Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, v. 97, p. 749-764, 2005.
- CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSORIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. **Photosynthesis and growth. Annals Botany**, v.89, p.907-916, 2002.
- CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in plant Biology*, v. 3, p. 117-124, 2000.
- DYNOWSKI, M.; SCHAAF, G.; LOQUE, D.; MORAN, O.; LUDEWIG, U. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. **Biochemical Journal**, v. 414, p. 53-61, 2008.

FERREIRA, L. A. **Consumo e fluxo de produtos florestais no setor industrial/comercial do Estado da Paraíba**. Projeto PNUD/FAO/IBAMA/BRA 87/07/ Governo do Estado da Paraíba. Documento de Campo 20. 1994. 60p.

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

GASPAR, M.; Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasil. Bot.**, V.34, n.4, p.481-491, 2011

GOMES, D.; AGASSE, A.; THIEBAUD, P.; DELROT, S.; GEROS, H.; CHAUMONT, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1213-1228, 2009.

GUPTA, A.B. & 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 Biology** 9:134, 2009.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in rootwater uptake, **Annals of Botany**, v. 90, n. 301–313, 2002.

JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJOVALL, S.; FRAYSSE, L.; 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 Physiology**, v. 126, n. 1358–1369, 2001.

JUDD, W. S., CAMPBELL C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J., **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. 3ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre. 2009, 632p.

KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. Functional aquaporin diversity in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1758, p. 1134–1141, 2006.

KENT, W.J.; SUGNET, C.W.; FUREY, T.S.; ROSKIN, K.M. et al. The human genome browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, p. 996-1006, 2002.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2004, 452 p.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M,R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross- talk. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 262–267, 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000.

LUDEWIG, U.; DYNOWSKI, M. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 66, n. 19, p. 3161-75, 2009.

- MAESHIMA, M.; ISHIKAWA, F. ER membrane aquaporins in plants. **European journal of physiology**, v. 456, n. 4, p. 709-16, 2008.
- MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.
- MAUREL, C.; CHRISPPEELS, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**. Vol 125, p. 135-138, 2001.
- MAUREL, C., JAVOT, H., LAUVERGEAT, V., GERBEAU, P., TOURNAIRE, C., SANTONI, V., HEYES, J. Molecular physiology of aquaporins in plants. **International Review of Cytology**. 215: 105-148, 2002.
- MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.T.; SANTONI, M. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 595-624, 2008.
- MENESES, C. H. S. G; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Revisão: aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao deficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande. Vol. 10, n 1/2, p 1039-1072, 2006.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information; Centro Nacional para Informação Biotecnológica. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>>. Acesso em: 3 nov 2014.
- NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biociência**, v. 23, n. 12-18, 2001.
- PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. Fisiologia e Produção Vegetal. Lavras. Ed. UFLA, 2006. 104p.
- PARK, W.; SCHEFFNER, B.E.; BAUER, P.J.; CAMPBELL, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 142, 2010.
- PAZ, J. H. A. **Distribuição de indivíduos de três espécies arbóreas da caatinga provenientes da regeneração natural**. 2010. 32f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.
- PEREIRA, A. V. **Taninos de Jurema preta: Atividade antimicrobiana (in vitro) sobre Staphylococcus aureus de origem bovina**. 100p, 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido), Patos, 2010.
- PROSDOCINI, F. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biociência**, v. 29, p. 12-25, 2002.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E.; **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 830p.

SABBATINI, R. M. E. A bioinformática chegou. *Revista Informática Médica*, v. 2, p. 4-6, 1999.

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology*, v. 46, n. 1568-1577, 2005.

SAMPAIO, E.V.S.; RODAL, M.D.J. Fitofisionomias da Caatinga. In: **Avaliação e identificação de ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade da região Caatinga**. Petrolina: Associação de Plantas do Nordeste, 2000. p.216-226.

SILVA, E.C., NOGUEIRA, R.J.M.C., AZEVEDO NETO, A.D., DE BRITO, J.Z., CABRAL, E.L. Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de Caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil. **Iheringia Série Botânica** v.59, n.2, p.201–205, 2004.

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**, v. 414, n. 872–878, 2001.

TAIZ, L. ZAIGER, E. **Plant Physiology**. 3ª Edição. Sinauer Associates, Inc. Publ., Sunderland, Massachusetts, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TROVÃO, D. M. de B.; FERNANDES, P. D.; ANDRANDE, L. A.; DANTAS NETO, J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, v.11, n.3, p.307-311, 2007.

TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant Cell Environ**, v. 25, p. 173–194, 2002.

VELLINI, A. L. T. T.; PAULA, N. F.; ALVES, P. L. C. A.; PAVANI, L. C.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, v. 32, n. 4, p. 651-663, 2008.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; CHAI, T.; WEN, Z.; ZHANG, H. Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. **Molecular Biotechnology**, v. 40, p. 280–292, 2008.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

WUDICK, M.M., LUU, D.-T. & MAUREL, C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. **New Phytologist**, 184: 289-302, 2009.

