UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

# CLONAGEM E CARACTERIZACÃO DO GENE PUMILIO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elaine Cristina Favaro

Orientador: Ronaldo Bento Quaggio

SÃO PAULO
25 de fevereiro de 2002.

**Ficha Catalográfica**
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Favaro, Elaine Cristina
F275c Clonagem e caracterização do gene pumilio de *Arabidopsis thaliana* / Elaine Cristina Favaro. -- São Paulo, 2002.
110p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Quaggio, Ronaldo Bento

1. Biologia molecular 2. Biologia molecular : Botânica I. T. II. Quaggio, Ronaldo Bento, orientador.

574.88 CDD

# "Clonagem e Caracterização do Gene Pumilio de Arabidopsis Thaliana"

**ELAINE CRISTINA FAVARO**

***Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica***

**Aprovada por:**

Prof. Dr. RONALDO BENTO QUAGGIO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA
IQ - USP

Profa. Dra. MARIANA CABRAL DE OLIVEIRA
IB - USP

SÃO PAULO
25 DE FEVEREIRO 2002.

*"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que sempre estava*
*começando, a certeza de que era preciso*
*continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar."*

(Fernando Sabino)

*Aos meus pais,*
*pelo amor, oportunidade e incentivo.*

*A minha irmã e meu irmão,*
*meus melhores amigos.*

## AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. *Ronaldo Bento Quaggio* pela oportunidade, amizade, orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. *Gianluca Camillo Azzellini*; e membros de seu laboratório: *Jorginho*, *Marcela* e *Rodrigo*; pela amizade, confiança e primeiros estímulos na vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. *Shaker Chuck Farah* por me aceitar como parte integrante de seu laboratório e permitir minha participação em discussões frutíferas.

À Profa. Dra. *Ana Cláudia Rasera da Silva* pelas sugestões e pelo espaço cedido em seu laboratório no início deste trabalho.

À Profa. Dra. *Gláucia Santelli* pelas análises no microscópio confocal e principalmente pela grande paciência e simpatia dispensadas.

À Dra. *Cristina Juárez* pelos cortes histológicos, pelo apoio técnico e psicológico, e principalmente pela grande amizade.

Aos meus grandes amigos: *Adriana Matsukuma*, *Adriana Paulucci*, *Alê Paiva*, *Alê Shimizu*, *Alezita*, *Alex*, *Ângela*, *Ari*, *Áurea*, *Bete*, *Carlos*, *Cássia*, *Chang*, *Cleusa*, *Dani Costa*, *Dani Mara*, *Dani Manz*, *Daniele*, *Deodoro*, *Eli*, *Elisa*, *Eric*, *Érica*, *Flávio*, *Fernando (DF)*, *Ilda*, *Ivone*, *Izaura*, *Jean*, *João*, *Joice*, *Juliana*, *Julio*, *Karina*, *Leandro*, *Leonor*, *Luís Marcelo*, *Marcelo*, *Marcos*, *Patrícia*, *Reinaldo*, *Robson*, *Rosana*, *Sandro*, *Sílvio*, *Stefano*, *Tatiana*, *Valéria*, *Vera* e *Walace*; pela amizade e assistência durante todos esses anos.

Aos meus tios *Plínio* e *Luiz Carlos Favaro*, pelo carinho, apoio e alegria.

À *FAPESP*, pela bolsa concedida.

# ÍNDICE:


| | |
|---|---|
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xii |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT. | xvi |
| **I – INTRODUÇÃO** | 1 |
| **II – OBJETIVOS** | 15 |
| **III – MATERIAIS E MÉTODOS** | 16 |
| **III.I –** ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DOS GENES *APUM*. | 16 |
| **III.II -** NORTHERN BLOT E RT-PCR DE AMOSTRAS DE PLANTAS SELVAGENS. | 16 |
| **III.III -** CLONAGEM DO PROMOTOR E GENE *APUM-2*. | 19 |
| **III.IV -** TRANSFORMAÇÃO EM *ARABIDOPSIS THALIANA*. | 25 |
| **IIII.IV -** ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES. | 27 |
| **IV – RESULTADOS** | 30 |
| **IV.I -** ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DOS GENES *APUM*. | 30 |
| **IV.II -** NORTHERN BLOT DE AMOSTRAS DE PLANTAS SELVAGENS. | 33 |
| **IV.III -** CLONAGEM DO PROMOTOR E DO GENE *APUM-2*. | 37 |
| **IV.IV -** OBTENÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS. | 43 |
| **V – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS** | 58 |
| **V.I -** LOCALIZAÇÃO DE *APUM-2*. | 58 |
| **V.II -***APUM-2* NOS MERISTEMAS. | 62 |
| **V.III -** EXPERIMENTOS DE GENÉTICA REVERSA. | 65 |
| **VI – CONCLUSÕES** | 71 |
| **VII – BIBLIOGRAFIA** | 72 |
| **VIII – ANEXOS** | 82 |
| ALINHAMENTO ENTRE OS PROMOTORES DE *APUM-1* E *APUM-2*. | 83 |
| ALINHAMENTO ENTRE OS PROMOTORES DE *APUM-1* E *APUM-3*. | 85 |
| ALINHAMENTO ENTRE OS PROMOTORES DE *APUM-2* E *APUM-3*. | 87 |
| ALINHAMENTO ENTRE OS GENES *APUM-1* E *APUM-2*. | 89 |

ALINHAMENTO ENTRE OS GENES *APUM-1* E *APUM-3.* 96
ALINHAMENTO ENTRE OS GENES *APUM-2* E *APUM-3.* 103
***CURRICULUM VITAE*** 110

## LISTA DE FIGURAS:

**Figura 1:** Modelo do PUM-HD (EDWARDS et al., 2001).

**Figura 2:** Modelo do complexo quaternário de *Drosophila* (EDWARDS et al., 2000).

**Figura 3:** O vegetal *Arabidopsis thaliana* e seus órgãos aéreos.

**Figura 4:** Duas visões da organização histológica do meristema apical do caule (BOWMAN & ESHED, 2000).

**Figura 5:** Histologia da raiz. (a) representa os tecidos internos da raiz e (b) as células iniciadoras e quiescentes, que geram os cilindros radiculares, e suas direções de divisão celular (BENFEY & SCHERES, 2000).

**Figura 6:** Esquema da disposição dos homólogos ao *PUMILIO* de *Arabidopsis thaliana* nos fragmentos clonados em BACs.

**Figura 7:** Northern blot de amostras de RNA dos vários órgãos da planta. (A) representa a membrana marcada com exon1, (B) com o produto da amplificação da proto-clorofilil redutase (POR) e (C) representa o gel antes da transferência para a membrana. A linha 1 corresponde à amostra de raiz, 2 de caule, 3 de folhas e 4 de flores.

**Figura 8:** Região a ser amplificada por RT-PCR entre os exons 1 e 2. Os oligonucleotídeos utilizados estão destacados em vermelho e a região em azul corresponde ao íntron 1 dos genes *APUM*.

**Figura 9:** Produto do RT-PCR das amostras dos vários órgãos da planta. M é o marcador de peso molecular 1Kb da GIBCO, C é o controle (amplificação a partir da construção no pBINPLUS devendo apresentar 619 pb), 1 corresponde ao tecido de raiz, 2 de caule, 3 de folhas, 4 de flores em desenvolvimento, 5 de flores maduras e 6 de frutos em desenvolvimento.

**Figura 10:** Esquema da digestão do inserto do BAC F16P2 com BamH I e com Mlu I.

**Figura 11:** Esquema do vetor binário pBINPLUS. (A) mostra o T-DNA delimitado pelas bordas direita e esquerda. (B) e (C) correspondem às construções

repórteres com o cDNA de GUS e com o de GFP, respectivamente, clonadas no sítio de restrição do vetor.

**Figura 12:** Alinhamento dos primeiros exons de *APUM-1*, *2* e *3* utilizando o programa ClustalW.

**Figura 13:** Esquema do vetor binário pBINPLUS com as construções para genética reversa. (A) mostra o T-DNA delimitado pelas bordas direita e esquerda. (B) corresponde à construção para expressão constitutiva e (C) para reprimir *APUM-2*.

**Figura 14:** Southern blot de plantas transformadas com o repórter GUS. (A) DNA cortado com BamH I e (B) com EcoR I. A nomenclatura n, n' e n" correspondem a três descendentes distintos da planta n e s corresponde à planta do tipo selvagem.

**Figura 15:** Produto das reações de PCR para confirmar a introdução do T-DNA. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem a cada uma das representantes e M ao marcador de peso molecular de 1Kb Ladder da GIBCO.

**Figura 16:** Expressão de GUS em planta com uma semana.

**Figura 17:** Expressão de GUS em planta com vinte dias.

**Figura 18:** Expressão de GUS nos meristemas apical e laterais.

**Figura 19:** Expressão de GUS nos meristemas laterais.

**Figura 20:** Raízes de planta adulta expressando GUS.

**Figura 21:** Porção central das raízes expressando GUS.

**Figura 22:** Expressão de GUS em raiz secundária emergindo.

**Figura 23:** Expressão de GUS nas flores em formação.

**Figura 24:** Flor em desenvolvimento expressando o repórter GUS.

**Figura 25:** Southern blot de plantas transformadas com o repórter GFP. Os números correspondem às plantas obtidas e S é DNA de planta tipo selvagem.

**Figura 26:** Imagem da GFP, porção verde no centro, sendo expressa no meristema apical. A clorofila emite fluorescência na região do vermelho ao ser exitada com luz UV.

**Figuras 27:** Expressão de GFP nas raízes. (A) mostra a porção interna da raiz e (B) a ponta da raiz, sendo que a esfera verde em (B) é uma bolha de ar.

**Figura 28:** Western blot da planta com GFP número 8. M é o marcador de peso molecular (SIGMA), S é material da planta selvagem e GFP da planta transformada número 7.

**Figura 29:** Southern blot de plantas transformadas com o vetor de expressão constitutiva. Os números indicam cada planta obtida e S indica planta do tipo selvagem.

**Figuras 30:** Northern blot das plantas com a construção constitutiva. (A) corresponde à membrana marcada com o exon 1 e (B) marcada com a amplificação do gene da proto-clorofilil redutase. A figura (C) mostra o gel antes da transferência para a membrana.

**Figura 31:** Planta 6 jovem. No centro há várias gemas se desenvolvendo ao mesmo tempo.

**Figura 32:** Planta número 6 com expressão constitutiva de *APUM-2*. Em (A) pode-se observar o desenvolvimento de vários caules e folhas de forma desorganizada (sem dominância apical). Um detalhe da base da roseta é mostrado em (B), onde pode-se visualizar múltiplos meristemas axilares em desenvolvimento.

**Figura 33:** Detalhe das flores da planta com expressão constitutiva de *APUM-2*.

**Figura 34:** Corte histológico do meristema apical do caule (resolução de 400x).

**Figura 35:** Cortes histológicos da raiz. (A) representa a ponta da raiz e (B) uma bifurcação entre as raízes principal e lateral.

**Figura 36:** Cortes histológicos no comprimento da epiderme vistos com aumento de 100x (A) e de 200x (B). É possível observar uma mancha azul na região onde irá se desenvolver uma raiz secundária.

**Figura 37:** Plantas com uma semana de vida, sendo que, (A) é do tipo selvagem e (B), fotografada com maior aumento do que a selvagem, é uma planta com um T-DNA interrompendo a seqüência de *APUM-2*.

**Figura 38:** Plantas com duas semanas de vida, sendo que, (A) é do tipo selvagem e (B) é uma planta com T-DNA interrompendo a seqüência de *APUM-2*.

# LISTA DE TABELAS:

**Tabela 1:** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para todas as construções.

**Tabela 2:**.Seqüncias dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das construções.

**Tabela 3:** Dados dos genes *APUM* de *Arabidopsis* disponíveis no GenBank.

**Tabela 4:** Alinhamentos entre as quatro seqüências de aminoácidos dos APUM de *Arabidopsis.*

**Tabela 5:** Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos dos APUM-HD de *Arabidopsis.*

**Tabela 6:** Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos dos PUM-HD de várias espécies.

**Tabela 7:** Tamanhos esperados dos fragmentos após a reação de RT-PCR.

**Tabela 8:** Número de transformantes obtidos para cada construção.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

**Apum** – Proteína de *Arabidopsis thaliana* homóloga ao PUMILIO.

**BAC** – Cromossomo Artificial de Bactéria.

**BLAST** – "Basic Local Alignment Search Tool" (ferramenta para comparação de seqüências disponível na página http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

**BRAT** – "BRAIN TUMOR"; proteína participante do complexo de repressão do mensageiro *HUNCHBACK* de *Drosophila*.

**CAF-1** – Fator de Montagem da Cromatina.

**CaMV 35S** – Promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-Flor.

**CDK** – Proteína kinase dependente de CICLINAS.

**CPE** – Elemento de Poliadenilação Citoplasmático; seqüência do mRNA onde se liga a CPEB.

**CPEB** – Proteína que se liga ao CPE.

***COX17*** – mRNA alvo de levedura de um homólogo ao PUMILIO.

**CZ** – Zona Central do meristema do caule.

**DEM** – DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEM, gene envolvido na organização dos meristemas.

**DEPC** – Dietilpirocarbonato.

**dNTP** – Mistura dos quatro desoxinucleotídeos – 2'-desoxiadenosina 5'-fosfato (dATP), 2'-desoxicitidina 5'-fosfato (dCTP), 2'-desoxiguanosina 5'-fosfato (dGTP) e 2'-desoxiatimidina 5'-fosfato (dTTP).

**EDTA** – Etilenodiaminatetraacetato de sódio.

**FAS** - FASCIATA - gene envolvido na organização dos meristemas.

**FBF** – Homólogo do PUMILIO de *Drosophila* encontrado em *C. elegans*.

***FEM-3*** – mRNA que codifica um fator de transcrição responsável pela espermatogênese em *C. elegans*.

**GFP** – Proteína Fluorescente Verde.

**GUS** – Enzima β-Glicuronidase.

***HB*** – mRNA que codifica a proteína HUNCHBACK (HB), um fator de transcrição responsável pela inibição da formação das estruturas da cabeça e do tronco.

**HEPES –** Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etanossulfônico).

***HO*** - mRNA que codifica uma endonuclease (HO) responsável por um processo de rearranjo em leveduras e que é alvo de um homólogo ao PUMILIO.

**LB (Luria –Bertani) –** Meio de cultura composto de 1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl, pH=7,0.

**MS (Murashide – Skoog) –** Meio de cultura para plantas contendo macro e microelementos.

**NOS –** NANOS, proteína participante do complexo de repressão do mensageiro *HUNCHBACK* de *Drosophila*.

**NPT II –** Nopalina Fosfotransferase II; enzima que confere resistência à kanamicina.

**NRE –** "Nanos Response Elements", seqüência conservada na 3'-UTR dos mensageiros onde se liga a proteína PUMILIO.

**pBI221 –** Vetor com resistência à ampicilina contendo o gene GUS controlado pelo promotor 35S.

**pBINPLUS –** Vetor binário utilizado para a transformação vegetal.

**PCR –** Reação em Cadeia da Polimerase.

**PKA-C –** Proteína kinase de *Dyctiostelium discoideum* envolvida na formação do corpo de frutificação.

**PUF –** Família de proteínas que contém o PUM-HD (nome proveniente das iniciais das proteínas PUMILIO de *Drosophila* e FBF de *C. elegans*).

**PUF-A –** Proteína de *Dyctiostelium discoideum* homóloga ao PUMILIO de *Drosophila*.

**PUM –** Proteína PUMILIO.

**PUM-HD –** "Domínio de Homologia ao PUMILIO, região da proteína PUMILIO que interage com a seqüência NRE dos mensageiros alvoS.

**PZ –** Zona Periférica do meristema do caule.

**QC –** Centro Quiescente; células totipotentes responsáveis pela produção dos tecidos internos da raiz.

**RT-PCR –** Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase.

**RZ –** "Rib Zone", uma das partes do meristema do caule.

**20x SSC –** Solução de sal e citrato de sódio (3M NaCl e 0,3M citrato de sódio), pH=7,0.

**SDS –** Dodecil sulfato de sódio.

**SDS-PAGE –** Gel de poliacrilamida com SDS.

**SOB –** Meio de cultura composto de 2% triptona, 0,5% extrato de levedura e 0,05% NaCl, pH=7,0.

**SOC –** Meio SOB mais 20Mm de glicose.

**TAE (Tris-Acetato) 1x –** Solução-tampão de Tris com o pH ajustado com ácido acético glacial (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA pH=8,0).

**TBE (Tris-Borato) 0,5x –** Solução-tampão de Tris com o pH ajustado com ácido bórico (0,045M Tris-borato, 0,001M EDTA pH=8,0).

**TBST 10x –** Solução tampão contendo 50mM de Tris pH=8,0, 750 mM de NaCl e 0,29% Tween 20.

**TE 1x –** Solução tampão contendo 10mM Tris-Cl pH=8,0 e 1mM EDTA pH=8,0.

**3'-UTR –** Região não traduzida na ponta 3' dos mensageiros.

**TRIS –** Tris(hidroximetil)aminometano.

**Tris-Cl –** Solução-tampão de Tris com o pH ajustado com ácido clorídrico.

**2XTY –** Meio de cultura composto de 1,6% triptona, 1% extrato de levedura e 0,5% NaCl, pH=7,4.

**TYE –** Meio de cultura sólido composto de 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,8% NaCl e 1,5% ágar.

**WS –** Variedade Wassilewskija de *Arabidopsis thaliana*.

**WUS –** WUSCHEL, gene participante da organização do meristema apical.

**X-Glu –** Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicurônico.

**YAC –** Cromossomo Artificial de Levedura.

**Yak-A –** proteína repressora da síntese de PufA em *Dyctiostelium discoideum*.

**YM –** Meio de cultura composto de 0,04% extrato de levedura, 1% manitol, 2,2mM $k_2HPO_4.3H_2O$ pH=7,0; 1,7mM NaCl e 0,8mM $MgSO_4$.

# RESUMO:

Proteínas que se ligam a RNAs geralmente regulam estabilidade, localização e tradução de mensageiros por interação com seqüências específicas na região 3' não traduzida. A proteína PUMILIO foi descrita pela primeira vez em *Drosophila*, apresentando a função de controlar a tradução de mensageiros alvo durante o desenvolvimento. Homólogos podem ser encontrados em outras espécies filogeneticamente distantes com funções similares.

O seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana* indicou a presença de quatro genes que codificam homólogos ao PUMILIO de *Drosophila*. Três deles estão no cromossomo II (*APUM-1*, *2* e *3*), com alto grau de identidade e situados muito próximos uns dos outros. A terceira cópia está no cromossomo IV (*APUM-4*) e sua seqüência tem menor similaridade em relação aos três anteriores.

Neste trabalho, foi clonado e caracterizado *APUM-2*. Ensaios de northern blot e RT-PCR indicaram que o mensageiro de Apum-2 pode ser encontrado em amostras de raiz, caule, folha, flores e frutos. Entretanto, sistemas repórteres, *APUM-2*::GUS e *APUM-2*::GFP, foram introduzidos no vegetal e a expressão foi observada nos ápices do caule e raízes, especificamente nas regiões meristemáticas. Também foram feitas construção para ensaios de genética reversa e as plantas contendo construções constitutivas (35S::*APUM-2*) se desenvolveram sem dominância apical e com grande quantidade de ramos, folhas e raízes secundárias, mostrando perturbações nos meristemas. Os resultados obtidos sugerem que APUM-2 possui papel relevante durante o desenvolvimento meristemático, possivelmente através de interações com mRNAs.

## ABSTRACT:

RNA-binding proteins often regulate the stability, localization, and translation of mRNAs by interaction with specific motifs in the 3'-UTR. The PUMILIO protein from *Drosophila* was shown to control translation of specific mRNAs during development. PUMILIO homologs were found in several species and constitute the "PUF" family.

The *Arabidopsis thaliana* sequencing project revealed four genes homolougs to PUMILIO. Three are situated in chromosome II (*APUM-1*, *2*, and *3*) that are nearly identical among themselves, and that contain a region that is 52% homologous to the PUMILIO. RNA-binding domain. The fourth is in chromosome IV (*APUM-4*), and shows low similarity to the other three.