CAPÍTULO I - ISOLAMENTO PARCIAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁGUA (AQUAPORINAS) EM *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

RESUMO

A jurema-preta é uma espécie do bioma Caatinga, utilizada principalmente para a produção de estacas, lenha e carvão. A caatinga possui um fator limitante com clima extremo onde apenas plantas adaptadas são capazes de sobreviver. Com o advento da genômica e da transcriptômica podemos inferir se proteínas da família **MIPs** (Proteínas Intrínsecas de Membrana), as quais estão principalmente relacionadas com o transporte de água e pequenos solutos, influenciam na adaptação desta espécie num ambiente muitas vezes considerado inóspito. A presença dos genes que codificam essas proteínas é de suma importância para o desenvolvimento e adaptação das plantas, contudo, até hoje não há estudos relatando a identificação de genes das MIPs no genoma da jurema-preta. O sequenciamento e a identificação *in silico* foram feitas utilizando o banco de dados GenBank e o programa BLAST - blastx. Do resultado do alinhamento via BLASTx das sequências de interesse (*query*), foram obtidas três possíveis candidatas para o gene de aquaporinas, sendo que duas delas (com *primers* PIP2-1 e NIP 1-2) não apresentando o domínio ou motivo característico da família MIP. Entretanto, o primer PIP1-4 mostrou que a sequência apresentou um domínio conservado. Todas as sequências obtidas se alinharam com sequências da família Fabaceae, como feijão, soja e ervilha, o que comprova o grau de conservação da proteína em nível da família. Assim podemos inferir a presença de aquaporinas em jurema-preta e as mesmas identificadas neste estudo representam um importante recurso genético, fornecendo informações em potencial para modificar as propriedades do uso de água em jurema-preta ou em outras leguminosas relacionadas.

Palavra-chavas: Bioinformática, genômica comparativa, Fabaceae, *Mimosa tenuiflora*.

CHAPTER I - INSULATION PARTIAL, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN WATER CARRIER GENES (AQUAPORINS) IN *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

ABSTRACT

The Jurema is a species of the Caatinga biome, mainly used for the production of poles, firewood and carvão. A savanna has a limiting factor with extreme climate where only adapted plants are able to survive. With the advent of genomics and transcriptomics can infer whether MIPs family proteins (proteins Membrane Intrinsic), which are mainly related to the transport of water and small solutes, influence the adaptation of this species in an environment often considered inhospitable. The presence of genes encoding these proteins is of paramount importance to the development and adaptation of plants, however, to date there are no studies reporting the identification of genes in the genome of the MIPs of Jurema. The sequencing and identificação in silico, for which used the GenBank database and program BLAST - blastx, to analyze the result sequências. Do via BLASTx alignment of the sequences of interest (query), were obtained from three possible candidate gene for aquaporins, two of which (with primers PIP2-1 and NIP 1-2) did not show the characteristic domain or motif of the MIP family. However, the primer PIP1-4 showed that the sequence presented a domain conservado. Todas the obtained sequences aligned with sequences of the Fabaceae family such as beans, soybeans and peas, which proves the degree of preservation of the family level in protein. So we can infer the presence of aquaporins in jurema-pretae the same identified in this study represent an important genetic resource, providing potential information to modify the properties of water use in Jurema or other related legumes.

Key Words: Bioinformatics, comparative genomics, Fabaceae, *Mimosa tenuiflora*.

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é o único bioma excepcionalmente brasileiro, com plantas adaptadas às suas condições semiáridas peculiares. Porém, há necessidade de saber quais mecanismos são adotados pelas plantas para adaptarem-se aos estresses abióticos que ocorrem neste bioma. De modo geral, a vegetação é caracterizada por uma formação do tipo arbustiva esparsa, com prevalência das juremas (RODRIGUEZ, 2002), a exemplo da jurema-preta.

A *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (jurema-preta) é uma espécie pioneira de porte arbustivo, com presença de muitos espinhos em seus ramos. É decídua perdendo as folhas no fim da estação chuvosa. Frequentemente é encontrada em levantamentos fitossociológicos na região semiárida (LACERDA et al., 2005; FREITAS et al., 2007), sendo tolerante às condições extremas desse ambiente, florescendo e produzindo sementes durante um longo período do ano, predominando na estação seca (GARIGLIO et al., 2010).

Sua tolerância à seca é uma característica complexa, que está relacionada com a expressão de vários genes que podem fornecer direta ou indiretamente no aparecimento de um fenótipo tolerante (GUPTA et al., 2010). Um deles age diretamente na expressão das proteínas funcionais aquaporinas, as quais envolvem uma grande família de canais de membrana que promovem a permeação de água e pequenos solutos neutros (AGRE, 1998; LI et al., 2008). As aquaporinas são classificadas em quatro subfamílias: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas nódulos (NIP), proteínas intrínsecas de pequena base (SIP) (DANIELSON; JOHANSON, 2008).

Vários trabalhos com diferentes vegetais têm admitido que as aquaporinas estivessem intensamente relacionadas a múltiplos processos fisiológicos da planta, entre eles a osmorregulação, assimilação de CO₂, fechamento e abertura estomática e absorção de elementos minerais (LI et al., 2008; GUPTA et al., 2010). Além disso, escassez de água e salinidade podem modificar significativamente os padrões de expressão de aquaporinas (HEINEN et al., 2009).

Para o entendimento das relações hídricas e a sua relação ao transporte de pequenas moléculas em nível molecular é importante não somente identificar as aquaporinas, como também entender como funcionam seus aspectos de especificidade (DANIELSON; JOHANSON, 2008). Neste sentido, utilizar ferramentas *in silico*, através dos bancos de dados de genoma completo, tem sido uma forma eficaz tanto na identificação de genes codificantes

para aquaporinas, assim como na determinação de aquaporinas de uma determinada espécie (PARK et al., 2010).

Em jurema-preta, pouco ou nada se conhece sobre a relação entre a família MIP e a tolerância à seca. Assim, neste estudo objetivou-se identificar, isolar e realizar análises *in silico* de genes candidatos a aquaporinas no genoma da jurema-preta, visando na catalogação e triagem de elementos úteis para programas de melhoramento contra seca. Tal abordagem molecular trará mais informações acerca dos recursos florestais integrantes da caatinga brasileira, cuja utilização, ainda primária, poderá ser extrapolada para uma maior exploração, porém, de forma sustentável.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Foram obtidas folhas jovens de plantas de *Mimosa tenuiflora* (localizadas na fazenda Tamanduá, Santa Terezinha – PB, Brasil), de três indivíduos adultos com tamanho aproximado de 5m.

Tecidos de folhas jovens de *M. tenuiflora* foram coletadas e armazenadas em solução saturada de Cloreto de Sódio e CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), numa proporção de 20 g de CTAB e 350 g de NaCl por litro de solução (ROGSTAD, 1992) e mantidas a 4°C até a extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada conforme o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações no que se refere à quantidade de material vegetal (aproximadamente 150 mg de folhas). Em seguida, o *pellet* foi tratado com uma solução de precipitação de polissacarídeos e contaminantes, (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM NaCl), conforme descrito por Michaels et al. (1994). Procedeu-se, então, o tratamento com RNase A (10 µg/mL), seguida de quantificação do DNA em gel de agarose 1,2% por comparação com DNA lambda (λ - DNA), tendo diferentes concentrações (20, 50 e 100 ng/µL) como referencial.

2.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR

Para amplificação dos genes relacionados à aquaporinas em *M. tenuiflora* foram utilizados 15 pares de *primers* (representantes das subfamílias PIP (6 pares), TIP (4 pares), NIP (3 pares) e SIP (2 pares) desenhados com base em sequências de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Os *primers* foram desenhados através da ferramenta web *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; ROZEN; SKALETSKY, 2000), considerando os seguintes critérios: tamanho do oligonucleotídeo (mínimo: 18 bases; ótimo: 20 bases; máximo: 22 bases); temperatura de anelamento (mínimo: 57° C; ótimo: 60° C; máximo 63° C); e conteúdo em GC (mínimo: 40%; ótimo: 50%; máximo: 60%).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 50 ng de DNA molde, 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada *primer* (F e R, 10 mM), 1.0 U Taq DNA polimerase (Fermentas), 2,5 µL de solução tampão 10x (500 mM KCl, 100 mM

Tris-HCl, pH8.3 e 1,4 mM MgCl₂) e água Milli-Q num volume final de 25 µL. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador “Techne TC-412” (Barloworld Scientific), com a seguinte programação: desnaturação inicial por 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1min a 95°C (desnaturação), 1min a 60°C (anelamento) e 1min a 72°C (extensão) e finalizando com uma extensão final de 10 min a 72°C.

2.3 Eletroforese, purificação dos fragmentos e sequenciamento

Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarosea 2,5%, usando como padrão de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega). Com auxílio de um bisturi, fragmentos foram excisados do gel e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega – Cat. A9280), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram quantificados através de gel de agarose 1,2 %, usando como padrões de peso molecular DNA lambda (λ - DNA), tendo diferentes concentrações (20, 50 e 100 ng/µL) como referência.

A reação de PCR de sequenciamento foi realizada em equipamento ABI 9700 (Gene Amp PCR SYSTEM (Applied Biosystems), usando a técnica Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA). A reação foi precipitada (90 µL de uma solução composta de KOAc3M, etanol absoluto e 5 µL de H₂O Milli-Q) lavada em 100 µL de etanol 70 % gelado e seca por 1 h (no escuro). Após adição de 10 µL de Hi-Di formamida (Applied Biosystems), as amostras foram submetidas a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA).