In this work, we characterized *APUM-2* in further detail. Northern blots indicated that Apum-2 is expressed in shoot and root apices. Reporter transgenic plants were made that contained either *APUM-2*::GUS or Apum-2::GFP constructs. Reporter gene expression confirmed that *APUM-2* is active in shoot and root apices, specifically in the meristematic regions. Finally transgenic plants containing the 35S::*APUM-2* construct were created. Constitutive *APUM-2* expression resulted in plants with no apical dominance and a high number of leaves, stems and lateral roots. These results suggest that APUM-2 plays an important role during meristem development, possibly through a mRNA interaction.

# I – INTRODUÇÃO.

O requerimento de produtos protéicos no interior da célula não é uniforme, as diferentes regiões executam funções específicas e portanto exigem um conjunto distinto de proteínas. Grande parte das atenções tem sido direcionada em torno do mecanismo pelo qual as proteínas são distribuídas nos diferentes compartimentos celulares e, apesar disso, pouco se sabe a esse respeito (ALBERTS et al., 1994).

O controle da expressão dos genes é freqüentemente considerado no nível transcricional mas revisões de MICKLEM (1995) e HALZERIGG (1998) indicam que o principal mecanismo para a obtenção de altas concentrações de proteínas em regiões específicas é realizado por localização de RNA. A partir de um único mensageiro pode-se gerar várias moléculas de proteínas desde que esteja associado aos componentes responsáveis pela tradução e, além disso, existe uma série de fatores de regulação que irão modular diretamente a síntese dos produtos protéicos no interior da célula.

Elementos que regulam a tradução e tempo de meia vida de mensageiros são freqüentemente encontrados dentro da cauda 3' não traduzida (3'-UTR). Essas regiões, contendo seqüências específicas que interagem com proteínas regulatórias, têm sido detectadas numa grande variedade de transcritos em numerosos organismos (DECKER & PARKER, 1995). Vários tipos de proteínas que interagem com seqüências específicas dentro da 3'-UTR estão sendo identificadas, entretanto, o mecanismo pelo qual estas proteínas lideram mudanças no comportamento dos mRNAs não é muito bem compreendido (OLIVAS & PARKER, 2001). Talvez a ligação dessas macromoléculas possa interferir com a estabilidade destes mensageiros. Este conjunto de proteínas está se tornando cada vez mais importante na medida em que se descobre seu envolvimento em processos biológicos fundamentais.

Um conjunto de proteínas que se ligam a RNA bastante conservada é a família PUF cujo primeiro membro estudado foi a proteína PUMILIO de

*Drosophila melanogaster* mas também foram observados múltiplos representantes espalhados em diversos organismos como humanos, vermes, plantas e leveduras (WHARTON et al., 1998; ZAMORE et al., 1999).

A família PUF (sigla proveniente das proteínas PUMILIO de *Drosophila* e FBF de *C. elegans*) é definida pela presença de um domínio constituído de oito repetições imperfeitas de 36 aminoácidos, formando oito α-hélices, seguidas de uma extensão C-terminal: o Domínio de Homologia ao PUMILIO (PUM-HD) (EDWARDS et al., 2000 e 2001). Em adição, as proteínas PUF estão contidas na superfamília de proteínas com α-hélices repetidas, na qual a α-IMPORTINA (transportador da membrana nuclear) e a β-CATENINA (proteína sinalizadora) também fazem parte. A estrutura do PUM-HD está ilustrada na Figura 1.

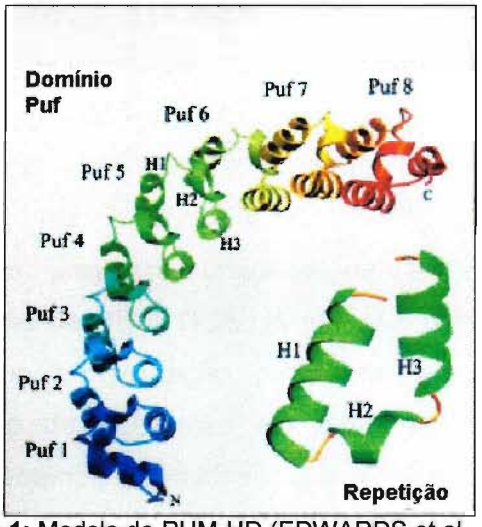



**Figura 1:** Modelo do PUM-HD (EDWARDS et al., 2001).

O PUM-HD contém, em média, 37 KDa e liga-se especificamente a uma seqüência bipartida de 32 nucleotídeos conhecida como NRE ("Nanos Response Elements") (WHARTON & STRUHL, 1991; MURATA & WHARTON, 1995) presente na 3'-UTR dos mensageiros alvos.

A função do PUMILIO foi inicialmente descrita em *Drosophila* e, em seguida, outras proteínas PUF foram estudadas em outros organismos

também apresentando grande importância em processos biológicos fundamentais onde a regulação da tradução tem papel de destaque.

A proteína PUMILIO de *Drosophila* desenvolve sua atividade no início do desenvolvimento da célula-ovo. Durante os primórdios da embriogênese do inseto, a formação dos eixos que determinam a simetria do organismo é conduzida por certos mensageiros maternos, chamados morfóticos, que são distribuídos e traduzidos de forma controlada. Estes, por sua vez, ativam ou reprimem genes a jusante promovendo a diferenciação entre os diversos compartimentos (LEWIN, 2000). A formação do eixo anterior-posterior do embrião é determinada pelo morfótico HUNCHBACK (HB), um repressor de estruturas abdominais que se apresenta em altas concentrações na região anterior, pemitindo a formação de estruturas como cabeça e tórax, e não traduzido no pólo posterior (CURTIS et al., 1995; LEWIN, 2000).

O mRNA *HUNCHBACK* é distribuído uniformemente ao longo do embrião e sua repressão é resultado da interação das proteínas PUMILIO (PUM), NANOS (NOS) e BRAIN TUMOR (BRAT); com sua 3'-UTR, formando um complexo quaternário (TAUTZ, 1998; WHARTON & STRUHL,1991; MURATA & WHARTON, 1995; SONODA & WHARTON, 1999 e 2001). Como PUMILIO e BRAT têm presença uniforme no embrião, quem limita espacialmente a produção de HB é NOS, já que sua distribuição forma um gradiente onde a maior concentração reside no pólo posterior. Desta maneira, os repressores de *HB* estão em maior concentração no pólo posterior e menor no anterior, permitindo que a tradução de *HB* ocorra somente neste pólo.

Mutantes de *Drosophila* que não sintetizam a proteína PUMILIO apresentam tradução uniforme de *HB* por todo o embrião e como conseqüência não ocorre a segmentação corporal (MURATA & WHARTON, 1995).

Dados cristalográficos recentes sugerem que o PUMILIO de *Drosophila* tem uma estrutura não globular com uma superfície côncava onde se liga o mensageiro *HB* e outra convexa que interage com as proteínas NOS

e BRAT (EDWARDS et al., 2000 e 2001). Desta forma, o PUMILIO tem o papel de reconhecer os sítios de ligação na região regulatória do mensageiro, especificando a ligação de NOS e BRAT para que juntos reprimam sua tradução, como mostra a Figura 2.

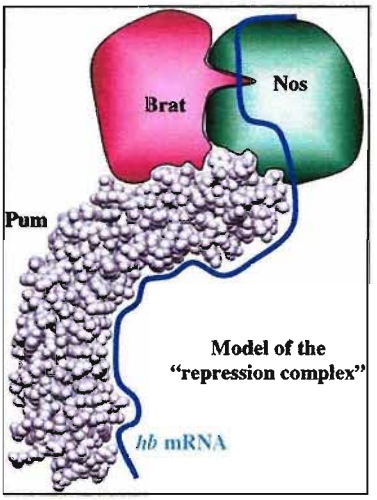



**Figura 2:** Modelo do complexo quaternário de *Drosophila* (EDWARDS et al., 2000).

O mecanismo de repressão da tradução de *HB* ainda não foi totalmente entendido embora alguns estudos sugerem que a deadenilação seletiva do mRNA pelo complexo PUM/NOS/BRAT parece reprimir sua tradução (WREDEN et al., 1997).

O sistema PUMILIO/NANOS também executa papel importante nas células germinativas de *Drosophila* durante a formação das gônadas (FORBES & LIN, 1998; PARISI & LIN, 1999, 2000). No desenvolvimento inicial do embrião, a divisão celular é altamente regulada tanto nas células somáticas quanto nas células polares (células que ficam no pólo posterior e que dão origem aos gametas). Na gastrulação, as células polares cessam a mitose e permanecem quiescentes durante sua migração até as gônadas, ao passo que, as células somáticas continuam a se proliferar durante o resto da embriogênese (RICHTER & THEURKAUF, 2001).

Os detalhes sobre os eventos que processam esta migração ainda estão sendo estudados, mas pode-se dizer que um dos responsáveis pela

detenção do ciclo celular na fase G2 é a interação das proteínas NOS e PUMILIO com o mensageiro da CICLINA B, que contém seqüências similares ao NRE de *HB* em sua 3'-UTR, de forma a impedir sua tradução (ASAOKA-TAGUCHI et al., 1999). Neste sistema, BRAT não é requerido para esta função e talvez outra proteína se combine para especificar o reconhecimento do mensageiro da CICLINA (RICHTER & THEURKAUF, 2001).

Quando PUMILIO e NOS estão ausentes, as células polares são formadas mas são incapazes de migrar para as gônadas embriônicas e de se diferenciar como células germinativas funcionais (ASAOKA-TAGUCHI et al., 1999).

Durante o ciclo celular, as CDKs (Quinases Dependentes de Ciclinas) iniciam as transições através da ligação com CICLINAS, formando o complexo ativado que fosforila substratos alvos de forma a cumprir todas as tarefas da fase do ciclo celular em questão. A entrada em uma nova fase requer a síntese de novas CICLINAS e a atividade dos proteossomas que destróem as da etapa anterior (BUCHANAN et al., 2000). A divisão celular pode ser vista como uma simples cascata de kinases e de degradação protéica onde a fosforilação e a proteólise colaboram interdependentemente (KING et al.,1996).

O acúmulo e destruição de fatores do ciclo celular, as CICLINAS, é essencial para a progressão do ciclo celular e este modelo de regulação baseado na degradação protéica é axiomático (RICHTER & THEURKAUF, 2001), entretanto, o papel do PUMILIO e NOS em células polares de embriões de *Drosophila* mostra que o controle no nível de tradução também pode ser importante para a progressão do ciclo celular.

Caso similar ocorre em *Xenopus laevis*. No período de maturação dos oócitos, também ocorre detenção da divisão celular através da interação de uma proteína homóloga ao PUMILIO associada a um homólogo de NOS, o XCAT-2, com o mRNA da CICLINA B1.

Neste estudo feito com *Xenopus*, algumas observações em relação ao mecanismo pelo qual o PUMILIO exerce sua função foram levantadas. O

início da maturação dos oócitos requer proteínas iniciadoras que são sintetizadas a partir de mRNAs dormentes. Estes são estocados e preservados por caudas curtas de poliadenina e, quando os oócitos são induzidos a entrar em processo mitótico, estas caudas são alongadas e a tradução pode ser iniciada (NAKAHATA et al., 2001).

O controle traducional é mediado por motivos (seqüência característica de certos elementos de controle) ricos em uridina, $U_{4-6}A_{1-2}U$, chamados de elementos de poliadenilação citoplasmático (CPE) presentes na 3'-UTR. Estes CPEs são alvos da proteína CPEB cujo o papel é recrutar outros fatores responsáveis pela poliadenilação. Neste artigo, foi comprovado que o homólogo do PUMILIO interage fisicamente com a CPEB em oócitos e isto pode indicar que ele impeça o alongamento da cauda bloqueando a tradução.

Nesses exemplos, aparentemente o PUMILIO apenas inibe a tradução de certos mRNAs nos estágios iniciais da embriogênese. Entretanto, estudos realizados com leveduras mostram que suas proteínas PUF também interferem na estabilidade dos mensageiros devido à interação com fatores que regulam a concentração de mRNAs no interior da célula.

Cinco linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes, cada uma com um dos homólogos do PUMILIO inativo (JSN1, PUF2, PUF3, PUF4 e MPT5), apresentaram expressão diferenciada de alguns mRNAs. O homólogo MPT5 age sobre o mensageiro da proteína HO, uma endonuclease que promove rearranjo gênico responsável pela definição do tipo de reprodução da levedura, numa seqüência similar ao NRE de *HUNCHBACK*. Quando é superexpressa ocorre um aumento na velocidade de degradação de *HO*, devido a destruição da cauda poli(A) (TADAUCHI et al., 2001).

A proteína PUF3 promove a deadenilação e a degradação específica do mensageiro *COX17* (OLIVAS & PARKER, 2000). Isto implica que as proteínas PUF não só inibem a tradução como também podem interferir na maquinaria de degradação dos mensageiros via deadenilação ou em outros passos como na eliminação da estrutura 5' ou na digestão exonucleotídica 3'$\rightarrow$ 5'.

Analisando o comportamento das proteínas PUF em todos estes organismos filogeneticamente distantes, pode-se dizer que a função exercida por elas parece ser conservada ao longo da evolução. Além disso, deve-se destacar também que, em todos os casos citados sua ação está ligada a processos de formação do padrão de desenvolvimento.

O PUMILIO também foi estudado nas espécies *Caernohabditis elegans* e *Dictyostelium discoideum*, tendo envolvimento semelhante aos organismos citados anteriormente. É interessante destacar que nestas duas espécies as proteínas PUF coordenam processos de desenvolvimento associados à mudança no estilo de vida desses organismos.

Em *Caernohabditis elegans*, o FBF é o homólogo ao PUMILIO que foi bastante estudado. Esta proteína está diretamente ligada ao processo de diferenciação sexual do animal. A escolha entre produção de espermatócitos ou oócitos é realizada através do controle traducional do mensageiro *FEM*-3, cujo o produto é um fator de transcrição que ativa outras proteínas envolvidas na espermatogênese (ZHANG et al., 1997).

O FBF também liga-se a motivos estruturais similares ao NRE de *HUNCHBACK* em *FEM-3* e reprime sua tradução, desviando a gametogênese para a produção de oócitos. Desta forma, é possível encontrar na natureza animais machos ou hermafroditas e este mecanismo faz com que a espécie tenha vantagens na sua proliferação, podendo se reproduzir por acasalamento ou por auto-fertilização (KUWABARA, 1999).

Semelhante ao que ocorre com os demais organismos citados, o FBF não exerce sua função sozinho requerendo a ação de um homólogo ao NOS (KRAEMER et al., 1999) para que juntos impeçam a tradução de *FEM-3*.

Em *Dictyostelium discoideum*, a ação das proteínas PUF é observada em resposta a baixas quantidades de alimento no meio. Nesta situação, ocorre a transição de crescimento para desenvolvimento, ou seja, a parada do ciclo celular permite o início de um programa de produção de esporos que garanta sua sobrevivência.

O provável alvo para o homólogo de PUMILIO, o PUF-A, é o mensageiro da PKA-C, uma proteína quinase que está envolvida na coordenação da morfogênese do corpo de frutificação com a diferenciação terminal em esporos e talos. Entretanto, quem detecta a baixa concentração de alimento no meio é a proteína YAK-A que reprime a expressão de PUF-A, liberando a síntese de PKA-C, conduzindo ao início do desenvolvimento (SOUZA et al., 1999). É importante citar que em *Dictyostelium* nenhuma proteína homóloga à NOS de *Drosophila* foi identificada como membro participante deste evento celular até o momento.

Em *Arabidopsis* e humanos, o significado da existência de genes que codificam proteínas PUF em seus genomas ainda não foi esclarecido. Entretanto, é muito provável que estejam envolvidas na regulação de tradução e talvez em processos de desenvolvimento.

O vegetal *Arabidopsis thaliana* é uma dicotiledônea, membro da família da mostarda com o número diplóide igual a dez. Ela tem sido largamente utilizada como modelo para o estudo de biologia molecular vegetal devido ao seu pequeno porte, curto tempo de geração, fácil inserção de genes estranhos ao seu genoma (transformação) e estudos genéticos (TAIZ et al., 1998). Foi recentemente seqüenciado e a anotação do genoma determinou a presença de quatro proteínas contendo o PUM-HD (THE *ARABIDOPSIS* GENOME INICIATIVE, 1999).

A Figura 3 representa uma *Arabidopsis thaliana* adulta onde pode-se observar os vários órgãos do vegetal. O caule que termina na inflorescência e as folhas correspondem aos órgãos aéreos que são desenvolvidos a partir de grupos pequenos de células totipotentes, os meristemas do caule. As folhas são produzidas pelo meristema caulinar e, no período de florescimento, este começa a formar as flores no lugar das folhas sendo agora chamado meristema de inflorescência. Tipicamente em *Arabidopsis thaliana* a floração acontece concorrentemente com o desenvolvimento do caule. Durante a

formação das flores, os diversos órgãos que as compõem são desenvolvidos a partir do meristema floral (LYNDON, 1990; STEEVES & SUSSEX, 1991; TAIZ et al., 1998).

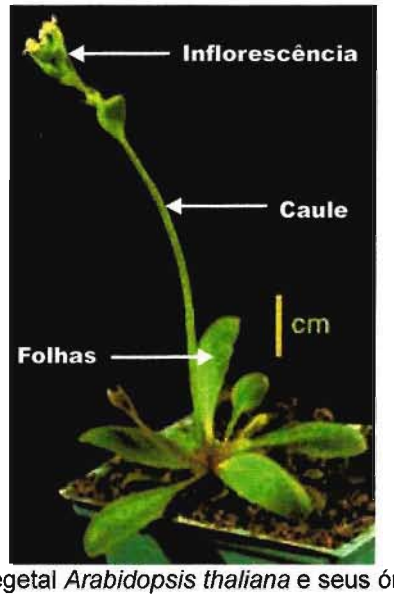



**Figura 3**: O vegetal *Arabidopsis thaliana* e seus órgãos aéreos.

Os órgãos não aéreos, as raízes, são produzidos pelos meristemas radiculares ou da raiz. Usualmente, a raiz principal dá lugar a formação das raízes secundárias que incrementam a absorção de água e de minerais.

**(A) Meristema Caulinar:**

O meristema do caule pode ser visto de duas formas diferentes. Na primeira, três zonas distinas são definidas pela densidade citoplasmática e taxa de divisão celular: a zona periférica (PZ), a central (CZ) e a "rib zone" (RZ), como ilustrado na figura 4(a). Os órgãos laterais são produzidos a partir de células da PZ, que possui alta freqüência de divisão celular, da mesma maneira que a extensão do caule é derivado de células da RZ. A CZ age como um reservatório de células-tronco que abastece as duas outras zonas. Na segunda, mostrada na Figura 4(b), o meristema do caule é organizado em camadas de células distintas: L1 epidermal que tem o padrão de divisão

celular anticlinal, L2 subepidermal que também se divide anticlinalmente (perpendicular à superfície do meristema) menos dentro dos órgãos em desenvolvimento nos quais se replicam num padrão periclinal (paralela à superfície do meristema) e, L3 mais interna que se divide sob várias orientações. A natureza estritamente anticlinal da proliferação celular de L1 e L2 resulta na formação de populações clonalmente separadas, contendo grupos separados de células-tronco, sendo que todas compõem os órgão primordiais. O fato da zona periférica e central bem como os órgãos laterais conterem células provenientes das três camadas indica que a comunicação entre essas camadas é requerida para o processo de desenvolvimento coordenado (SUSSEX, 1999; BOWMAN & ESHED, 2000; CLARK, 2001).