2.4 Análises de Bioinformática

As sequências obtidas foram inicialmente analisadas via BioEdit 7 (HALL, 1999), para eliminação dos segmentos de baixa qualidade. As sequências obtidas foram analisadas no programa BioEdit, obtendo através deste o seu formato FASTA, então foram confrontadas com o banco de proteínas não redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) através de alinhamentos recíprocos com a ferramenta BLASTx (ALTSCHUL et al., 1990).

3 RESULTADOS

Dos 15 *primers* testados (PIP11, PIP13, PIP14, PIP21, PIP23, PIP24, TIP11, TIP21, TIP22, TIP23, NIP11, NIP12, NIP71, SIP11 e SIP21) foram obtidas 14 bandas (Figuras 1 A e B).

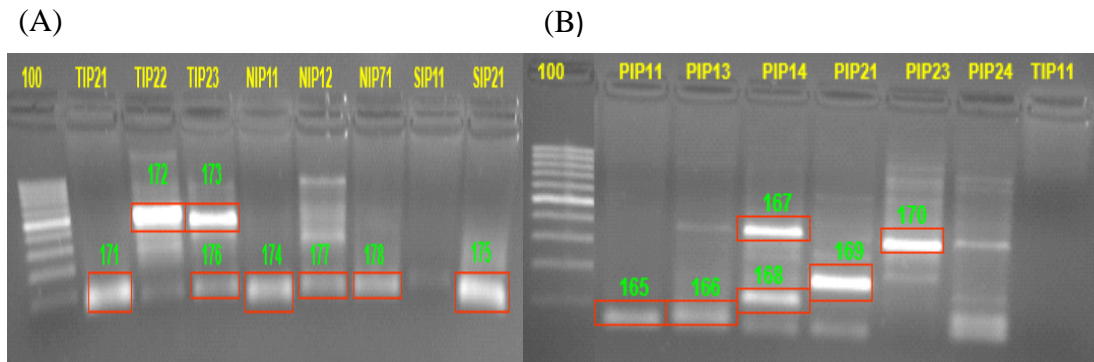


FIGURA 1 - Gel de agarose 2,5% com as principais bandas isoladas para sequenciamento, representando as subfamílias PIP, TIP (A), bem como as bandas representativas de NIP e SIP (B).

FIGURE 1 - Agarose gel 2,5% with major bands isolated for sequencing, representing the subfamilies PIP, TIP (A) as well as the representative SIP bands NIP and (B).

Esse estudo apresenta a primeira evidência das Proteínas Intrínsecas de Membrana (MIPs: *Major Intrinsic Protein*) no genoma da jurema-preta. A busca por possíveis ortólogos (BLASTx) no banco não redundantes do GeneBank/NCBI, a fim de localizar possíveis ortólogos. Como os *primers* desenhados não são específicos para *M. tenuiflora*, mas sim para *Vigna unguiculata*, considerando que as duas espécies pertencem à família Fabaceae, há um grau de conservação da proteína dentro da mesma.

Do resultado do alinhamento via BLASTx das sequências de interesse (*query*), foram obtidas três possíveis candidatas para o gene de aquaporinas, sendo duas delas (com *primers* PIP2-1 e NIP 1-2), não apresentando o domínio ou motivo característico da família MIP. Entretanto, o *primer* PIP1-4 mostrou que a sequência apresentou um domínio conservado para a subfamília MIP, fazendo o alinhamento com sequências da subfamília PIP1-4 (Figura 2) Para os três alinhamentos obtidos todos apresentaram sequências com Fabaceae, especialmente espécies de importância econômica.

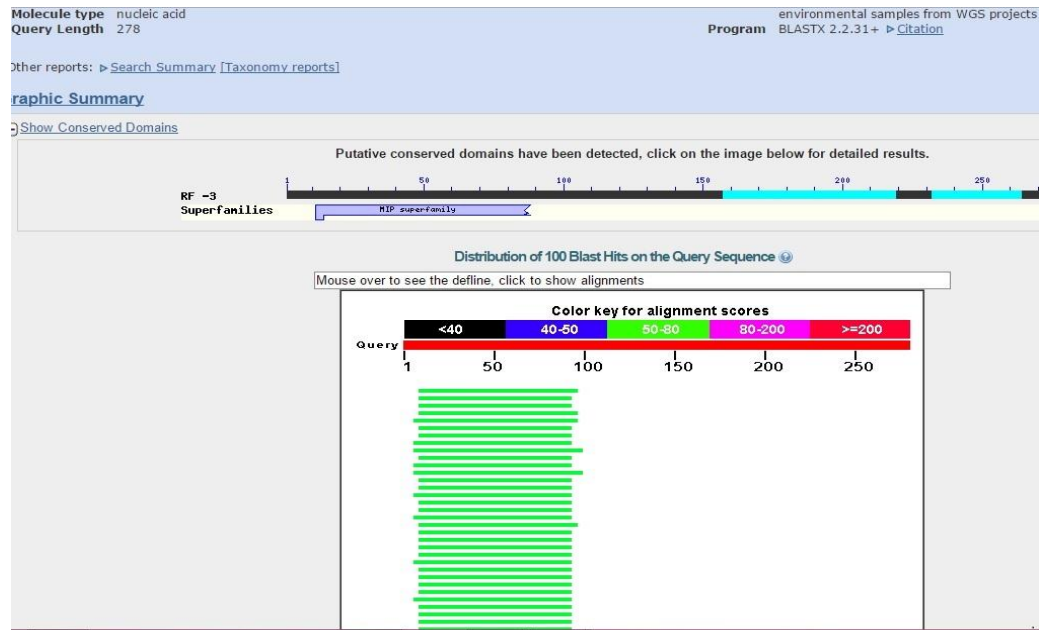


FIGURA 2– Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da sequência de interesse PIP1-4.

FIGURE 2 - Alignment test result BLASTx / GenBank / NCBI showing the conserved domain of sequence of interest PIP1-4.

A análise de identidade, *query cover* e *e-value* (Tabela 1), para este último utilizando um ponto de corte de e^{-5} , resultou numa identidade variando entre 93% a 100%, com *query cover* variando entre 32% e 33%. Essa sequência apresentou um tamanho de 278 nucleotídeos, cujo resultado mostrou alinhamento com 100 sequências ortólogas (*subjects*), muitas das quais pertence à família Fabaceae, a exemplo de soja e ervilha, comprovando seu nível de conservação dentro da mesma.

TABELA 1 - Sequências após o BLASTx da sequência PIP1-4, com a descrição, acesso, identidade, *query cover* e *E-value*

TABLE 1 - Sequences after BLASTx of PIP1-4 sequence, with the description, access, identity, *query cover* and *E-value*.

Descrição	Acesso	Identidade	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	XP_009367837.1	97%	33%	1e-09
<i>Triticum aestivum</i>	ABX79960.1	97%	32%	5e-08
<i>Glycine max</i>	XM_003552430.2	97%	32%	1e-08
<i>Pisum sativum</i>	CAD68986.1	100%	32%	2e-07
<i>Glycine soja</i>	KN648819.1	100%	32%	2e-08

Para o *primer* PIP2-1 nenhuma das sequências tiveram *e-valuee query cover* significativos (Tabela 2), estando relacionados com o tamanho da sequência que é parcial, representando apenas 120 nucleotídeos, interferindo diretamente nos valores estatísticos. Das 100 sequências que foram alinhadas através do BLASTx (Figura 3), algumas deram predição para PIP2, como a *Glycine max*. Essa sequência, mesmo não possuindo domínio conservado para a superfamília MIPs e seus resultados estatísticos não terem dado significativos, a mesma poderá ser utilizada para desenhar um *primer* específico para a jurema-preta.

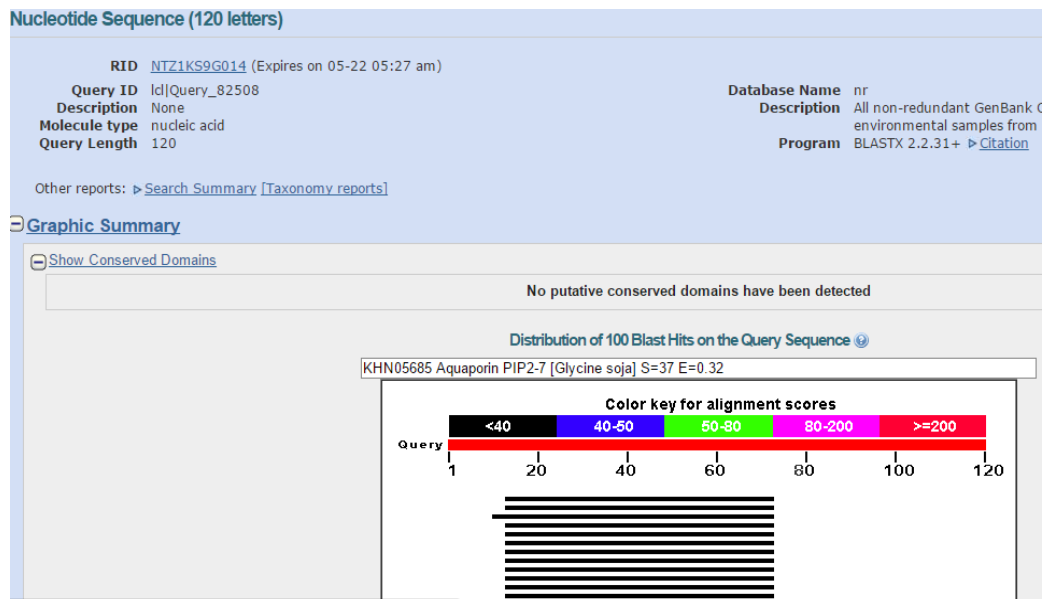


FIGURA 3 - Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da sequência de interesse PIP2-1.