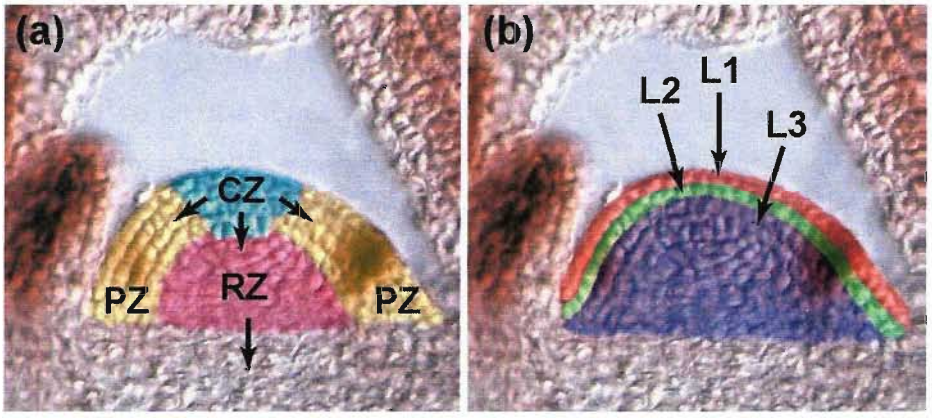



**Figura 4:** Duas visões da organização histológica do meristema apical do caule (BOWMAN & ESHED, 2000).

**(B) Meristema Floral:**

Quando uma planta é induzida a florescer, alguns ou todos os meristemas caulinares se comprometem a desenvolver flores que produz seqüencialmente as sépalas, seguidas das pétalas, estames e finalmente os carpelos. As sépalas protegem e cercam o broto enquanto que as pétalas, em várias espécies, servem para atrair os polinizadores. Estas circundam os estames que produzem o pólen e os carpelos que contém o óvulo (IRISH, 1999; SMYTH, 2001; GOTO et al., 1991; HEMPEL et al., 1997).

O meristema floral é um meristema caulinar modificado, tendo estrutura e função muito similares e expressando genes em comum que regulam aspectos fundamentais como a manutenção de células-tronco, diferenciação e formação de órgãos (CLARK et al., 1993; ENDRIZZI et al., 1996; LAUX et al., 1996). Em contraste com o meristema do caule, o floral forma um número fixo de órgãos e termina num gineceu central. Contudo, os genes LEAFY e APETALA1 estão envolvidos na especificação dos meristemas florais, já que mutações em suas seqüências convertem-nos a caulinares (SHANNON & MEEKS-WAGNER, 1993). Por outro lado, o gene TERMINAL FLOWER (TFL) quando mutado converte o meristema caulinar em floral (ALVAREZ et al., 1992).

**(C) Meristema da Raiz:**

A raiz de dicotiledôneas, esquematizada na Figura 5(a), pode ser vista como um conjunto de cilindros concêntricos: quatro camadas externas, epiderme, córtex, endoderme e periciclo circundando o tecido vascular na região central. A epiderme apresenta dois tipos de células, as que desenvolvem pêlos absorventes e as que não os produzem. O córtex e a endoderme são originados cada um por apenas um único tipo de célula. O periciclo é um meristema secundário constituído de células capazes de iniciar a formação de raízes laterais, mas sob condições normais apenas as células mais internas promovem esta função. No centro, a disposição dos tecidos vasculares tem simetria bilateral com vasos lenhosos no eixo de simetria e os liberianos de ambos os lados (BENFEY & SCHERES, 2000; TAIZ et al. 1998).

Numa raiz em crescimento, as novas células se originam a partir do meristema situado na ponta distal: quatro conjuntos de células iniciadoras são localizadas ao redor de células com baixa taxa de divisão celular conhecidas como Centro Quiescente (QC). Este centro mantém as iniciadoras num estado indiferenciado e apresenta uma ultra-estrutura e

expressão gênica distintas. Após cada divisão celular (Figura 5b), uma célula-filha é desconectada do QC permitindo que ocorra a indução da diferenciação produzindo uma iniciadora (BENFEY & SCHERES, 2001).

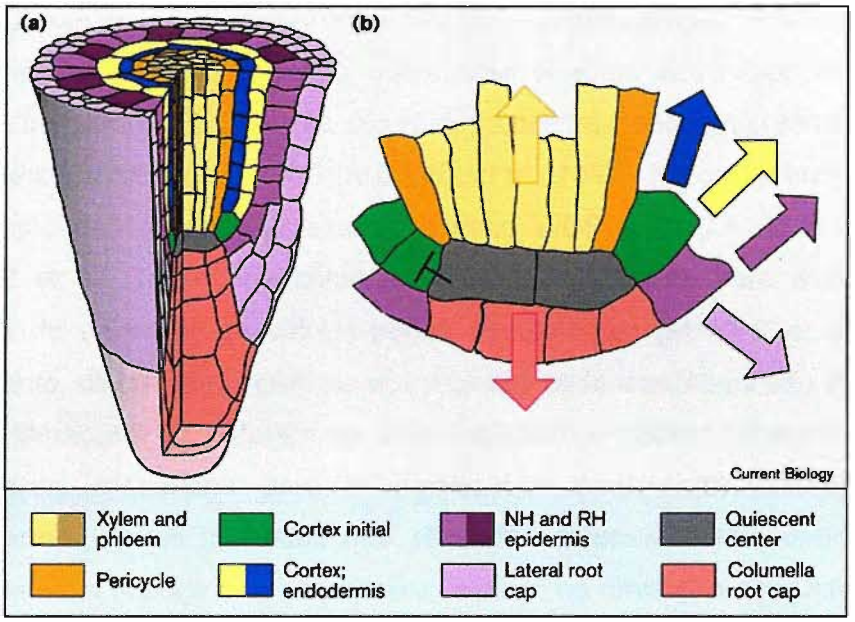



**Figura 5:** Histologia da raiz. (a) representa os tecidos internos da raiz e (b) as células iniciadoras e quiescentes, que geram os cilindros radiculares, e suas direções de divisão celular (BENFEY & SCHERES, 2000).

O meristema é protegido do solo por várias camadas de células que constituem a columela. Ela tem um conjunto de célula geradoras próprio da mesma forma que o tecido vascular, entretanto, sua parte externa é produzida pelas mesmas células que dão origem à epiderme. O córtex e a endoderme são desenvolvidos a partir da mesma célula iniciadora.

Cada grupo de iniciadoras sofre um padrão de divisão estereotipado gerando sua progene. Como as células vegetais não se movem uma em relação à outra, as divisões produzem colunas ou filas de células, sendo que, a relação espacial reflete a idade de cada componente. As células mais jovens estão próximas da ponta da raiz enquanto que as mais velhas estão mais distantes desta.

Os meristemas do caule e da raiz podem ser vistos superficialmente como objeto e imagem num espelho: ambos dão lugar a estruturas

ramificadas, mas são responsáveis pela formação de órgãos diferentes (BOWMAN & ESHED, 2000; TAIZ et al., 1998).

A organização básica dos tipos de meristemas são similares em termos de ter uma região central de células quiescentes ou de multiplicação lenta. Além disso, o mecanismo celular de manutenção também parece semelhante: na raiz, o centro quiescente controla o comportamento das células iniciadoras, que são na sua maioria células-tronco unipotentes, via um sinal de curto alcance (VAN DEN BERG et al., 1997). No caule, uma pequena população de células expressando o gene WUSCHEL (LAUX et al., 1996; KLAUS et al., 1998) age como um centro organizador para especificar o padrão de camadas de células-tronco pluripotentes (MAYER et al., 1998). Entretanto, os conjuntos gênicos que regulam cada meristema são diferentes.

Mutações que afetam os dois meristemas podem apresentar lesões em genes requeridos para a organização fundamental de ambos os meristemas. Esses mutantes não têm sido extensivamente analisados e, além disso, a maioria que desenvolve defeitos na formação e/ou manutenção dos meristemas apicais é específico para cada um (MEYEROWITZ, 1997). São conhecidos apenas dois genes que afetam o desenvolvimento de ambos os meristemas: DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEM (DEM) de tomate e os genes FASCIATA (FAS1 e FAS2) de *Arabidopsis*. O primeiro é requerido para a formação do padrão embriônico bem como a formação dos meristemas codificando uma proteína nova de função bioquímica desconhecida (KEDDIE et al., 1998). FAS1 e FAS2 codificam duas subunidades do Fator de Montagem da Cromatina (CAF-1). Em humanos, CAF-1 é associado com a síntese das histonas H3 e H4 e localiza-se na forquilha de replicação, estando envolvido com o enovelamento do DNA durante a duplicação e o reparo (VERREAULT, 2000).

Nos organismos citados anteriormente, as proteínas PUF apresentam funções similares, isto é, em todos eles alteram a taxa de tradução de

mRNAs alvos e este mecanismo está ligado a sistemas de diferenciação celular. Isto faz com que os homólogos do PUMILIO de *Arabidopsis* sejam interessantes para futuros estudos.

## II – OBJETIVOS.

O objetivo deste trabalho foi clonar e caracterizar um dos genes homólogos ao PUMILIO, o *APUM-2*. de *Arabidopsis thaliana*. A expressão deste gene foi analisada por sistemas repórteres com GUS e GFP, que possibilitou determinar em que tecidos e etapas da vida do vegetal ele é expresso. Além disso, foi efetuada análise por genética reversa alterando a expressão normal de *APUM-2* para constitutiva (substituindo a região promotora do gene pelo promotor viral CaMV 35S) e reprimida (promotor 35S ligado a uma seqüência antisense de *APUM-2*).

# III – MATERIAIS E MÉTODOS.

## III.I-ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DOS GENES *APUM*.

As seqüências dos genes *APUM* estão disponíveis no endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov do GenBank sendo que *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* estão no BAC F16P2 (gi: 6598426) e *APUM-4* está no BAC F14M19.

Os genes e proteínas foram analisados utilizando a ferramenta BLAST ("BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL"), também encontrada no endereço do GenBank, através do programa ClustalW, obtido pelo endereço http://clustalw.genome.ad.jp.

## III.II-NORTHERN BLOT E RT-PCR DE AMOSTRAS DE PLANTAS SELVAGENS.

### (A) Semeadura de *Arabidopsis thaliana*:

Um volume de sementes de *Arabidopsis*, da variedade WS (Wassilewskija), foi incubado com três volumes de uma solução 50% cândida e 0,1% de Tween 20 durante dez minutos para esterilizar. Em seguida, foram lavadas várias vezes com água deionizada estéril para retirar os resíduos de cândida e do tensoativo. Após eliminar o excesso de água, as sementes foram ressuspendidas em seis volumes de uma solução 0,1% de agar estéril e aplicadas com uma pipeta Pasteur sobre placas de Petri com 2,16g/L de meio sólido para plantas MS (MURASHIDE & SKOOG, 1962) da GIBCO.

As placas foram seladas com esparadrapo microporoso, embrulhadas em papel alumínio e conservadas em geladeira por quatro dias. Em seguida, foram colocadas numa estufa a 22°C com 24 horas de luz. Após dez dias, aproximadamente, as plantas foram transferidas para pequenos vasos.

**(B) Extração de RNA de plantas:**

Os experimentos com RNA foram feitos levando em consideração sua labilidade e, portanto, água deionizada e soluções foram incubadas com DEPC 0,1% durante uma noite e em seguida autoclavadas.

Várias plantas selvagens foram semeadas e cresceram até a floração e formação de frutos. Em seguida, foram separados os vários órgãos de cada uma delas: flores, folhas, frutos, caule e raiz. Cada parte foi congelada em nitrogênio líquido, pulverizada num almofariz e o RNA total foi extraído com o reagente Trizol da GIBCO, seguindo seu protocolo. O RNA obtido foi ressuspendido em água deionizada estéril suficiente e então dosado por espectrometria.

**(C) Northern blot:**

Este experimento também foi feito levando em consideração a labilidade do RNA e, portanto, todas as soluções utilizadas foram incubadas com DEPC 0,1% durante uma noite e em seguida autoclavadas.

*- Gel de agarose com formaldeído:*

A análise do RNA obtido acima por Northern Blot foi realizado de acordo com o protocolo da referência SAMBROOK et al. (1989), utilizando gel de agarose 1% com formaldeído. Aplicou-se 20μg de RNA de cada preparação como o sugerido.

As amostras foram transferidas do gel para uma membrana de nylon, da marca BIODYNE, por capilaridade. Em seguida, o RNA foi ligado covalentemente à membrana através da exposição da membrana à luz UV, seguindo a mesma referência.

- *Preparação da sonda:*

A sonda radioativa foi feita com o kit Random Primer Labeling System da GIBCO, de acordo com seu protocolo, e a seqüência do primeiro exon de *APUM-2* foi escolhida como molde para a preparação.

Antes de ser usada na hibridização, a sonda foi purificada numa coluna de Sephadex G50 em tampão TE. A coluna foi preparada numa seringa de 1 mL selada na parte inferior com lã de vidro, preenchida com Sephadex em TE e centrifugada a 1600g durante 5 minutos. O produto da reação foi aplicado na coluna e o conjunto centrifugado por 5 minutos a 1600g. O eluído foi desnaturado a 100ºC por 5 minutos e colocado imediatamente no gelo por alguns minutos estando pronto para ser usado.

- *Hibridização:*

Foram preparados 15 mL da seguinte solução:

- 10% Dextran Sulfato (massa molecular de 500.000);
- 1% SDS;
- 1M NaCl.

A membrana previamente umidecida em água deionizada foi aderida na parede de um frasco de hibridização com o lado do RNA voltado para o centro. A solução acima foi adicionada e a membrana ficou pré-hibridizando a 65ºC por uma hora num forno de hibridização. Após este período, adicionou-se DNA de salmão na concentração final de 100μg/mL, previamente desnaturado a 100ºC, e em seguida a sonda. O conjunto ficou incubando durante uma noite a 65ºC.

A membrana foi lavada duas vezes por 10 minutos a temperatura ambiente com um pequeno volume de 0,1% de SDS e 1x SSC (SAMBROOK et al., 1989). Em seguida, três lavagens de 15 minutos a 55ºC com uma solução 0,1% de SDS e 0,1x de SSC foram feitas para eliminar as hibridizações não-específicas. Após as lavagens, a membrana é envolvida em filme plástico para não secar e colocada para expor num "storage phosphor screen".

Após a obtenção dos dados de hibridização, a membrana foi lavada com uma solução 0,1% de SDS para a remoção da primeira sonda e posterior hibridização com uma sonda de controle que foi preparada da mesma maneira.

**(D) Reações de RT-PCR:**

A partir das amostras de RNA, foram realizados ensaios de RT-PCR com o kit SuperScript II RNAse $H^-$ Reverse Trancriptase da GIBCO, seguindo seu protocolo. A reação de PCR foi feita com a enzima Taq Polimerase High Fidelity da GIBCO utilizando termociclador da Perkin Elmer GenAmp PCR System 2400 com o seguinte programa: 94°C por dois minutos (1 ciclo); 94°C por trinta segundos, 56°C por trinta segundos e 68°C por quatro minutos (40 ciclos).

Antes da reação de formação do cDNA, o RNA foi tratado com DNAse livre de RNAse, também da GIBCO, seguindo seu protocolo.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose com baixo ponto de fusão de 3% em tampão TBE 0,5x (SAMBROOK et al., 1989).

## III.III - CLONAGEM DO PROMOTOR E GENE *APUM-2*.

**(A) Maxi-preparação de DNA:**

A obtenção de larga escala de DNA foi efetuada com uma coluna de purificação da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante, sem nenhuma alteração.

Para vetores com baixo número de cópias por célula, como os BACs, foram inoculados três litros de meio 2xTY e para vetores com alto número de cópias, como o pBINPLUS (VAN ELEGENS et al., 1995) e o pBI221 (Clontech), partiu-se de 500mL de meio 2xTY.

**(B) Digestão com enzimas de restrição:**

Todas as enzimas de restrição utilizadas agem a 37°C e são da New England BioLabs. As reações foram feitas durante a noite com pelo menos 5ng de DNA e 0,4U de enzima em 10μL finais, seguindo o protocolo de cada enzima.

A maioria das digestões precisavam de duas enzimas diferentes, sendo que, quando possível, elas eram adicionadas juntas. Quando existia incompatibilidade de tampões, a digestão era realizada sequencialmente, isto é, primeira digestão com a enzima que precisasse de menor força iônica seguida de precipitação do DNA (SAMBROOK et al., 1989) e finalmente a digestão com a segunda enzima.

**(C) Reações de PCR:**

Nestas reações, foi utilizada a enzima Taq polimerase High Fidelity da GIBCO com os seguintes reagentes e concentrações:

- 50ng de DNA molde;
- 1x tampão da enzima (faz parte do Kit da enzima);
- 2mM de cloreto de magnésio;
- 0,2mM de cada dNTP;
- 0,2μM de cada oligonucleotídeo (sintetizados pela GIBCO);
- 2U de enzima;
- completar a reação com água deionizada para o volume final adequado.

Os oligonucleotídeos utilizados para todas as construções estão indicados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para as todas as construções.

| Região a ser amplificada | Oligonucleotídeos |
|---|---|
| Promotor de *APUM-2* | 5'- C ATG GAA GTC GAC ATG AGC GCA CTG TGA TAA TCA AAG AAT TGG C<br>Sal I, 44 pares de bases, Tm=53,2°C<br>3'- CA GTT CCG GGA TCC TTA TCA CCT AAA CAA CAA AAA CCC TAT AAC C<br>BamH I; 45 pares de bases, Tm=56°C |
| Gene (exons mais íntrons) *APUM-2* | 5' - GT TGT TTA GGA TCC AAT GAT ACC GGA ACT GGG<br>BamH I, 32 pares de bases, Tm=55°C<br>3' - TC TGC ATA GAG CTC CTC TTA CTC ATC AGC CTA AAG TGG GAT G<br>Sac I, 42 pares de bases, Tm=54,6°C |
| Exon 1 de *APUM-2* | 5' - T TGT TGT GAG CTC GTG ATA ATG ATA CCG GAA CTG G<br>Sac I, 35 pares de bases; Tm=55,6°C<br>3' - T GGA CCA GGA TCC CAA ACT CAT GCT GCT TCC TCT G<br>BamH I, 35 pares de bases, Tm=56°C |

As reações foram efetuadas no termociclador da Perkin Elmer, GenAmp PCR System 2400 com o seguinte programa: 94°C por dois minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto para cada 1 Kb a ser amplificado (35 ciclos).

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com acetato de sódio (3M pH=6,2)/etanol (SAMBROOK et al., 1989).

**(D) Separação de DNA por eletroforese em gel de agarose com baixo ponto de fusão, e purificação com a enzima β-agarase:**

A separação do DNA clivado por enzimas de restrição foi feita utilizando eletroforese em gel de agarose com baixo ponto de fusão (SAMBROOK et al., 1989). Os fragmentos de interesse foram cortados do gel

e extraídos utilizando a enzima β-agarase (GIBCO). Esta enzima digere a agarose, liberando o DNA para posterior precipitação.

Primeiro, a massa do bloco de agarose com o fragmento foi medida, para determinar a quantidade de enzima a ser utilizada (1U para cada 100μL de agarose, considerando densidade de 1g/mL), e incubado por 10 minutos a 65°C com o tampão da enzima, para fundir a agarose. Em seguida, adiciona-se a enzima e a reação deve ser incubada por uma hora a 42°C. Após este período, a mistura é centrifugada por vinte minutos a 14000rpm, para separar a fase líquida do gel que não sofreu digestão e o sobrenadante é recolhido para posterior precipitação com acetato de sódio (3M, pH=6,2)/etanol (SAMBROOK et al., 1989).

**(E) Reações de ligação:**

As reações de ligação foram feitas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs). Os insertos e os vetores a serem ligados foram misturados numa proporção de 4:1, respectivamente, para evitar auto-ligação do vetor. As condições utilizadas foram: 2U de enzima em 10μL finais a 16°C durante uma noite.

Estas reações foram precipitadas com acetato de sódio/etanol (SAMBROOK et al., 1989) e ressuspendidas em 10μL de água deionizada. Foi utilizado 2μL desta solução para as eletroporações em células de *E. coli*.

**(F) Eletroporação em *E. coli*:**

As reações de ligação foram transformadas na cepa DH10B de *E.coli* por eletroporação e o método está descrito no artigo de TUNG & CHOW (1996). As condições utilizadas foram:

- 40μL de células competentes DH10B a $10^{11}$-$10^{12}$células/mL;
- cubetas de eletroporação de 0,2mm;
- voltagem: 2,5kV ;

- capacitância: 25μF (para BACs) e 50μF (para os demais vetores);
- resistência: 100Ω.

Após a eletroporação, as células foram incubadas em 800μL de meio SOC por 40 minutos e em seguida plaqueadas em meio sólido TYE com o antibiótico adequado para cada vetor.

Para monitorar a eletroporação, foram feitos dois controles: o negativo onde somente as células foram eletroporadas (sem nenhum vetor incluído) para determinar a existência de contaminações nas cubetas ou nas próprias bactérias, e o positivo onde é utilizado um vetor conhecido para determinar a eficiência da transformação.

As colônias obtidas nas placas de Petri foram inoculadas em 1,5mL de meio 2xTY e efetuou-se uma mini-preparação de DNA (SAMBROOK et al., 1989). Os plasmídeos obtidos foram confirmados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e por seqüenciamento em ABI 377 da Perkin Elmer.

**(G) PCR de seqüenciamento:**

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o kit Big Dye Terminator Ready Reaction Mix da Applied Biossystems, utilizando os seguintes reagentes:

- 6μL de tampão "save money" (200mM de Tris-Cl pH=9,0 e 5mM de Cloreto de Magnésio);
- 3,2pmol de oligonucleotídeos (sintetizados pela GIBCO);
- 200 a 500ng de DNA;
- 2μL de Terminator Ready Reaction Mix;
- completar o volume com água deionizada para 20μL.

Os oligonucleotideos utilizados para a amplificação estão ilustrados na Tabela 2 e se alinham a cada 350 pares de bases das seqüências analisadas.

**Tabela 2:** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados parao seqüenciamento das construções.

| Região a ser seqüenciada | Oligonucleotídeos |
|---|---|
| Promotor de *APUM-2* | **1:** 5' C ATG GAA GTC GAC ATG AGC GCA CTG TGA TAA TCA AAG AAT TGG C (utilizado na a amplificação);<br>**2:** 5' CAA CGT GAG CTG ATA CTT AC ;<br>**3:** 5' GGG AAA TTG TGA AGG AGA GC ;<br>**4:** 5' GCT AGT TTG CAA TCT TCT T ;<br>**5:** 5' CAT CTT GAC CAC CAC TTG AC ;<br>**6:** 5' CTT CTT CAA CTC TTC TGT CG ;<br>**7:** 3' CA GTT CCG GGA TCC TTA TCA CCT AAA CAA CAA AAA CCC TAT AAC C (utilizado na amplificação). |
| Gene *APUM-2* | **1:** 5' GT TGT TTA GGA TCC AAT GAT ACC GGA ACT GGG (utilizado na amplificação);<br>**2:** 5' AGT TGA ATC CGA GGT TGC CA ;<br>**3:** 5' GCT TTG ATA CTT TGT TAA TG ;<br>**4:** 5' TTG GGA GTG GGA GAG TGA GT ;<br>**5:** 5' AAT GAT GGA GGT GGA GTA GC ;<br>**6:** 5' GGA CGT GAA CTT TAT GGG TA ;<br>**7:** 5' GCT GGC CAT GTT GTA GAG TT ;<br>**8:** 5' GAG AAG AGA ATT GGC AGA TA ;<br>**9:** 5' GCA ATG TTG TGA CCC TCT CC ;<br>**10:** 5' CAC GGA AAG CCT GAT GAG CG ;<br>**11:** 5' GAG CTG ATC CTT GGT CGT AT ;<br>**12:** 5' ACA GCT TAA CTA GGG TGG AT ;<br>**13:** 3' TC TGC ATA GAG CTC CTC TTA CTC ATC AGC CTA AAG TGG GAT G (utilizado na amplificação). |

Todas as reações foram feitas no Termociclador da Perkim Elmer, GenAmp PCR System 2400 com o seguinte programa: 96°C por dez segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos (40 ciclos).

Os produtos de PCR foram precipitados adicionando 80μL de 2-propanol 75% e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados por 20 minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado com 250μL de 2-propanol 75%. A mistura foi novamente centrifugada por 10 minutos a 14000rpm e o DNA seco sob vácuo (PERKIN ELMER PROTOCOLS).

Os produtos de PCR foram ressuspendidos em 4μL de uma solução com 50mg/mL de Blue Dextran e 25mM de EDTA (pH=8,0) em formamida deionizada e, em seguida, aquecidos a 95°C por dois minutos para desnaturar o DNA. As amostras foram imediatamente colocadas no gelo por alguns minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida em TBE 1x (PERKIN ELMER PROTOCOLS). O seqüenciador utilizado foi o ABI 377 da Perkin Elmer.

## III.IV - TRANSFORMAÇÃO EM *ARABIDOPSIS THALIANA*.

### (A) Eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens*:

O método utilizado para a eletroporação em *Agrobacterium* foi baseado nos vários protocolos descritos em sites como http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis e http://informa.bio.caltech.edu e nos artigos de WEN-JN & FORBE (1989) e LIN et al. (1994). Foi utilizada a cepa LBA4404 com resistência à estreptomicina.

*- Preparo de Células competentes:*

Uma cultura de *Agrobacterium* em LB foi incubada a 29°C e 200rpm até atingir densidade óptica a 600nm entre 0,5 e 0,7 de absorbância. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4°C e 5000rpm por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O sólido foi ressuspendido com o mesmo volume da cultura de uma solução 10% glicerol e 1mM de HEPES pH=7,0. As células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas na solução acima de forma a se obter uma concentração entre $10^{11}$-$10^{12}$ células/mL. A suspensão foi aliquotada e congelada por alguns minutos em gelo seco com etanol e, em seguida, armazenada a -80°C.

*- Eletroporação:*

Na eletroporação foram utilizadas as seguintes condições:

- 40μL de células competentes LBA4404;
- cubeta de eletroporação de 0,2mm;
- voltagem: 2,5kV ;
- capacitância: 25μF;
- resistência: 200Ω.

Após a exposição ao campo elétrico, as células foram incubadas em 800μL de meio YM durante três horas a 29°C e 250rpm. Após este período, 200μL da cultura foram plaqueados em YM sólido com 50μL/mL de estreptomicina e de kanamicina. As colônias transformadas começam a aparecer depois de dois dias de incubação a 29°C.

**(B) Transformação de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*:**

O método utilizado para transformar *Arabidopsis* com *Agrobacterium* foi baseado em vários protocolos descritos em sites como http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis e http://informa.bio.caltech.edu.

A bactéria *Agrobacterium* já transformada com o plasmídeo de interesse foi incubada em 20mL de meio LB contendo estreptomicina e kanamicina (50μL/mL de cada) a 29°C e 250rpm durante dois dias. Em seguida, as células foram centrifugadas e o precipitado lavado com uma solução de 5% sacarose e 0,005% Silwet L-77. Foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em 1mL da solução anterior.

Quando cresceram os primeiros botões das plantas, os ramos primários foram cortados para a proliferação dos secundários e no tecido lesado foi pingado a suspensão de *Agrobacterium*. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, de cinco em cinco dias. Após a morte do vegetal, os frutos foram colhidos e as sementes separadas e secas num dessecador por uma semana para posterior semeadura em placas de Petri com 2,16g/L de meio MS (MURASHIDE & SKOOG, 1962) sólido e 50μL/mL de kanamicina.

## III.V - ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES.

### (A) Extração de DNA genômico de plantas:

Três folhas de tamanho médio de cada transformante foram recolhidas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente pulverizadas num eppendorf, com o auxílio de um pistilo. O DNA foi extraído com o reagente Plant DNAzol (GIBCO) seguindo seu protocolo. O material final obtido para cada planta foi ressuspendido em 50μL de água deionizada estéril e quantificado por espectrofotometria.

### (B) Reação de PCR com o DNA genômico:

Nestas reações, foi utilizada a enzima Taq Polimerase High Fidelity da GIBCO com as seguintes quantidades dos reagentes:

- 100ng de DNA genômico acima;
- 1x tampão da enzima (fornecida junto com a enzima);
- 2mM de cloreto de magnésio;
- 0,2mM de cada dNTP;
- 0,2μM de oligonucleotídeos;
- 2U de enzima;
- completar a reação com água deionizada estéril para volume final de 50μL.

As reações foram feitas no termociclador da Perkin Elmer GenAmp PCR System 2400 com o seguinte programa: 94°C por dois minutos (1 ciclo); 94°C por trinta segundos, 56°C por trinta segundos e 68°C por dois minutos (40 ciclos).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% com tampão TAE 1x (SAMBROOK et al., 1989).

**(C) Southern blot:**

*- Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição:*

O DNA, 5μg de cada amostra, foi clivado com 0,4U de enzima de restrição (New England BioLabs) durante uma noite seguindo os protocolos das enzimas utilizadas.

Após o período de reação, os fragmentos gerados foram separados num gel de agarose 1% sem brometo de etídeo em TAE 1x. Em seguida, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de nylon, da marca BIODYNE, por capilaridade e o material foi ligado covalentemente à membrana através da exposição da membrana à luz UV, seguindo o protocolo da referência SAMBROOK et al. (1989).

*- Preparação da Sonda e Hibridização:*

A preparação da sonda e a hibridização foram feitos da mesma forma que para o Northern blot.

**(D) Análise da atividade enzimática da β-glicuronidase:**

O protocolo utilizado nesta etapa foi baseado nos experimentos dos trabalhos de BLÁZQUEZ et al. (1997) e HEMPEL et al. (1997). As plantas transformadas com o repórter GUS foram mergulhadas na solução abaixo e incubadas no gelo sob vácuo por duas horas.

- 5mM de X-Glu;
- 50mM de tampão fosfato pH=7,0;
- 0,2% de Triton X-100;
- 3mM de $K_4[Fe(CN)_6]$;
- 3mM de $K_3[Fe(CN)_6]$;
- 20% de metanol.

Após este período, as amostras foram mantidas a 37ºC no escuro por 16h. Por último, as plantas já coradas com o substrato, foram tratadas com

uma solução de 70% etanol, para eliminar a clorofila e facilitar a observação do repórter.

**(E) Western blot:**

As proteínas vegetais foram extraídas utilizando o reagente Trizol (GIBCO), seguindo seu protocolo, e separadas em SDS-PAGE 15% de acordo com a referência SAMBROOK et al. (1989).

A transferência para membrana de nitrocelulose foi efetuada com o equipamentoTrans-Blot Semi-Dry Eletrophoretic Transfer Cell seguindo suas especificações, com 0,8mA/cm$^2$ por uma hora.

Após a transferência, a membrana foi incubada à temperatura ambiente em TBST por uma hora com anticorpo contra GFP (GIBCO/Invitrogen) e, em seguida, com anticorpo ligado à fosfatase alcalina também por uma hora. A membrana foi lavada com TBST à temperatura ambiente e a reação imunológica foi detectada com o kit ECF-Detection System (Amershan Pharmacia Biotech).

# IV – RESULTADOS.

## IV.I – ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DOS GENES *APUM*.

O genoma de *Arabidopsis thaliana* foi recentemente seqüenciado (THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE, 2000 e 2001) e a anotação do genoma determinou a presença de quatro proteínas contendo o PUM-HD. Três delas estão situadas no cromossomo II, sendo que duas cópias estão lado a lado e a terceira está a 8800 pares de bases de distância destes com a janela de leitura invertida. A quarta cópia situa-se no cromossomo IV.

A análise genômica foi realizada através de bibliotecas de YACs, BACs e cosmídeos, que podem ser acessados através do GenBank pelo endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov, sendo que a parte correspondente ao cromossomo II foi clonada no BAC F16P2 (gi:6598426) e a do cromossomo IV no F14M19 (gi: 4539290). Neste trabalho, os genes foram numerados de acordo o número do cromossomo e com a ordem de aparição nos fragmentos seqüenciados. Para facilitar a visualização, esses genes foram esquematizados na Figura 6, sendo utilizada a nomenclatura *APUM-1*, *APUM-2*, *APUM-3* e *APUM-4* para os genes homólogos ao *PUMILIO* de *Arabidopsis* 1, 2, 3 e 4; respectivamente.

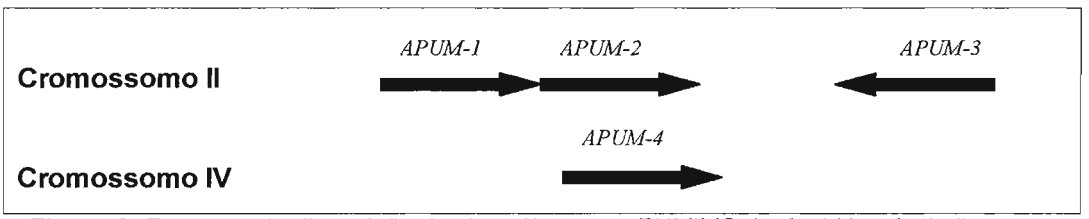



**Figura 6:** Esquema da disposição dos homólogos ao *PUMILIO* de *Arabidopsis thaliana* nos fragmentos clonados em BACs.

O tamanho da região estrutural e do cDNA, número de exons e tamanho das proteínas, de acordo com a anotação do genoma estão ilustrados na Tabela 3:

**Tabela 3:** Dados dos genes *APUM* de *Arabidopsis* disponíveis no GenBank.

| | gene (pares de bases) | número de exons | cDNA (pares de bases) | proteína (aminoácidos) |
|---|---|---|---|---|
| **APUM-1** | 3902 | 9 | 2907 | 968 |
| **APUM-2** | 4009 | 9 | 2919 | 972 |
| **APUM-3** | 3866 | 9 | 2895 | 964 |
| **APUM-4** | 3561 | 10 | 2550 | 849 |

Os três primeiros genes, situados no mesmo cromossomo, apresentam alto grau de similaridade, fato que pode ser observado nos alinhamentos efetuados com o auxílio da ferramenta BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), anexados a este trabalho. Devido à proximidade e à grande identidade entre eles pode-se dizer que essas duplicações são recentes e provenientes do mesmo evento de expansão e talvez a função de cada proteína seja redundante. Já os alinhamentos entre esses três genes com o quarto, situado no outro cromossomo, não demostram a mesma similaridade.

Quando as regiões promotoras são alinhadas duas a duas, utilizando a mesma ferramenta, apenas pequenas seqüências de aproximadamente 30 pares de bases mostram alguma identidade (dados em anexo).

A análise da seqüência de aminoácidos, utilizando o programa ClustalW (http://clustalw.genome.ad.jp), revela que os três genes do cromossomo II apresentam mais de 87% de identidade enquanto que o quarto em relação aos demais não chega a 30%, como indicado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Alinhamentos entre as quatro seqüências de aminoácidos dos APUM de *Arabidopsis*.

| | APUM-1 | APUM-2 | APUM-3 | APUM-4 |
|---|---|---|---|---|
| **APUM-1** | - | 90,1% | 88,8% | 28,4% |
| **APUM-2** | 90,1 % | - | 87,1% | 28,5% |
| **APUM-3** | 88,8% | 87,1% | - | 28,1% |
| **APUM-4** | 28,4% | 28,5% | 28,1% | - |

Os alinhamentos feitos apenas com o PUM-HD mostram que o grau de identidade entre os três genes do cromossomo II fica em torno de 95%

enquanto que estes em relação ao do cromossomo IV está ao redor de 52%, como pode ser observado na Tabela 5.

**Tabela 5:** Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos dos APUM-HD de *Arabidopsis*.

| | APUM-HD 1 | APUM-HD 2 | APUM-HD 3 | APUM-HD 4 |
|---|---|---|---|---|
| **APUM-HD 1** | - | 95,3% | 96,8 % | 53,1 % |
| **APUM-HD 2** | 95,3 % | - | 95,3 % | 52,8 % |
| **APUM-HD 3** | 96,8 % | 95,3 % | - | 53,1 % |
| **APUM-HD 4** | 53,1 % | 52,8 % | 53,1 % | - |

O genoma de *Arabidopsis* está coberto de grandes duplicações de segmentos de DNA e pouco se sabe a respeito de suas origens (VISION et.al., 2000). Muitos dos genes presentes nestes blocos podem ter funções redundantes, mas o longo período no qual o genoma se estabilizou pode ter dado a oportunidade de ocorrer divergência funcional (THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE, 2000). A observação do grau de identidade entre as seqüências gênicas e principalmente entre as de aminoácidos pode sugerir que os três genes do cromossomo II apresentam o mesmo papel, mas as diferenças existentes nas regiões promotoras podem indicar que cada um seja expresso em circunstâncias diferentes e/ou seus sistemas de regulação sejam distintos. Entretanto, a análise funcional de todos os representantes torna-se indispensável para se determinar qual a função de cada um e, posteriormente, afirmar se há ou não a ocorrência de redundância.

As proteínas homólogas ao PUMILIO desses vários organismos apresentam tamanhos e seqüências particulares e os alinhamentos entre seus PUM-HD também mostram diferentes graus de identidade, como indicam a Tabela 6. Nesta tabela, estão ilustrados apenas os dados de alinhamentos feitos com APUM-2 já que ele foi o objeto de estudo desta dissertação. Pode-se observar que os valores são muito discrepantes, entretanto APUM-2 junto com PUM-HD de *Dictyostelium* apresentam os menores valores de identidade quando alinhados com os demais, fato coerente com a distância filogenética destas espécies com as outras em questão.

**Tabela 6:** Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos do PUM-HD de várias espécies.

| Dominio PUF | *Dictyostelium* (344 aa) | *Drosophila* (339 aa) | *Xenopus* (345 aa) | *Homo* (343 aa) | APUM-2 (343 aa) |
|---|---|---|---|---|---|
| Dictyostelium | - | 53,4 % | 55,0 % | 55,7 % | 50,1 % |
| *Drosophila* | 53,4 % | - | 76,7 % | 77,3 % | 51,9 % |
| *Xenopus* | 55,0 % | 76,7 % | - | 95,3 % | 50,7 % |
| *Homo* | 55,7 % | 77,3 % | 95,3 % | - | 53,1 % |
| APUM-2 | 50,1 % | 51,9 % | 50,7 % | 53,1 % | - |

Em geral, a duplicação gênica é acompanhada por alteração funcional (HUGHES, 1994) e a identificação destes "novos" genes pode auxiliar na determinação de novas funções celulares que podem ser muito interessantes para pesquisadores e para a agricultura. Entretanto, em *C. elegans* foram encontradas cinco cópias homólogas ao gene *PUMILIO* (SUBRAMANIAN & SEYDOUX., 1999) que não possuem diferentes papéis. Já em *Drosophila*, foi descoberto que o PUMILIO codifica uma proteína que se converte em duas isoformas requeridas redundantemente na formação do eixo anterior-posterior (PARISI & LIN, 1999). Sendo assim, este trabalho se restringe ao entendimento do papel do APUM-2 de *Arabidopsis thaliana*.

## IV.II - Northern Blot de Amostras de Plantas Selvagens.

A expressão dos genes *APUM* foram rastreadas através da análise de amostras de RNA extraídas dos órgãos de plantas selvagens adultas: flores, folhas, frutos, raiz e caule. A partir deste material, foram realizados experimentos de Northern blot e RT-PCR. Os frutos não apresentam quantidade significativa de RNA, talvez por serem tecidos de reserva, e portanto, a extração não forneceu material suficiente para a realização do Northern.

Após a transferência do material para a membrana, a marcação foi feita com o produto da amplificação do exon 1 de *APUM-2* (de 20077 a 19490 pares de bases do BAC F16P2, gi: 6598426) com dCTP radioativo, a partir

dos oligonucleotídeos da Tabela 1. Esta seqüência tem grande similaridade com os outros dois genes *APUM* do cromossomo II (Figura 12) sendo possível o rastreamento dos três ao mesmo tempo.