FIGURE 3 - Alignment analysis results BLASTx / GenBank / NCBI, showing the conserved domain of the sequence of interest PIP2-1.

TABELA 2 - Sequências após o BLASTx da banda PIP2-1, com a descrição, acesso, identidade, *query cover* e *E-value* das *subjects*.

TABLE 2 - Sequences after BLASTx PIP2-1 the band, with the description, access, identity, *query cover* and *E-value* of *subjects*..

Descrição	Acesso	Identidade	Query cover	E-value
<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010262516	80%	50%	0.072
<i>Glycine soja</i>	KHN05685.1	85%	50%	0.29

O candidato a NIP1-2 apresentou tamanho de 603 nucleotídeos, mostrou domínio conservado para a superfamília transportadora de membrana, a mesma tendo uma relação funcional com a superfamília MIP (Figura 4). Houve pareamento de 103 seqüências do banco, sendo uma delas descrita como proteína hipotética de *Vigna vulgaris*, mesmo gênero de *V. unguiculata* para a qual o *primer* foi desenhado, apresentando um grau de conservação da proteína em nível de gênero. Os resultados estatísticos deram significativos para *query cover* e *e-value*, com cobertura considerada ótima e *e-value* muito próximo de zero (Tabela 3).

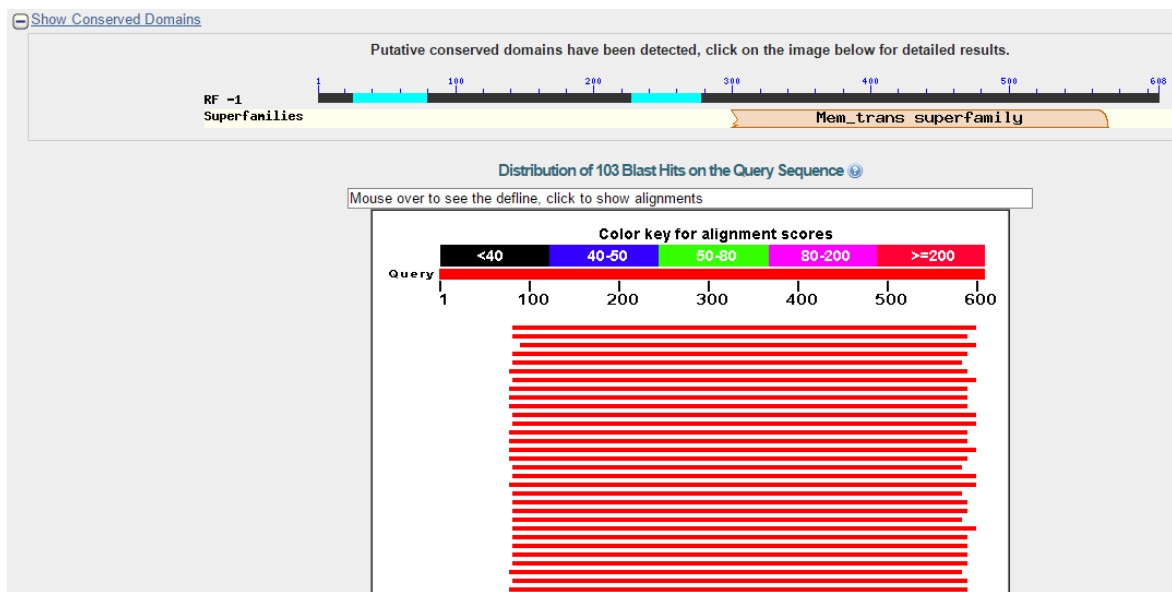


FIGURA 4 - Resultado da análise do alinhamento BLASTx/ GeneBank/NCBI, mostrando o domínio conservado da seqüência de interesse NIP1-2.

FIGURE 4 - Alignment analysis Results BLASTx / GenBank / NCBI, showing the conserved domain of the sequence of NIP1-2 interest.

TABELA 3 - Sequências após o BLASTx da banda NIP1-2, com a descrição, acesso, identidade, *query cover* e *E-value* das *subjects*.

TABLE 3 - Sequences after BLASTx da NIP1-2 band, with the description, access, identity, *query cover* and *E-value* of *subjects*.

Descrição	Acesso	Identidade	Query cover	E-value
<i>Coffe acanephora</i>	CDO99900.1	80%	92%	2e-66
<i>Vitis vinifera</i>	XP_002266805.1	76%	92%	2e-64
<i>Glycine max</i>	XP_003535876.1	72%	92%	3e-59
<i>Phaseolus vulgares</i>	XP_007145546.1	73%	92%	1e-58

4 DISCUSSÃO

Aquaporinas são abundantes nos genomas de plantas, variando o número de membros em cada subfamília consideravelmente, atuando de forma funcional e especializada para o crescimento vegetal nas diferentes condições abióticas. É uma família multigênica, sendo usada em trabalhos que objetivam a otimização do uso da água e de outros nutrientes nas plantas.