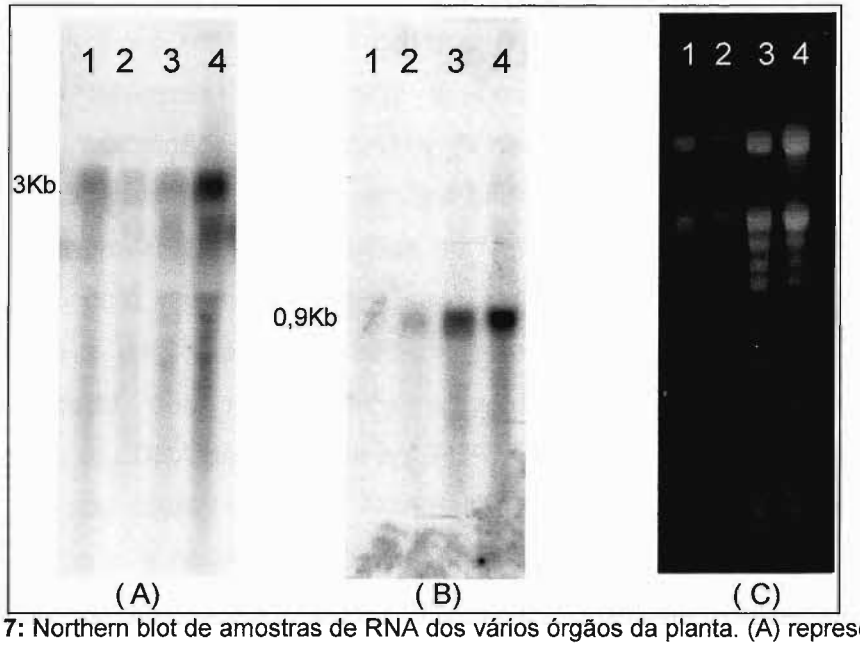



**Figura 7:** Northern blot de amostras de RNA dos vários órgãos da planta. (A) representa a membrana marcada com exon 1, (B) com o produto da amplificação da proto-clorofilil redutase (POR) e (C) representa o gel antes da transferência para a membrana. A linha 1 corresponde à amostra de raiz, 2 de caule, 3 de folhas e 4 de flores.

A Figura 7(A) mostra o resultado do Northern blot onde é possível observar bandas marcadas com aproximadamente 3000pb, que correspondem ao tamanho dos *APUM* (ver Tabela 3), em todos os poços. Isto significa que este gene pode ser encontrado em todos esses tecidos da planta. Entretanto, a membrana também apresentou marcações inespecíficas, mesmo após lavagens com alta adstringência.

Sendo assim, a avaliação das quantidades de mRNA presentes na membrana foi feita com uma nova hibridização com outra sonda que tinha a seqüência da proto-clorofilil redutase (*POR*). Esta enzima é responsável por uma das etapas da biossíntese da clorofila e é expressa constitutivamente na presença de luz em tecidos fotossintetizantes. A Figura 7(B) mostra o resultado desta hibridização e pôde-se observar uma única banda marcada de 0,9Kb em todos os tecidos verdes como o esperado e sem hibridizações

inespecíficas. A raiz não tem mensageiros de *POR* pois não é tecido clorofilado. As amostras de tecidos de flores e folhas contém aproximadamente a mesma quantidade de RNA, entretanto, a marcação com o exon 1 foi mais intensa na linha correspondente a de flores, indicando que esta contém mais mensageiros do que folhas. Já caule e raiz contém quantidades inferiores aos demais e mesmo assim, o tecido de raiz apresentou marcação considerável. Portanto, os tecidos com maior expressão dos genes *APUM* parecem ser raiz e flores.

A comprovação dos resultados do Northern blot foi feita por reações de RT-PCR com as mesmas amostras de RNA. A técnica de RT-PCR corresponde a uma reação de transcriptase reversa para a produção de cDNA a partir dos mensageiros presentes na amostra e posterior amplificação do cDNA de interesse por PCR.

A sonda utilizada para o Northern detecta os três mensageiros ao mesmo tempo e o discernimento entre eles foi feito por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam cada um dos genes gerando produtos com diferentes tamanhos (Tabela 7 e Figura 8). Além disso, estes oligos estão entre os exons 1 e 2 e se caso houvesse contaminação de DNA genômico, os fragmentos produzidos também poderiam ser reconhecidos pelo número de pares de bases. A Figura 8 ilustra a região a ser amplificada, sendo que, as bases em vermelho representam os oligonucleotídeos utilizados e as em azul o intron 1 de cada *APUM*.

**Tabela 7:** Tamanhos esperados dos fragmentos após a reação de RT-PCR.

| Gene | Tamanho do cDNA | Tamanho do DNA (com íntron) |
|---|---|---|
| ***APUM-1*** | 436 pares de bases | 564 pares de bases |
| ***APUM-2*** | 457 pares de bases | 619 pares de bases |
| ***APUM-3*** | 417 pares de bases | 507 pares de bases |

```
APUM-1 CCGCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGTTGCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAATAATGTGTTAGG
APUM-3 CCTCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGTTGCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAATAATGTGTTAGG
APUM-2 CCGCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGTTGCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAGTAATGTTTTAGG
       **.*************************************************.******.*****

APUM-1 TGGTGTTGGGGATAGGAGAAAAGTTAATGATAATCGATCTTTGTTCTCTATG CCACCGGGTTTT---
APUM-3 TGGTGTTGGGGATAGGAGAAAAGTGAATGACAGTCGGTCTTTGTTCTCTATG CCACCTGGTTTT---
APUM-2 TGGTGTTGGGGATAGGAGGAAAGTTAATGATAGTCAATCTTTATTCTCTATGCCACCTGGTTTTGATC
       ******************.***** ***** *.**..*****.**************..*.***.

APUM-1 --------------------GAAGGTGAGAAAACTGGTGCTTCTGCTTCTGAATGGGATGCTAATGGA
APUM-3 --------------------GAGGCTGGAAAACCTGGTGCTTCTGCTTCTGAGTGGGATGCTAATGGA
APUM-2 AGAGGAAGCAGCATGAGTTTGAGGTTGAGAAAACTAGTGCTTCTTCTTCTGAATGGGATGCTAATGGA
                            **.*.**..***.**.********.*******.***************

APUM-1 TTGATTGGTTTACCGGGTTTGGGACTTGGAGGCAAGCAGAAGAGTTTTGCTGATATCTTTCAGGTTGG
APUM-3 TTGATTG---------GTTTGGGACTTGGAGGCAAGCAGAAGAGTTTTGCTGATATCTTTCAGGTTG-
APUM-2 TTGATCGGTTTGCCGGGTTTGGGGATTGGAGGCAAGCAGAAGAGTTTTGCTGATATCTTTCAGGTTGG
       ****.*          *******..*****************************************

APUM-1 TGATACCTCTTCTTATTTA------------------CTTCTTTTGGTTGTCTATAGTTGATTATGCT
APUM-3 ------------------------------------------------------------GTTATTTT
APUM-2 TGATACCTCTTCTTATTACGACAACGCTTCTTGTTAGCTTCTTTCTGGTGTCTATAGTTGATTATGCT
                                                                  .****..*

APUM-1 TTGACGCTTTGCTAATG--T TTTCTCTGTGTGTGTGTTG-------TGTATATTTCTCCTT--GATA
APUM-3 TTGATACTCTGCTAATGT-T TCTCTGTGTGTATGTGTTG-------TGTATAGTTCTCCTG--AATA
APUM-2 TTGATACTTTGTTAATGTTTTCTCTCAAAGATAATTCTCTCTGTATTTGTATATTTCTGCAACAGATA
       ****..**.**.*****..**.***....*....*..*         ******.****.*.....***

APUM-1 TTCTTCCTTATGTAAACTTGGTGTATTGCTTTTG-TGCAGGCTGATATGGGGCATGGACATCCTGTCG
APUM-3 CTCTTGCTTATATAAACTTGGTGGATTACTTTTG-TGTAGGCGGATATGGGGCAT------CCTGTTG
APUM-2 TTCTTGCTTATGTAAACTTGATGGATTGCTTTTTGTGCAGGCTGATATGGGGCATGGACATCCTGTCA
       .****..****.********.**.***.*****..**.****.************      *****..

APUM-1 CACAACAGCCCTCACGTCCTGCAAGTCGTAATACCTTTGATGAAAATGTTGACTCTAATAATAATCTG
APUM-3 TACAGCAGCCCTCACGTCCTGCTAGTCGTAATACCTTTGATGAGAATGTTGACTCTAATAATAACCTG
APUM-2 CTAAGCAGCCCTCACGTCCTGCAAGTCGTAATACCTTTGATGAAAATGTTGACTCTAAGAATAATCTG
       ...*.*****************.********************.**************.*****.***

APUM-1 TCTCCGTCTGCATCACAAGGCATTGGTGCACCATCTCCATACAGCTATGCAGCTGTTCTAGGCTCTTC
APUM-3 TCTCCATCTGCATCACAAGGCATTGGAGCGCCATCTCCATACTGCTATGCAGCTGTTCTGGGTTCATC
APUM-2 TCTCCATCTGCATCGCAAGGCATTGGTGCACCATCTCCATACAGCTATGCAGCTGTTCTGGGTTCGTC
       *****.********.***********.**.************.****************.**.**.**

          APUM-1 TTTGTCTAGAAATGGAACTCCAGATCCACAGGCCATTGCTAGGGTGCC
          APUM-3 TTTGTCTAGAAATGGAACTCCAGATCCACAGGGCATTGCTAGGGTGCC
          APUM-2 TTTGTCTAGAAATGGAACTCCAGATCCACAGGCCATTGCTAGGGTGCC
                 *******************************.***************
```

**Figura 8:** Região a ser amplificada por RT-PCR entre os exons 1 e 2. Os oligonucleotídeos utilizados estão destacados em vermelho e a região em azul corresponde ao íntron 1 dos genes *APUM*.

A Figura 9 representa o resultado do RT-PCR visualizado num gel 3% de agarose de baixo ponto de fusão em TBE 0,5x, onde pode-se observar várias bandas e mesmo após o tratamento com DNAse é possível observar

amplificações a partir do DNA genômico, como pode ser deduzido pelo tamanho das bandas. As três bandas debaixo para cima representam os fragmentos dos três *APUM*. O mensageiro de *APUM-2* (terceira banda debaixo para cima) está presente em todos os tecidos enquanto que *APUM-3* (última banda) foi detectado em todas as estruturas menos em fruto. Já *APUM-1* não é produzido em caule, folha e frutos estando presente apenas na raiz e nas flores.

Este resultado é condizente com o Northern que apresentou bandas marcadas em todos os tecidos e além disso, mostrou outras marcações inespecíficas.

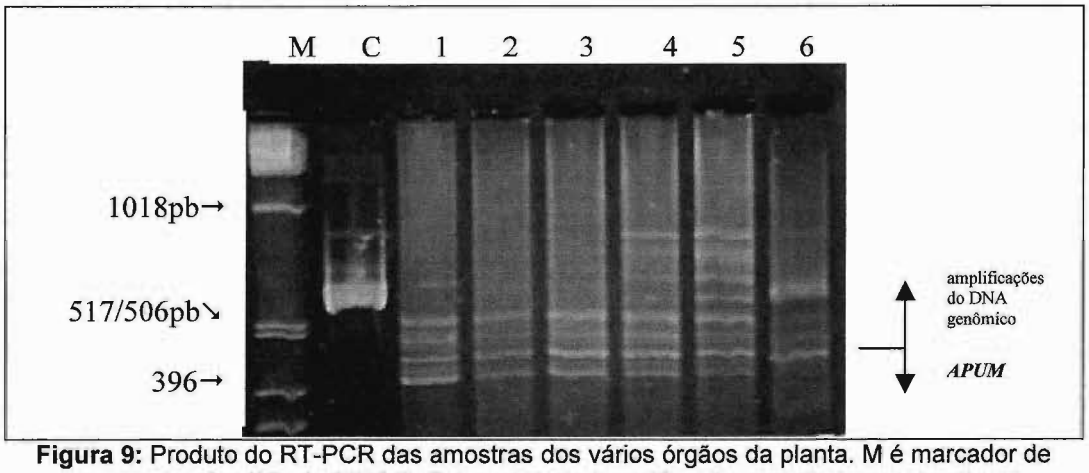



**Figura 9:** Produto do RT-PCR das amostras dos vários órgãos da planta. M é marcador de peso molecular 1Kb da GIBCO, C é o controle (amplificação a partir da construção no pBINPLUS devendo apresentar 619 pb), 1 corresponde ao tecido de raiz, 2 de caule, 3 de folhas, 4 de flores em desenvolvimento, 5 de flores maduras e 6 de frutos em desenvolvimento.

## IV.III - Clonagem do Promotor e do Gene *APUM-2*.

### (A) Preliminares:

A expressão de *APUM-2* foi estudada mais a fundo através de construções repórteres, expressão constitutiva e reprimida.

O gene e a região promotora foram clonados a partir do BAC F16P2 fornecido pelo Arabidopsis Biological Resourse Center. O F16P2 tem o

fragmento do cromossomo II de *Arabidopsis*, com 130141 pares de bases contendo os três genes *APUM*, clonado no vetor pBeloBAC-Kan de 10752 pares de bases (MOZO et al., 1998) com resistência à kanamicina. Como dito anteriormente, esta seqüência está disponível no GenBank (gi: 6598426).

Mesmo utilizando um fragmento de DNA menor para amplificar as seqüências de interesse ao invés do DNA genômico, foram necessários alguns ajustes. O BAC apresenta uma cópia por célula e devido ao seu tamanho a estabilidade é menor dificultando a obtenção de larga escala, uma vez que o vetor foi fornecido transformado em *E.coli* DH10B. Para facilitar o trabalho, o BAC foi reduzido de tamanho através da digestão com enzima de restrição. A seqüência do F16P2 foi analisada numa ferramenta do endereço http://www.arabidopsis.org que simula clivagens com várias enzimas. Sendo assim, a enzima escolhida foi BamH I que mantém intacta a região contendo os três *APUM* (caso o laboratório fosse clonar os outros genes), situada antes do primeiro sítio na porção até 50000 pb da Figura 10, eliminando ao máximo as outras seqüências desnecessárias. A Figura 10 ilustra as digestão do F16P2 com BamH I e também com Mlu I, esta última utilizada para separar os três genes como explicado a seguir.

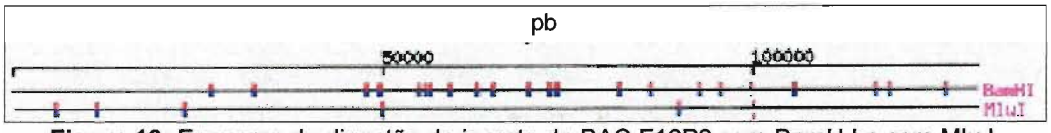



**Figura 10:** Esquema da digestão do inserto do BAC F16P2 com BamH I e com Mlu I.

Após a clivagem com BamH I, o vetor foi diretamente ligado com T4 DNA ligase, sem purificação prévia, em condições bastante diluídas para facilitar a auto-ligação sem interferência dos demais fragmentos gerados.

Outro problema a ser contornado foi a alta taxa de identidade entre os três genes, que impossibilitou desenhar oligonucleotídeos específicos para cada um dos genes *APUM*. Sendo assim, a seqüência do novo BAC foi analisada pelo programa GENE RUNNER para a determinação de enzimas de restrição que separasse o promotor e o gene de *APUM-2* dos demais e, a

escolhida foi a Mlu I (Figura 10). A digestão gera três bandas com 19426, 11967 e 5633 pares de bases e as reações de PCR a seguir foram feitas com o fragmento de 11967 pares de bases que contém as seqüências reguladoras e o gene *APUM-2*.

**(B) Construção dos repórteres:**

Os dois repórteres foram construídos com a região promotora de *APUM-2*, amplificada a partir do fragmento de 11967 (descrito acima) por reação de PCR, em seguida ligada ao cDNA dos repórteres GUS (β-Glicuronidase) e GFP (Proteína Verde Fluorescente), seguidos do terminador NOS da enzima Nopalina Sintase de *Agrobacterium*. Foi considerado como promotor os 2050 pares de bases anteriores ao ATG inicial.

Foi utilizado o gene GUS porque mesmo sendo expresso em baixas quantidades é possível observar quebra de substrato e formação de cor azul, entretanto, é necessário sacrificar o vegetal. Já a GFP foi utilizada devido à possibilidade da expressão ser observada *in vivo* através da inscidência de luz com comprimento entre 396 e 475nm sobre o tecido e detecção da fluorescência em até 508nm. Mas a GFP precisa ser produzida em grande quantidade para ser detectada (DAVIS & VIERSTRA, 1996).

Todas as construções foram feitas no vetor binário (definido mais adiante) pBINPLUS (VAN ENGELENS et al., 1995), na região do T-DNA, mostrado na Figura 11(A). O repórter GUS mais o terminador NOS foram extraídos por digestão do vetor pBI221 (Clontech) e ligados nos sítios de BamH I e EcoR I do pBINPLUS. O promotor de *APUM-2* foi amplificado utilizando oligonucleotídeos desenhados, com o auxílio do programa GENE RUNNER e identificados na Tabela 1, com sítios de BamH I e Sal I nas pontas para a posterior ligação à construção final, ilustrada na Figura 11(B).

O repórter com GFP, mostrado na Figura 11(C), foi construído da mesma maneira utilizando as mesmas enzimas de restrição e estratégia de

clonagem. Entretanto, o cDNA deste repórter mais o terminador NOS foram extraídos do vetor p35S-GFP da Clontech.

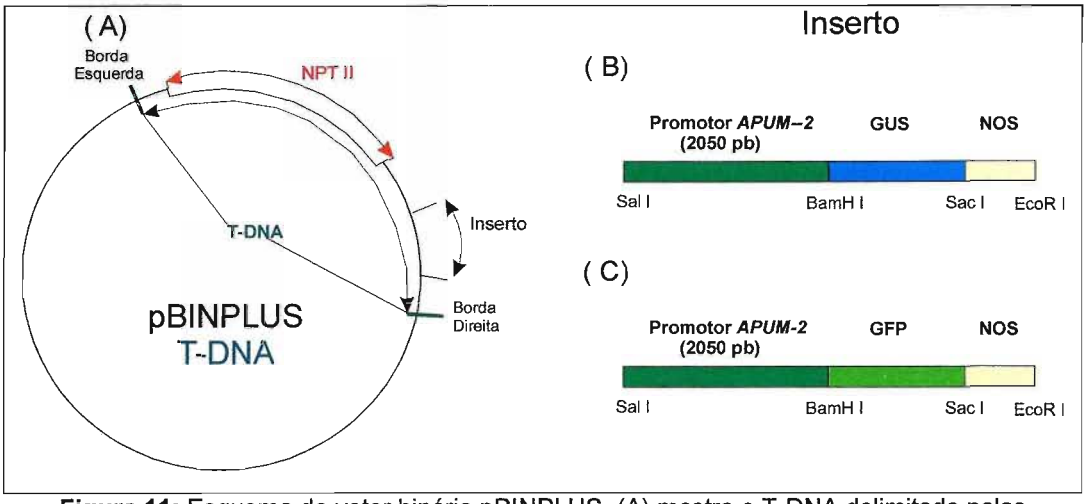



**Figura 11:** Esquema do vetor binário pBINPLUS. (A) mostra o T-DNA delimitado pelas bordas direita e esquerda. (B) e (C) correspondem às construções repórteres com o cDNA de GUS e com o de GFP, respectivamente, clonadas no sítio de restrição do vetor.

Em dicotiledôneas, o cDNA da GFP sofre um "splicing" aberrante e parte da seqüência que codifica o cromóforo responsável pela fluorescência é perdida, gerando uma proteína insolúvel que não fluoresce. O vetor utilizado (p35S-GFP) contém uma mutação pontual no sítio que é reconhecido com região de "splicing", reduzindo o risco da produção de GFP inativa (DAVIS & VIERSTRA, 1996).

Após as clonagens, os vetores finais foram seqüenciados para garantir que não ocorreu nenhuma mutação durante a amplificação e verificar a orientação dos fragmentos. Para as reações de PCR, foram desenhados outros oligonucleotídeos, com o programa GENE RUNNER, que se alinham na seqüência promotora a cada 350 pares de bases, mostrados na Tabela 2.

As seqüências de cada construção foram comparadas com a do BAC F16P2 (gi: 6598426 do GenBank) através da ferramenta BLAST do site http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Ambos os repórteres apresentaram seqüências idênticas às do banco de dados e, portanto, prontos para serem transformados nas plantas.

**(C) Genética reversa:**

A análise da função de *APUM-2* também foi realizada por genética reversa, ou seja, foram feitas duas construções: um que expressa a proteína APUM-2 de forma constitutiva e o outro que interfere com a expressão dela na planta (RNA antisense).

Para a obtenção da construção de expressão constitutiva, foi utilizado o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), que mantém uma taxa de transcrição alta em quase todos os tecidos (NAGY & CHUA, 1985), associado ao gene estrutural de *APUM-2* (fragmento genômico contendo exons e íntrons) com 4009 pares de bases (Tabela 3).

O mapa de restrição de *APUM-2* mostrou que não existem sítios para as enzimas BamH I e Sac I e, portanto, foi decidido transferir todo o inserto do pBI221 (35S::GUS::NOS) para o pBINPLUS e em seguida substituir o gene GUS pelo produto de PCR de *APUM-2*. Os oligonucleotídeos para a amplificação também foram desenhados com esses sítios de restrição nas pontas e com o auxílio do programa GENE RUNNER, mostrados na Tabela 1.

O gene *APUM-2* no vetor final, esquematizado na Figura 13(B), foi seqüenciado para garantir a inexistência de mutações e verificar a orientação do fragmento. As reações de PCR foram feitas com os oligonucleotídeos também desenhados com o programa GENE RUNNER mostrados na Tabela 2, que se alinham na região estrutural a cada 350 pares de bases.

As seqüências obtidas foram comparadas da mesma forma que para a construção anterior e não apresentaram mutações.

A segunda construção para os ensaios de genética reversa, a que irá interferir com a expressão de *APUM-2*, foi gerada a partir da ligação do promotor 35S a uma seqüência antisense de parte da região estrutural mais o terminador NOS, mostrada na Figura 13(C). Os três genes *APUM* do cromossomo II tem alto grau de homologia, como relatado na seção IV.I, e isso pode indicar que todos exerçam a mesma função no vegetal. Sendo

assim, para garantir que esta construção desenvolvesse algum fenótipo observável nas plantas transformadas, a seqüência antisense foi feita com o exon 1 de *APUM-2* que possui identidade elevada com os outros dois genes, apresentada na Figura 12, de forma a interferir na expressão de todos.

```
APUM-1 ATGATACCGGAACTAGGGAGAAGACCGATGCATAGAGGTAACGAAGATTCATCTTTTGGGGATGATTATGAGAAAGAG
APUM-3 ATGATACCGGAACTAGGGAGAAGACCGATGCATAGAGGTAACGAAGATTCATCTTTTGGGGATGATTACGAGAAAGAG
APUM-2 ATGATACCGGAACTGGGGAGAAGACCGATGCATAGAGGGAACGAAGATTCATCTTTTGGGGATGATTATGAGAAAGAG
       **************.********************** ****************************.*********

APUM-1 ATTGGAGTATTGCTTGGTGAGCAGCAGAGAAGGCAAGTAGAAGCTGATGAGCTTGAGAGAGAGCTTAACTTGTTTAGA
APUM-3 ATTGGAGTATTGCTTGGTGAGCAGCAGAGAAGGCAAGTAGAGGCGGATGAGCTTGAGAGAGAGCTTAACTTGTATAGA
APUM-2 ATTGGAGTATTACTTGGTGAGCAGCAGAGAAGGCAAGTAGAAGCTGATGAGCTTGAGAGAGAGCTTAATTTGTATAGG
       ***********.****************************.**.***********************.****.***.

APUM-1 AGTGGCTCTGCTCCACCGACTGTTGATGGTTCTGTTAGTGCTGCCGGAGGGCTTTTTAGCGGCGGAGGTGGGGCTCCT
APUM-3 AGTGGCTCTGCTCCACCGACTGTTGATGGTTCTCTTAGTGCTGCCGGAGGGCTTTTTAGCGGCGGAGGTGGGGCTTCT
APUM-2 AGTGGCTCTGCTCCACCGACTGTTGATGGTTCTGTTAGTGCTGCTGGAGGGCTTTTTAGCGGCGGAGGTGGGGCTCCT
       *********************************.**********.******************************.**

APUM-1 TTTTTG GAGTTTGGTGGTGTTAATAAGGGTAATGGGTTTGGTGGTGATGATGAGGAGTTTAGGAAAGATCCGGCTTA
APUM-3 TTTCTG GAATTTGGTGGAGTTAATAAGGGTAATGGGTTTGGTGGTGATGATGAGGAGTTTAGGAAAGATCCAGCTTA
APUM-2 TTTTTG GAGTTTGGTGGAGGCAACAAGGGTAATGGGTTTGGTGGCGATGATGAGGAGTTTAGGAAAGATCCGGCTTA
       ****.****.********:*..**.********************.**************************.*****

APUM-1 CTTGTCTTATTACTATGCTAATATGAAGTTGAATCCGAGGTTGCCACCGCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGT
APUM-3 CTTGTCTTATTACTATGCTAATATGAAGTTGAATCCGAGGTTGCCACCTCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGT
APUM-2 CTTGTCTTATTACTATGCTAATATGAAGTTGAATCCGAGGTTGCCACCGCCTTTGATGTCTAGGGAGGATTTGAGGGT
      ************************************************.****************************

APUM-1 GCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAATAATGTGTTTAGGTGGTGTTGGGGATAGGAGAAAAGTTAATGATAATCGATCTTT
APUM-3 TGCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAATAATGTGTTAGGTGGTGTTGGGGATAGGAGAAAAGTGAATGACAGTCGGTCTTT
APUM-2 TGCTCAGAGGCTTAAAGGGAGTAGTAATGTTTTAGGTGGTGTTGGGGATAGGAGGAAAGTTAATGATAGTCAATCTTT
       ***********************.******.***********************.*****.*****.*.**..*****

APUM-1 GTTCTCTATGCCA CCGGGTTTT------------------------GAAGGTGAGAAAACTGGTGCTTCTGCTTCTG
APUM-3 GTTCTCTATGCCA CCTGGTTTT------------------------GAGGCTGGAAAACCTGGTGCTTCTGCTTCTG
APUM-2 ATTCTCTATGCCA CCTGGTTTTGATCAGAGGAAGCAGCATGAGTTTGAGGTTGAGAAAACTAGTGCTTCTTCTTCTG
       .************ **.******                        **.*.**..***.**.********.******

APUM-1 AATGGGATGCTAATGGATTGATTGGTTTACCGGGTTTGGGACTTGGAGGCAAGCAGA-GAGTTTTGCTGATATCTTTC
APUM-3 AGTGGGATGCTAATGGATTGATTG---------GTTTGGGACTTGGAGGCAAGCAGAAGAGTTTTGCTGATATCTTTC
APUM-2 AATGGGATGCTAATGGATTGATCGGTTTGCCGGGTTTGGGGATTGGAGGCAAGCAGAAGAGTTTTGCTGATATCTTTC
       *.******************** *         *******..***************.********************

                                   APUM-1 AG
                                   APUM-3 AG
                                   APUM-2 AG
                                          **
```

**Figura 12:** Alinhamento dos primeiros exons de *APUM*-1, 2 e 3 utilizando o programa ClustaW.

Semelhante à construção para a expressão constitutiva, o gene antisense foi amplificado com os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 1 e ligado ao pBINPLUS, com o inserto de pBI221 (35S::GUS::NOS), na posição do gene GUS. O produto deste PCR também foi utilizado para fazer as sondas radioativas na hibridização do Northern e Southern blots.

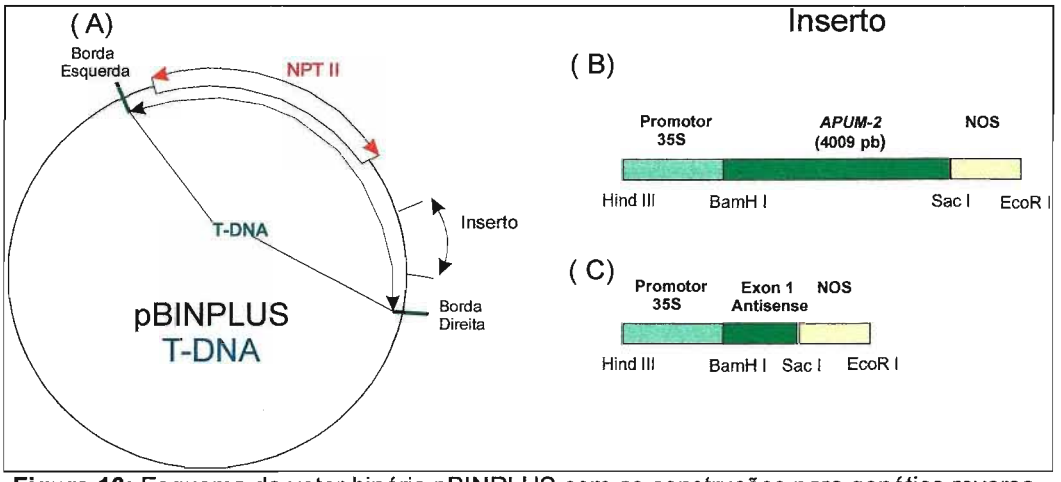



**Figura 13:** Esquema do vetor binário pBINPLUS com as construções para genética reversa. (A) mostra o T-DNA delimitado pelas bordas direita e esquerda. (B) corresponde à construção para expressão constitutiva e (C) para reprimir *APUM-2*.

A construção obtida foi seqüenciada, aproveitando os oligos utilizados para a amplificação (Tabela 1) mais o de número 2 utilizado para a confirmação do vetor constitutivo (Tabela 2), e a orientação e seqüência estavam corretas.

## IV.IV - Obtenção das Plantas Transgênicas:

### (A) Transformação vegetal:

A infecção de plantas por *Agrobacterium* é o único exemplo natural de troca genética entre os reinos procarioto e eucarioto e é um método largamente utilizado para a obtenção de plantas transgênicas. Este processo tem eficiência e estabilidade suficientemente altas permitindo que grandes coleções de insertos independentes sejam geradas rapidamente (SPRINGER, 2000).

No processo de infecção, a *Agrobacterium tumefaciens* transfere um segmento de DNA, o T-DNA do plasmídeo Ti (indutor de tumor), para a célula vegetal e é integrado de forma estável no DNA genômico da planta. O plasmídeo Ti contém genes para a expressão da maioria dos produtos requeridos no processo de transformação, entre eles genes de virulência

(*VIR*), de fitormônios que causam o crescimento neoplásico e de enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos específicos chamados *opinas* (CANGELOSI, et al., 1991).

O sistema de transformação que foi empregado é mediado por dois plasmídeos compatíveis (sistema binário), o auxiliar contendo apenas os genes *VIR* essenciais para a infecção, e outro carregando o T-DNA com o inserto desejado (neste trabalho o pBINPLUS). A cepa utilizada, a LBA4404, contém o plasmídeo auxiliar pAL4404 com resistência à estreptomicina. O uso de dois vetores facilita o processo devido à diminuição do tamanho do vetor e da possibilidade de manipular o DNA em *Escherichia coli* antes de ser introduzido em *Agrobacterium* (HOEKEMA, et al., 1983).

O pBINPLUS foi transformado em *Agrobacterium* por eletroporação e o protocolo utilizado foi montado de acordo com as vantagens descritas nos métodos da literatura. A principal diferença entre a eletroporação em *E. coli* e em *Agrobacterium* são os meios de cultura utilizados após a transformação e para o plaqueamento. Para *Agrobacterium*, a literatura recomenda o uso de manitol, uma vez que este reagente diminui a agregação entre as células.

A infecção das plantas por *Agrobacterium* também foi baseada em diversos protocolos disponíveis nos endereços http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis e http://informa.bio.caltech.edu. Foi decidido cortar os ramos primários para induzir o crescimento de novos ramos e utilizar o tecido lesado como via de entrada (com o auxílio do tensoativo Silwet L-77) para as bactérias. Inicialmente, tinha-se a idéia de transformar pelo método de infiltração à vácuo (BECHTOLD et al., 1993), mas segundo os protocolos utilizados, o sucesso da infecção depende principalmente da saúde das plantas.

Foram obtidas muitas sementes das quatro plantas infectadas para cada construção sendo em seguida selecionadas em meio MS sólido contendo kanamicina. O total de plantas transformadas para cada vetor inserido está identificado na Tabela 8.

**Tabela 8:** Número de transformantes obtidos para cada construção.

| Construção | Transformantes obtidos | Transformantes que não produziram sementes |
|---|---|---|
| Repórter GUS | 4 | 0 |
| Repórter GFP | 11 | 1 |
| 35S::*APUM-2*::NOS | 9 | 2 |
| 35S::Antisense2::NOS | 0 | 0 |

Essas plantas cresceram para produzir sementes e gerar novos descendentes com os quais foram efetuados experimentos de southern blot, para determinar o número de insertos e a independência nos eventos de inserção, bem como Northern blots, ensaios enzimáticos e reações de PCR e RT-PCR.

**(B) Análise das plantas transformadas com o repórter GUS:**

As sementes extraídas dos primeiros transformantes foram plaqueadas em meio MS com o antibiótico kanamicina. Antes de efetuar o tratamento das plantas obtidas com o substrato X-Glu, o DNA de três representantes de cada transformante foi extraído e digerido com as enzimas BamH I e EcoR I para análise de Southern blot, utilizando como sonda marcada o produto da amplificação do cDNA de GUS. Como controle foi utilizado o DNA de uma planta selvagem.

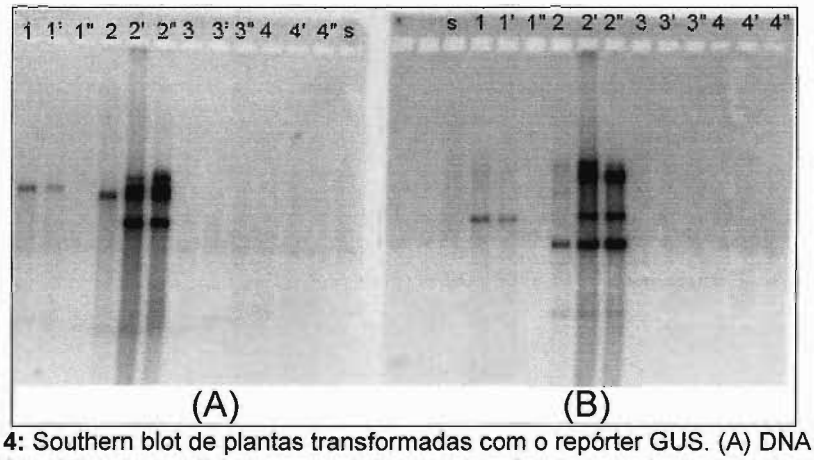



**Figura 14:** Southern blot de plantas transformadas com o repórter GUS. (A) DNA cortado com BamH I e (B) com EcoR I. A nomenclatura n, n' e n" correspondem a três descendentes distintos da planta n e s corresponde à planta tipo selvagem.

O Southern blot da Figura 14 mostra que os descendentes do terceiro e do quarto transformantes não apresentaram bandas marcadas, o que significa que o inserto por algum motivo não foi incorporado ao genoma vegetal. Entretanto, essas plantas e seus decendentes não são sensíveis à kanamicina, indicando a ocorrência de alguma anormalidade no processo de inserção que danificou apenas a construção repórter sem afetar o gene que codifica a enzima de resistência, a NPT II (nopalina fosfotransferase II). A planta 1" não apresentou banda no Southern devido à baixa quantidade de material para efetuar este tipo de ensaio.

O primeiro e o segundo transformantes contém o gene GUS e as bandas obtidas para cada planta estão em fragmentos de tamanhos distintos, podendo-se concluir que foram gerados por eventos independendes e que a planta 1 contém apenas um inserto e 2 tem ao menos quatro.

A confirmação da ausência da construção repórter no genoma das plantas transformadas foi feita por reações de PCR a partir do DNA genômico de uma planta de cada, onde a construção total foi amplificada (promotor de *APUM-2* com 2050 pb e cDNA de GUS com 1050 pb, totalizando 3100 pb). Neste experimento, mostrado na Figura 15, as plantas três e quatro também não acusaram a existência da construção:

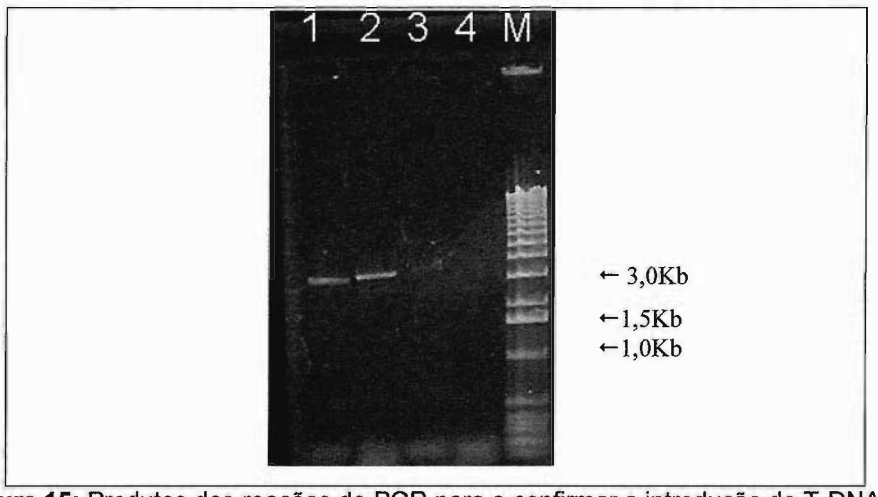



**Figura 15:** Produtos das reações de PCR para a confirmar a introdução do T-DNA. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem a cada uma das representantes e M ao marcador de peso molecular de 1Kb Ladder da GIBCO.

Alguns representantes das quatro transgênicas, em estágios diferentes do desenvolvimento, desde a abertura dos cotilédones até a formação das vagens, foram utilizados em ensaios enzimáticos com o substrato X-Glu, sendo que, apenas as descendentes de 1 e 2 apresentaram expressão da enzima β-Glicuronidase, o que era esperado, e nas mesmas posições. Como controle foram utilizadas plantas selvagens com a mesma faixa etária que os transformantes e não apresentaram atividade enzimática. Todas as figuras mostradas abaixo são descendentes da planta 1.

Após a abertura dos cotilédones, pôde-se observar um pequeno ponto azul no meristema apical e na região interna da raiz, ilustrado na Figura 16. A medida que a planta se desenvolveu, os meristemas laterais também apresentaram expressão da enzima podendo ser observados na Figura 17.

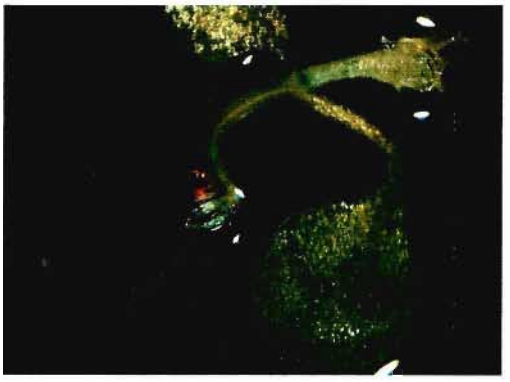


**Figura 16:** Expressão de GUS em planta com uma semana.

**Figura 17:** Expressão de GUS em planta com vinte dias.

A Figura 18 é uma ampliação da Figura 17, dando importância aos meristemas, sendo que, o apical é o maior ao centro. Também pode ser visto mais um ponto azul, que corresponde ao meristema lateral que dará origem a novos órgãos (ramos ou folhas). Para ilustrar melhor os meristemas laterais, é interessante observar a Figura 19: há dois pontos azuis cada um saindo por cima de uma folha.

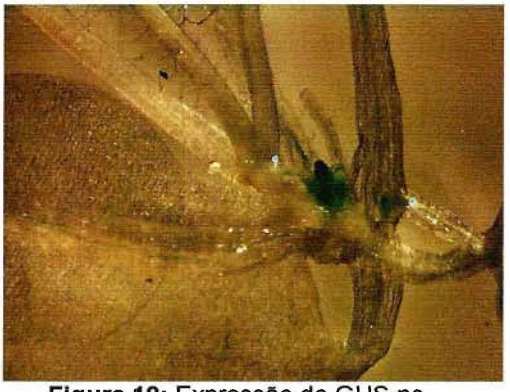


**Figura 18:** Expressão de GUS no meritemas apical e laterais.

**Figura 19:** Expressão de GUS nos meristemas laterais.

Nas plantas jovens (sem raízes secundárias), como a da Figura 16, a expressão da enzima nas raízes é observada apenas na porção central, zona de diferenciação celular. A análise de uma planta mais velha, como a da Figura 17, mostra a presença da cor azul também nas raízes secundárias e nos pontos que contém os meristemas. Pode-se visualizar, nas Figuras 20, 21 e 22, que nas pontas das raízes a coloração azul é mais intensa indicando que nesta zona (região com alta taxa de mitose) a expressão de *APUM-2* deve ser mais acentuada.