Das quatro subfamílias que utilizamos, a subfamília PIP foi a única detectada com predição para a mesma durante o BLASTx, assim podemos inferir que esta subfamília é a mais conservada. Tendo-se como base a homologia de sequências, a subfamília PIP apresenta o grupo mais conservado dentro das aquaporinas, tendo na região ar/R um resíduo de histidina (H) na posição H5, que determina uma alta especificidade pelo transporte de água graças às pontes de hidrogênio (WALLACE; ROBERTS, 2004; FORREST; BHAVE, 2007; MAUREL et al., 2008). Os resíduos da região arginina/aromática, altamente conservados, têm se mostrado funcionalmente importantes na determinação da afinidade de substrato e passagem destes através das membranas biológicas (MAUREL et al., 2008).

Os *primers* utilizados foram desenhados para o feijão-caupi e não para a jurema-preta, então os resultados estão diretamente relacionados com este fato e que mesmo as duas espécies pertencentes à Fabaceae, sabemos que nas subfamílias TIP, NIP e SIP há algumas substituições nos domínios conservados. Ainda mais que a expressão das aquaporinas é influenciada pelos órgãos específicos, pelo estágio de desenvolvimento e com o estado fisiológico do vegetal (HEINEN et al., 2009). Assim, as subfamílias NIP e SIP estão mais relacionadas no que diz respeito à estrutura e função, estando ambas relacionadas ao transporte de pequenos solutos. Sendo sua expressão menos abundante nos diferentes tecidos, quando comparada às subfamílias PIP e TIP (PARK et al., 2010).

Mimosa tenuiflora apresenta vários aspectos morfológicos e fisiológicos que lhe permite sobreviver em regiões de déficit hídrico. A presença de aquaporina PIP na folha é mais um suporte para adaptação da mesma a este ambiente, que além do transporte de água, também tem a função no controle da fotossíntese. Em *Phaseolus vulgaris* foi observado um aumento na expressão de aquaporinas PIP no tecido foliar quando estas são submetidas à condição de seca, favorecendo a diminuição na taxa de transpiração vegetal, por controlarem a abertura e fechamento estomático (AROCA et al., 2006).

Em outras análises fisiológicas de PIP2 demonstraram que a expressão delas em folhas foi igual ou até maior do que em raízes (LI et al., 2008; AZAD et al., 2008). Na planta

modelo, *Arabidopsis thaliana*, os níveis de expressão de 13 isoformas de PIP2 foram mais elevados nas folhas do que nas raízes (JANG et al., 2004). No arroz tiveram-se resultados semelhantes com 14 homólogos de MIPs, expressos exclusivamente em folhas (HEINEN et al., 2009). Estes dados inferem que as aquaporinas não são apenas necessárias nas relações hídricas de raízes, como também são essenciais para a fisiologia e desenvolvimento de folhas nos vegetais (HEINEN et al., 2009).

Contudo, a jurema-preta desenvolve a formação de nódulos radiculares por ser uma Fabaceae, assim deve codificar genes para a subfamília NIP. O que não pode ser comprovado, pois a extração de DNA não foi feita da raiz, sendo a principal parte de localização das proteínas codificadas por esses genes (KRUSE et al., 2006). Podendo ser comprovado pelo estudo da *Glycine max*, que apresentou elevado número de candidatos a genes da subfamília NIP com expressão na raiz, devendo-se ao fato desta ser uma Fabaceae e apresentar a formação de nódulos radiculares (NETO; ISSEPON, 2009).

Apesar de as AQPs terem função importante no controle do transporte de água, resultados contrastantes têm sido notados em situação de estresse ambiental. Assim, a baixa quantidade de aquaporinas na jurema-preta pode ser até uma forma de defesa da planta para não perder água. Segundo Hussain et al. (2011), há atualmente interpretações contrastantes dos resultados obtidos com plantas transgênicas. Para alguns autores, o aumento nos níveis de aquaporina otimiza a capacidade das plantas em suportar o estresse hídrico, enquanto outros crêem que as plantas impedem perdas excessivas de água ao “desligar” as aquaporinas durante a desidratação (GASPAR, 2011).

Fazendo uma análise das *subjects* que se alinham as *query*, podemos observar que a maioria delas é de grande importância comercial, especialmente da indústria alimentícia e que também ocorreu alinhamento com Fabaceas, confirmando o grau de conservação da proteína dentro da família. Assim inferimos que para espécies do bioma caatinga, que são diariamente submetidas a situações de déficit hídrico, pouco se sabe sobre sua associação com aquaporinas.

Segundo Gaspar (2011), a maior parte dos trabalhos com aquaporinas foi realizada com plantas modelo e espécies temperadas de interesse comercial. Dessa maneira, espécies distribuídas em ambientes com diferentes situações de disponibilidade de água ou com variação sazonal desse recurso, além de espécies com adaptações morfológicas e bioquímicas que promovem melhor utilização dos recursos hídricos e nutricionais têm sido negligenciadas.