**Figura 20:** Raízes de planta adulta expressando GUS.

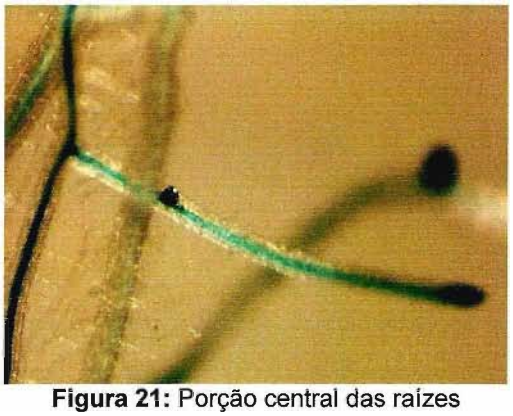


**Figura 21:** Porção central das raízes expressando GUS.

**Figura 22:** Expressão de GUS em raiz secundária emergindo.

Também foram analisadas plantas com flores e com frutos. É possivel ver na Figura 23 dois pequenos pontos azuis nas axilas das folhas próximos ao botão menor que serão responsáveis pela origem de duas novas inflorescências. A Figura 24 ilustra melhor este fato, pois pode-se visualizar três botões jovens sem manchas azuis e um quarto azulado que ainda não desenvolveu as estruturas florais.

**Figura 23:** Expressão de GUS nas flores em formação.

**Figura 24:** Flor em desenvolvimento expressando o repórter GUS.

Depois de desenvolvidas, as flores aparentemente não apresentaram mais marcações azuis. Sendo assim,a partir das Figuras 23 e 24, pode-se dizer que a expressão de *APUM-2* nas flores ocorre antes do processo de diferenciação de suas estruturas.

Os frutos também foram observados e não apresentaram manchas azuis em nenhum momento do seu desenvolvimento, indicando que neste tipo de tecido não ocorre a expressão de *APUM-2*.

**(C) Análise das plantas transformadas com o repórter GFP:**

Foram obtidas 11 plantas com resistência à kanamicina. Da mesma forma que com o repórter GUS, as sementes destes representantes foram plaqueadas a fim de se preservar os indivíduos para futuras análises. Os descendentes de uma das plantas transgênicas contendo GFP eram estéreis.

O DNA genômico de descendentes de cada transformante foi extraído e digerido com a enzima EcoR I para posterior ensaio de Southern blot, utilizando como sonda marcada o gene GFP, como o descrito para GUS.

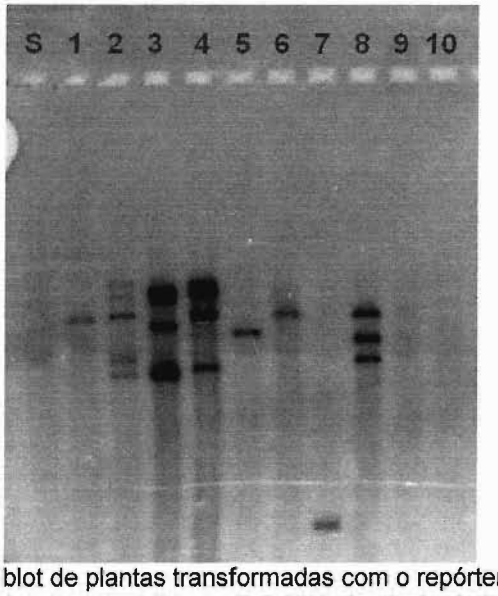



**Figura 25:** Southern blot de plantas transformadas com o repórter GFP. Os números correspondem às plantas obtidas e S é DNA de planta do tipo selvagem.

A Figura 25 mostra que todas as transgênicas apresentam no mínimo um inserto e que cada uma foi gerada por eventos independentes de inserção, pois as bandas marcadas para cada planta estão em fragmentos de

tamanhos distintos. As plantas de número 9 e 10 por ter pouco material, não mostraram marcações fortes.

Um representante com apenas uma inserção, a planta 7 da Figura 25, foi observado num microscópio Confocal Laser Scanning Fluorescence. Essa planta foi analisada quando bem jovem, após a abertuda dos cotilédones (cinco dias de crescimento num regime de luz 18h/6h), devido à maior transparência. A observação de outras faixas etárias deve ser realizada através de cortes histológicos, devido à baixa taxa de expressão da GFP.

Da mesma forma que as plantas transformadas com o repórter GUS, as com GFP foram comparadas com plantas selvagens (controle), e foi possível observar o mesmo padrão do repórter GUS: expressão no meristema apical e na porção interna da raiz (devido à idade, a planta não tinha desenvolvido raízes secundárias), mostradas nas Figuras 26 e 27 respectivamente.

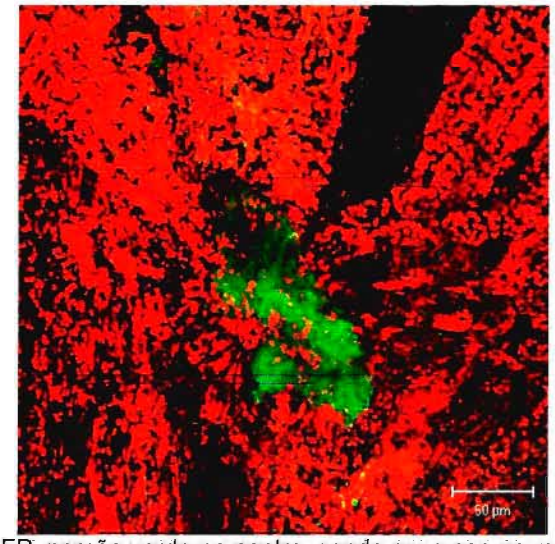
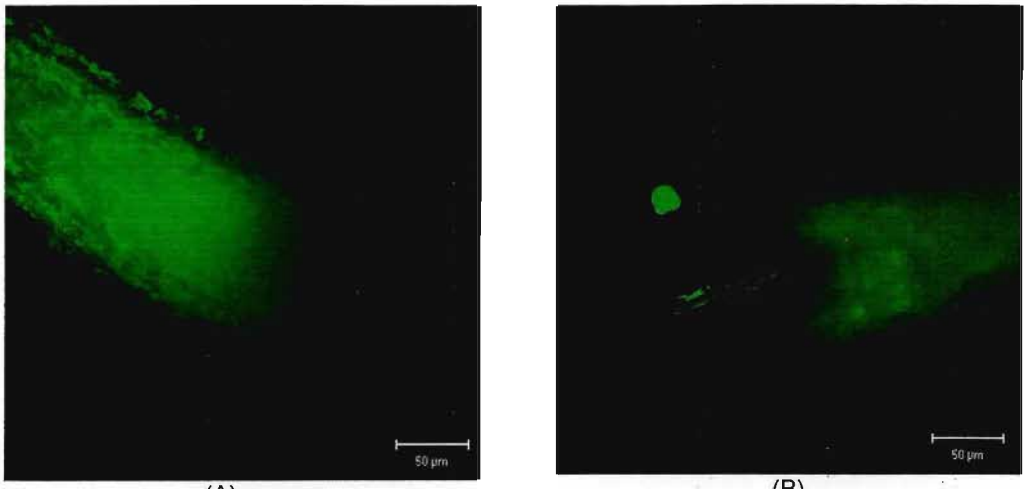



**Figura 26:** Imagem da GFP, porção verde no centro, sendo expressa no meristema apical. A clorofila emite fluorescência na região do vermelho ao ser excitada com luz UV.




(A) (B)

**Figura 27:** Expressão de GFP nas raízes. (A) mostra a porção interna da raiz e (B) a ponta da raiz, sendo que a esfera verde encima é uma bolha de ar

A Figura 27 ilustra dois ângulos da ponta da raiz e pode-se observar fluorescência a uma certa distância da columela. Devido à baixa expressão de GFP e baixa resolução da imagem, não foi possível identificar precisamente as regiões que expressam o repórter. Para este nível de detecção é necessário fazer cortes histológicos e/ou estudos de imunolocalização da proteína GFP.

A confirmação da expressão de GFP foi feita por Western blot. Assim, a Figura 28 mostra que a planta transformada número 8 tem uma banda marcada de 28 KDa (massa molecular da GFP), o que indica a expressão desta proteína.

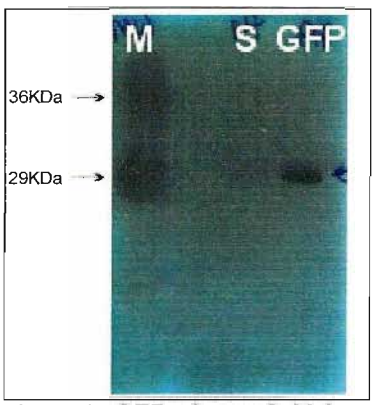



**Figura 28:** Western blot da planta de GFP número 8. M é o marcador de peso molecular (SIGMA), S é material da planta selvagem e GFP da planta transformada número 7.

O repórter GFP é menos sensível à detecção em relação ao de GUS sendo necessária uma quantidade razoável de proteína para poder ser observado e, além disso, a planta apresenta auto-fluorescência. Desta forma, GFP não é um bom repórter para este caso e neste trabalho foi decidido estudar melhor as plantas transformadas com GUS e, portanto, as outras transgênicas com a construção de GFP não foram analisadas.

**(D) Genetica Reversa - expressão constitutiva:**

As plantas transformadas com o vetor de expressão constitutiva, que contém o transgene 35S::*APUM-2*::NOS, foram selecionadas com kanamicina sendo que 9 mostraram resistência ao antibiótico, mas duas delas eram estéreis. Algumas das representantes destas transgênicas apresentaram fenótipos diferentes como grande produção de ramos, folhas e raízes, cada uma em grau diferente. O DNA genômico das representantes com fenótipos aparentemente diferenciados de cada uma das 7 plantas foi extraído e digerido com a enzima de restrição Hind III para posterior ensaio de Southern blot. A sonda marcada utilizada contém a seqüência do exon 1 de *APUM-2*. Neste caso, como o DNA genômico apresenta três cópias naturais dos gene *APUM*, devem ser desconsideradas as bandas de 9375, 6250 e 3593 pares de bases onde se encontram os genes originais de *Arabidopsis* (observar o controle com o tipo selvagem).

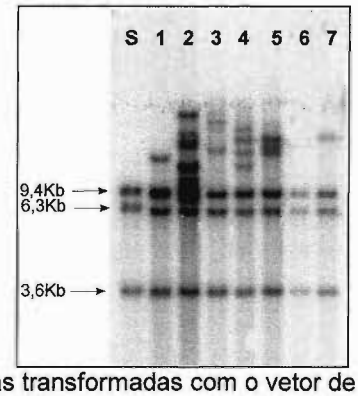



**Figura 29:** Southern blot de plantas transformadas com o vetor de expressão constitutiva. Os números indicam cada planta obtida e S indica planta do tipo selvagem.

O resultado do Southern blot, mostrado na Figura 29, mostra que todas as plantas foram geradas por eventos de inserção independentes. Todas apresentaram fenótipos distintos quando comparadas com a selvagem, sendo que umas em maior grau. Os representantes com fenótipo mais acentuado foram as de número 2 e 6, com três a quatro e uma inserções, respectivamente. A observação do número de insertos presentes em cada uma delas em relação ao fenótipo desenvolvido mostra que não há relação entre o número de cópias e a taxa de expressão. Isto é um resultado típico, já que a posição do inserto no genoma também pode influenciar na transcrição do transgene.

Para observar a quantidade de mensageiros de *APUM-2* produzidos por cada planta, foi efetuado um Northern blot. Neste ensaio também foi utilizada o exon 1 de *APUM-2* como sonda. O controle quantitativo desta preparação de RNAs foi feito utilizando a amplificação do gene da proto-clorofilil redutase, POR, como sonda numa hibridização consecutiva. A Figura 30 representa os dois Northerns obtidos.

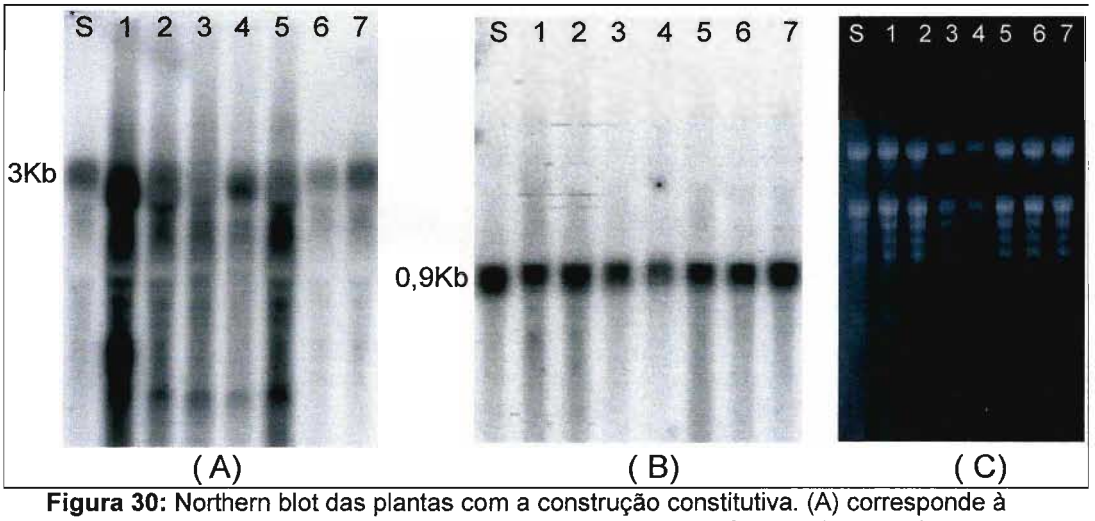



**Figura 30:** Northern blot das plantas com a construção constitutiva. (A) corresponde à membrana marcada com o exon1 e (B) marcada com a amplificação do gene da proto-clorofilil redutase. A figura (C) mostra o gel antes da transferência para a membrana.

Observando a Figura 30(A) pode-se perceber que nenhuma superexpressa *APUM-2*, quando comparadas com o tipo selvagem, entretanto foram obtidas algumas plantas com fenótipos.

A planta 2 e 6 se desenvolveram de forma mais diferenciada apresentando ausência de dominância apical, ou seja, o vegetal produziu vários caules simultaneamente ao invés de um principal resultando numa maior quantidade de ramos, folhas e raízes. As folhas tinham o limbo mais largo do que o tipo selvagem, principalmente na região do pecíolo. Quando mais jovem (como a da Figura 31) apresentam na região central o desenvolvimento de várias gemas ao mesmo tempo. O acompanhamento do desenvolvimento dessas plantas mostrou que nenhuma tinha dominância apical (Figura 32). Além disso, todas desenvolveram um número de raízes secundárias maior do que as do tipo selvagem.

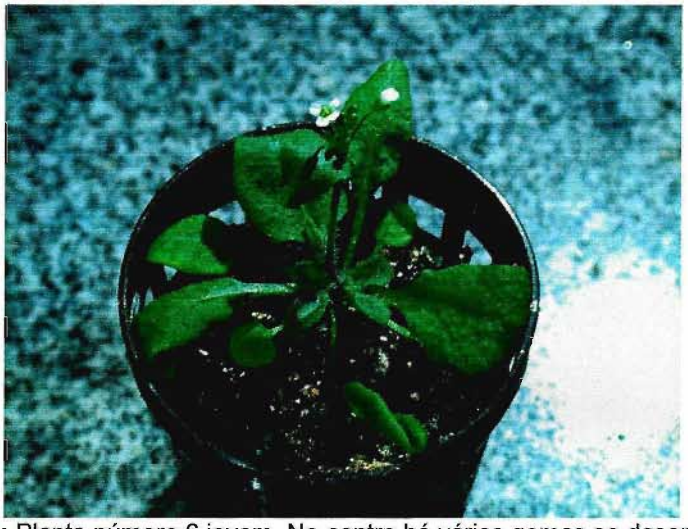
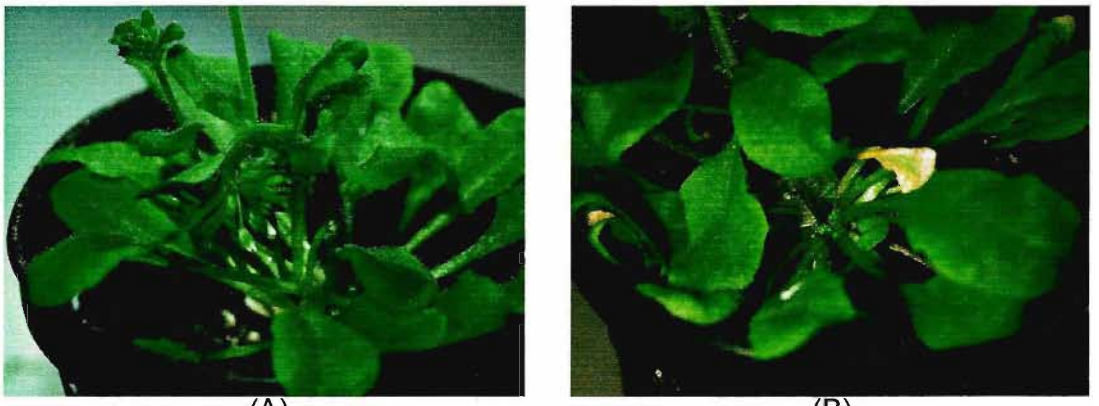


**Figura 31:** Planta número 6 jovem. No centro há várias gemas se desenvolvendo ao mesmo tempo.



(A) (B)

**Figura 32:** Planta número 6 com expressão constitutiva de *APUM-2* . Em (A) pode-se observar o desenvolvimento de vários caules e folhas de forma desorganizada (sem dominância apical). Um detalhe da base da roseta é mostrado em (B), onde pode-se visualizar múltiplos meristemas axilares em desenvolvimento.

Outro fator interessante, na planta 6, foi a inflorescência que manteve a filotaxia original em espiral mas com espaçamentos entre as flores muito menor de forma a produzir um buquê (Figura 33). Além disso, apresentou desenvolvimento retardado, após o desenvolvimento de vários botões na planta selvagem é que a planta 6 começou a desenvolver seu primeiro botão, com aproximadamente duas semanas de defasagem.

**Figura 33:** Detalhe das flores da planta com expressão constitutiva de *APUM-2*.

Já as plantas descendentes da número 2 tiveram desenvolvimento floral normal, entretanto, com menor produção de sementes. Com relação ao seu desenvolvimento, não apresentou defasagem quando comparado com a do tipo selvagem.

As demais plantas apresentaram fenótipo intermédiário, umas com grande quantidade de ramos, ou com folhas grandes, com grande quantidade de raízes secundárias.

É importante destacar que os fenótipos observados, por algum motivo, não se perpetuaram na segunda geração.

**(E) Genetica Reversa - expressão reprimida:**

Plantas selvagens foram transformadas com o vetor contendo o transgene para a repressão dos genes *APUM* e nenhum transformante foi obtido. Como dito anteriormente, os três genes têm grande homologia e talvez exerçam função redundante, sendo assim, foi utilizada a seqüência antisense do exon 1 de *APUM-2* que reprime a tradução de todos.

Durante a seleção, duas classes de plântulas foram observadas: umas que viveram até uma semana depois da semeadura, enquanto que outras viveram uma semana a mais (duas semanas no total). Isto pode indicar que algum destes dois tipos de plantas corresponde aos vegetais sensíveis (não contendo o transgene) e a repressão de todos os genes *APUM* ao mesmo tempo resulte na inviabilidade dos indivíduos. Sendo assim, é importante utilizar outras estratégias para reprimir expressão dos genes *APUM*, como por exemplo vetores de expressão induzível.

# V - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

## V.I - LOCALIZAÇÃO DE *APUM-2*:

Na introdução, foi ressaltado que homólogos à proteína PUMILIO podem ser encontrados em vários organismos filogeneticamente distantes apresentando um papel fundamental na regulação da tradução de mensageiros alvo em processos de desenvolvimento. Em vários organismos, suas funções já foram parcialmente estudadas, entretanto, em *Arabidopsis thaliana* esta permanece desconhecida.