5 CONCLUSÕES

A jurema-preta apresenta em seu genoma, representantes da subfamília PIP de aquaporinas, identificada em diversos organismos vegetais. Não foram encontradas outras subfamílias, pois o DNA foi extraído apenas da folha e de indivíduo adulto e os *primers* utilizados foram desenhados para o feijão-caupi.

Assim, para uma melhor caracterização e identificação de genes da família MIP em *M. tenuiflora* se faz necessário o desenho de *primers* específicos, a extração de DNA deve ser feita de várias partes da planta e também em diferentes estágios do desenvolvimento. Este estudo pode servir como modelo para o desenho de *primers* específicos para a jurema-preta utilizando as sequências que deram predição para aquaporinas.

6 REFERÊNCIAS

- AGRE, P.; BONHIVERS, M. E.; BORGNIA MJ The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.14659- 14662. 1998.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. Basic local alignmentsearch tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AROCA, R.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; CHRISPPEELS, M. J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in Phaseolus vulgaris plants. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1301-10, 2006.
- AZAD, A. K.; YOSHIKAWA, N.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Substitution of a single amino acid residue in the aromatic/arginine selectivity filter alters the transport profiles of tonoplast aquaporin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1818, n. 1, p. 1-11, 2012.
- DANIELSON, J.A.H.; JOHANSON, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss Physcomitrella patens. **BMC Plant Biology** 8:45. 2008.
- DOYLE,J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.
- FREITAS, R.A.C.; SIZENANDO FILHO, F.A.; MARACAJÁ, P.B.; DINIZ FILHO, E.T.; LIRA, J.F.B. Estudo florístico e fitosociológico de extrato arbustivo – arbóreo de dois ambientes em Messias Targino divisa RN/PB. **Revista verde**, v.2, n.1, p 135-147.2007.
- FORREST, K.L.; BHAVE, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, p. 263-289, 2007.
- GARIGLIO, M.A. SAMPAIO,E.V.S.B.; CESTARO, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília: **Serviço Florestal Brasileiro**, p .368. 2010.
- GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasil. Bot.**, V.34, n.4, p.481-49. 2011.
- GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M. S.; GUPTA, R. S.; SINGH, J.;DUTTAMAJUMDER, S. K.;SRIVASTAVA, S.; SUMAN, A.; KHURANA, J. P.; KAPUR, R.; TYAGI, A. K. The water-deficit stress and red-rot-related genes in sugarcane. **Function Integred Genomics**, v.10, p.207-214. 2010.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEINEN, R.B.; YE, Q.; CHAUMONT, F. Role of aquaporins in leaf physiology. **J. Exp. Bot.**, v. 60, n. 2971-2985. 2009.

HUSSAIN, S.S.; IQBAL, M.T.; ARIF, M.A.; AMJAD, M. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. **Biologia Plantarum**, v. 55, p. 401-413, 2011.

JANG, J.Y.; KIM, D.G.; KIM, Y.O.; KIM, J.S.; KANG, H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biology**, v.54, n.7, p.13-25, 2004.

KRUSE, E.; UEHLEIN, N.E.; KALDENHOFF, R. The aquaporins. **Genome Biology**, v. 7, p1-6. 2006.

LACERDA, A.V.; NORDI, N.; BARBOSA, F.M.; WATANABE, T. Levantamento florístico do componente arbóreo-arbustivo da vegetação ciliar da bacia no rio Taperoá, PB, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.19, n.3, p 647-656.2005.

LI, G.W.; ZHANG, M.H.; CAI, W.M.; SUN, W.N.; SU, W.A. Characterization of OsPIP2;7, a water channel protein in rice. **Plant cell physiology**, v.49, p.1851- 1858. 2008.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.T.; SANTONI, M. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 595-624, 2008.

Michaels, S. D.; John, M. C.; Amasino, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques** 17: 274-276p, 1994

NETO, J.P.B.; ISEPPON, A.M.B. Caracterização in silico de aquaporinas no transcriptoma de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). XVII Congresso de Iniciação Científica. I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. UFPE/CTG. 2009.

PARK, W.; SCHEFFER, B.E.; BAUER, P.J.; CAMPBELL, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 142, 2010.

RODRIGUEZ, J.L. **Atlas escolar da Paraíba**. 3. ed. João Pessoa: Grafset.2002.

ROGSTAD, S.H. 1992. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon* 41: 701-708.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, p. 365- 386, 2000.

WALLACE, I. S.; ROBERTS, D. M. Homology Modeling of Representative Subfamilies of *Arabidopsis* Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic / Arginine Selectivity Filter 1 [w]. *Proteins*, v. 135, p. 1059-1068, 2004.

Recursos da Internet

BLAST Software, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (30 de julho de 2014).