Sendo assim, este trabalho faz uma análise inicial da estrutura e função dos genes *APUM*, descobertos após o projeto de seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana* (THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE, 1999 e 2000).

Observando os alinhamentos entre as regiões estruturais dos três genes encontrados no cromossomo II (em anexo), pode-se dizer que a taxa de identidade entre eles é muito alta. Como em plantas é muito comum a observação de grandes blocos de duplicações no DNA genômico, e levando em consideração a distância física entre eles (talvez um evento recente), pode-se especular que todos efetuam o mesmo papel, mesmo que apresentem padrões de transcrição distintos: a tradução pode ocorrer em situações diferentes mas a proteína pode exercer o mesmo papel. Partindo desta suposição, utilizamos a seqüência de apenas um deles para os estudos preliminares e todas as construções deste trabalho foram feitas com *APUM-2*, isto porque apresenta posição física intermediária entre eles e tem maior região estrutural e de cDNA.

A princípio, foram extraídas amostras de RNA das várias estruturas da planta e ensaios de Northern blot e RT-PCR foram efetuados a fim de se rastrear os tecidos que expressam os genes *APUM*. A Figura 7(A) apresenta o resultado do Northern blot, utilizando como sonda o exon 1 de *APUM-2* que

deve identificar mensageiros dos três *APUM*, e pôde-se observar que esses RNAs foram detectados em todos os tecidos.

Como as bandas marcadas no Northern poderiam pertencer a qualquer um dos genes *APUM*, a identificação de cada tipo de mensageiro foi feita por RT-PCR. Na reação de PCR utilizou-se oligonucleotídeos que amplificavam fragmentos de cada gene com tamanhos diferentes (ver seção dos resultados). Assim, a Figura 9 mostra a amplificação de várias bandas em todos os tecidos estudados e os fragmentos correspondentes aos mensageiros de *APUM* são as três ultimas. Podemos encontrar *APUM-2* (terceira banda debaixo para cima) em todos os tecidos. Além disso, é curioso notar que *APUM-3* (última banda) também está presente em todas as estruturas menos em frutos, e *APUM-1* (segunda banda debaixo para cima) não foi detectado em caule, folhas e frutos estando presente na raiz e nas flores com menor representatividade em relação a *APUM-2*.

Os resultados indicam que cada um dos genes *APUM* é transcrito de forma distinta, o que diminui, ao menos parcialmente, a possibilidade de ocorrer redundância completa. Nos tecidos em que dois ou três dos genes são transcritos ao mesmo tempo, pode ocorrer algum nível de redundância parcial mas, ao menos em frutos, o gene *APUM-2* parece ser o único a ser expresso.

O RT-PCR, da mesma forma que o Northern blot, apresentou mais bandas do que o esperado. Parte destes fragmentos são amplificações provenientes da contaminação com DNA genômico, mas as demais podem indicar que este mensageiro deve sofrer algum tipo de processamento e/ou degradação. Além disso, no PCR os fragmentos maiores do que o esperado podem ter sido gerados por amplificações *in tandem*.

A segunda etapa do trabalho foi o rastreamento da atividade do promotor de *APUM-2* através de sistemas repórteres GUS e GFP. Estes foram efetuados utilizando como promotor os 2050 pares de bases anteriores

ao ATG inicial de *APUM-2*. Assim, supomos que com esta seqüência, toda a região a montante do início de transcrição e tradução estejam presentes para influenciar na expressão dos genes repórteres.

Foram obtidas quatro plantas transgênicas com o repórter GUS mas duas delas mostraram que os eventos de inserção que as geraram, de alguma forma inutilizou a construção repórter. As outras duas continham entre 1 e 3 insertos no genoma e mostraram reação positiva, no contato com o substrato X-Glu, nas mesmas posições e período de tempo (Figuras 14 e 15).

Visando a observação da expressão de *APUM-2* no vegetal *in vivo*, foram feitas construções repórteres com GFP. Foram obtidas várias plantas transgênicas sendo que algumas apresentaram mais de uma inserção e outra se mostrou estéril (talvez múltiplas inserções e/ou ruptura de algum(ns) gene(s) importante(s) para a reprodução). A exposição ao UV de uma das plantas (contendo um inserto) mostrou que a quantidade de GFP sintetizada pela planta era deficiente para ser detectada devido a grande auto-fluorescência do vegetal. A análise num microscópio Confocal só foi possível quando a planta era muito jovem (após a abertura dos cotilédones) devido à maior transparência, caso contrário seria necessário fazer cortes o que fugia do objetivo principal que era a observação *in vivo*.

Tanto em plantas com o repórter GUS quanto com GFP de mesma idade, foi observado o mesmo padrão de expressão: meristemas do caule (Figura 26) e da raiz (Figura 27). A Figura 27 não permite identificar se a região expressando GFP é de fato o centro quiescente, sendo necessário outros experimentos, como imunolocalização da proteína com o anticorpo anti-GFP para definir as zonas que sintetizam GFP.

A análise com GFP não foi tão frutífera quanto o esperado devido à baixa produção de proteína. Portanto este trabalho focalizou a atenção ao repórter GUS, já que mostrou melhor visibilidade da expressão nos tecidos. Sendo assim, foram feitos alguns cortes que facilitaram a identificação das zonas mais internas do vegetal.

Em resumo, foram obtidas várias plantas transgênicas repórteres e podemos afirmar que no mínimo três plantas (duas com GUS e uma com GFP), produzidas por eventos de inserção independentes, apresentaram expressão dos repórteres nos mesmos tecidos e intervalos de tempo. As regiões constatadas foram todos os meristemas: os da raiz e os do caule (que produzirão ramos, folhas e flores).

A identificação das proteínas repórteres expressadas a partir do promotor de *APUM-2* foi contraditória com a identificação dos mRNAs de *APUM-2* por RT-PCR em todos os tecidos analisados. Assim, é importante questionar se o promotor utilizado para as construções repórteres (os 2050 pb anteriores ao ATG inicial) continha todas as seqüências reguladoras necessárias para a expressão normal. Em geral, os elementos *cis* requeridos para a expressão gênica são encontrados na região a montante do início de transcrição, entretanto, não é incomum encontrar seqüências reguladoras localizados na região intragênica (DIETRICH et al., 1992; LARKIN et al., 1993). O gene *AGAMOUS* de *Arabidopsis* é um exemplo deste fato, a maior parte de seus elementos de controle estão dentro dos introns 1 e 2 (SIEBURTH & MEYEROWITZ, 1997).

Alternativamente, a expressão de *APUM-2* nas folhas e no caule pode ser muito baixa, o que impediria a detecção da atividade de GUS (dirigida pelo promotor de *APUM-2*) nestes tecidos. Ao contrário, a técnica de RT-PCR usada para amplificar o mensageiro *APUM-2* é muito mais sensível, e permitiria a detecção deste mRNA incluso nas folhas e no caule. Futuramente, serão realizados experimentos de hibridização *in situ* para a observar a localização do mRNA de *APUM-2* nos vários tecidos e estágios da planta e compará-los com resultados obtidos anteriormente.

Outra possibilidade é que exista algum tipo de controle traducional talvez influenciado por proteínas que interagem com alguma seqüência do mRNA no 5'-UTR, restringindo a tradução a este pequeno grupo de células, os meristemas.

Os meristemas são populações de células pequenas e isodiamétricas com propriedades totipotentes; esta habilidade lhes é conferida pelo não comprometimento com a diferenciação e pela retenção da capacidade de divisão (SUSSEX, 1989). A iniciação e manutenção de células-tronco e integração das células-filhas aos órgãos em formação são a base para o desenvolvimento pós-embriônico contínuo (CLARK, 2001). Por outro lado, a organogênese é resultado principalmente do controle padronizado do número, posição e planos de divisão associados à expansão celular regulada e coordenada (KLAUS et al., 1998).

O PUMILIO e seus homólogos se mostraram envolvidos a processos de desenvolvimento em várias espécies, como dito anteriormente, interagindo com mRNAs alvos que contém as seqüências NREs. A embriogênese vegetal é diferente da dos animais principalmente por não gerar tecidos e órgãos do indivíduo adulto, mas sim, um corpo rudimentar consistindo de um eixo embriônico e dois cotilédones (no caso de dicotiledôneas). A maioria das estruturas que compõem a planta madura serão desenvolvidas após a fase embrionária através da atividade dos meristemas (KLAUS et al., 1998). Isto sugere que a função do homólogo do PUMILIO em *Arabidopsis*, *APUM-2*, foi conservada em plantas, pois parece estar envolvido também nas atividades de desenvolvimento.

## V.II – *APUM-2* NOS MERISTEMAS:

Os meristemas do caule e da raiz estão organizados de forma similar em termos de ter uma região central de células quiescentes ou de multiplicação lenta e de mecanismo celular de manutenção (VAN DEN BERG et al., 1997; LAUX et al., 1996; KLAUS et al., 1998). Entretanto, os conjuntos gênicos que regulam cada meristema são diferentes. São conhecidos apenas dois genes que afetam o desenvolvimento de ambos os meristemas, como mensionado na Introdução: DEM e os genes FASCIATA (KEDDIE et al., 1998).

Além de FAS e DEM, os resultados deste trabalho indicam que APUM-2 parece ser bom candidato para desempenhar função nos dois meristemas. Desta forma, os meristemas talvez tenham um plano de organização homólogo fundamental e APUM-2 pode marcar sua presença no início do desenvolvimento e manutenção de suas funções. Lembrando que em *Drosophila* o PUMILIO interage com dois tipos diferentes de mensageiros (*HUNCHBACK* E *CICLINA B*, SONODA & WHARTON, 2001; e ASAOKA-TAGUCHI et al., 1999; respectivamente), no caso de *Arabidopsis*, esta proteína também pode interagir com mais de um alvo, cada um podendo ser proveniente de uma região meristemática.

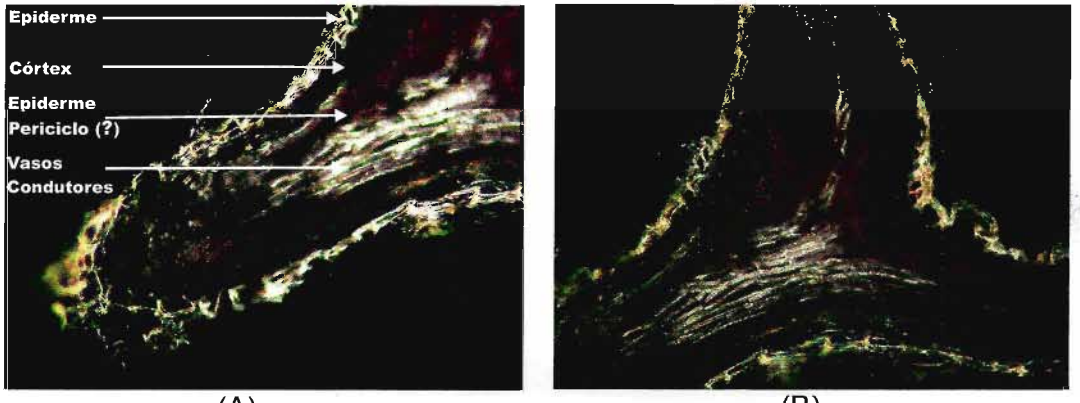
As Figuras 18 e 19 dos meristemas caulinares de plantas que contém o transgene *APUM*-2::GUS::NOS, mostradas na seção de resultados, mostram uma visão macroscópica da situação. Alguns cortes histológicos foram feitos pela Dra. Cristina Juárez com a finalidade de confirmar que o grupo de células observadas era realmente a região meristemática.

A Figura 34 representa um corte da região meristemática do caule feito num criostato, com aumento de 400x, e pode-se verificar que os órgãos primordiais não estão corados e a síntese da enzima GUS se restringe às células do meristema no que parece ser a PZ, a Zona Periférica.

**Figura 34:** Corte histológico do meristema apical do caule (resolução de 400x).

A PZ contém células desdiferenciadas mas determinadas a produzir algum órgão lateral e a localização da expressão de *APUM-2* nesta zona deve indicar que esta proteína de alguma forma participa do evento de organogênese no vegetal.

As Figuras 20, 21 e 22 mostram que a atividade enzimática de GUS nas raízes primárias e secundárias parece ser central. A região correspondente ao centro quiescente (pontas de todas as raízes) tem coloração mais acentuada. O cilindro corado parece ser o periciclo, que como dito anteriormente tem a capacidade de desenvolver novas raízes laterais. Esses tecidos foram seccionadas num criostato, pela Dra. Cristina Juárez, para dar uma noção maior da localização do repórter, e dois cortes estão ilustrados abaixo. A Figura 35 foi obtida por microscopia Dark Field com aumento de 400x.

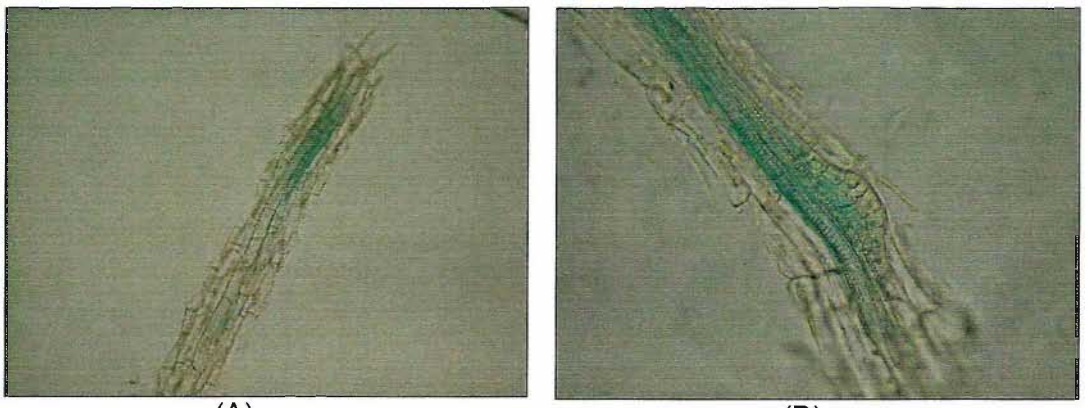



(A) (B)

**Figura 35:** Cortes histológicos da raiz. (A) representa a ponta e (B) uma bifurcação entre as raízes principal e lateral.

Nas Figuras 35 (A) e (B), a região interna de cor branca são os vasos condutores e a camada de células próximas começa a apresentar a coloração magenta, que corresponde ao produto de degradação de X-Glu visto com microscopia Dark Field. Esta região deve englobar endoderme e periciclo, lembrando que o último é um meristema de ordem secundária. Estes cortes mostram que a expressão de *APUM-2* certamente não ocorre nos tecidos da epiderme, do córtex e do sistema vascular, entretanto, não possibilita a determinação do tecido expressando β-glicuronidase.

Outros dois cortes superficiais (no comprimento da epiderme) foram vistos com aumento de 100x e de 200x (Figura 36) e mostram que existe uma concentração de GUS nas raízes secundárias em formação.



(A) (B)

**Figura 36:** Cortes histológicos no comprimento da epiderme vistos com aumento de 100x (A) e de 200x (B). É possível observar uma mancha azul na região onde irá se desenvolver uma raiz secundária.

A observação dos meristemas florais das plantas repórteres (Figuras 23 e 24) indicam que a expressão de *APUM-2* se restringe ao início do desenvolvimento floral, isto é, antes da total diferenciação dos órgãos. Flores maduras foram seccionadas e não mostraram atividade enzimática de GUS. É importante citar que os frutos, provenientes do crescimento do gineceu induzido por hormônios após a fertilização, também não mostraram a coloração azul própria da atividade de GUS em nenhuma fase de seu desenvolvimento.

## V.III – Experimentos de Genética Reversa:

As plantas com inserto da construção constitutiva apresentaram fenótipos variando desde o tipo selvagem até indivíduos com grande produção de ramos, folhas e raízes, cada um em grau diferente. O fato em comum é que as plantas observadas com fenótipos não selvagem adquiriram perturbações na produção de novos órgãos e/ou raízes laterais, tarefa cujos

meristemas tem grande responsabilidade. As características destas plantas são condizentes com os resultados das plantas repórteres.

A observação do Southern blot das transgênicas de expressão constitutiva (Figura 29) em comparação com os fenótipos indicam que não há correlação entre o número de insertos e a força fenotípica, mostrando que não há necessariamente uma proporcionalidade entre o número de inserções e a taxa de expressão. As duas plantas que apresentaram fenótipos mais pronunciados, as de número 2 e 6, são as que contém o maior e o menor número de insertos, respectivamente. Este resultado não é estranho pois a taxa de transcrição também depende da região do genoma onde as construções foram inseridas, ou seja, certas seqüências vizinhas podem estimular ou inibir a maquinaria de transcrição.

O nível de expressão de mRNAs dos *APUM* foi observado por Northern blot de amostras das plantas transgênicas de expressão constitutiva para comparar a selvagem. A Figura 30(A) indica que a banda correspondente aos *APUM* da planta selvagem tem quantidade maior ou igual de mensageiros do que as das plantas transgênicas. Sendo assim, não foi obtido nenhum indivíduo que de fato superexpresse *APUM-2* e os fenótipos obtidos parece não ter relação com o aumento da taxa de transcrição. Talvez o promotor de *APUM-2* seja igual ou mais forte do que o 35S e por isso não foi observado superexpressão. Em adição, pode-se considerar que exista seqüências de controle da expressão dentro das regiões intrônicas, já que as construções foram feitas com a seqüência total do gene, incluindo exons e íntrons.

Apesar disso, as amostras de RNA foram extraídas das plantas inteiras e portanto não é possível determinar se a expressão do transgene é ou não ectópica. Para isso, é necessário experimentos de hibridização *in situ* que indicará se o mRNA de *APUM-2* está presente em todos os tecidos e se está numa concentração maior do que no tipo selvagem.

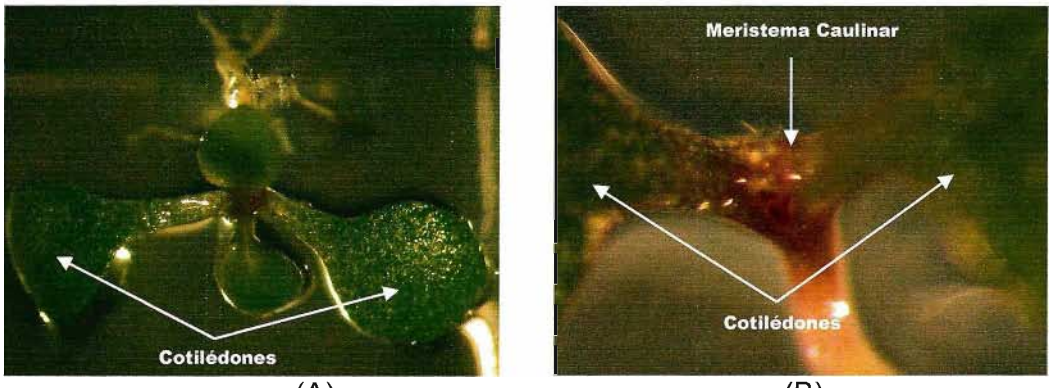
Outro dado verificado foi que os fenótipos observados na primeira geração foram atenuados ou não se propagaram na segunda geração.

Talvez, o organismo desenvolveu algum tipo de supressão do transgene que impediu a perpetuação de fenótipos atípicos nos indivíduos posteriores.

Com relação a repressão da expressão dos genes *APUM*, não foi obtida nenhuma planta transformada com a construção antisense. Isto pode indicar que a transformação desta construção não foi eficiente para gerar indivíduos transgênicos ou o nocaute da expressão dos três genes acarreta na letalidade do vegetal, o que indicaria ao menos uma redundância parcial.

O Salk Institute Genomic Analysis Laboratory disponibilizou uma biblioteca de sementes de *Arabidopsis*, cada linhagem contém um T-DNA inserido num ponto da seqüência do genoma vegetal (dados não publicados). Nosso laboratório adquiriu sementes de duas linhagens que mostraram inserção do T-DNA dentro da região estrutural de *APUM-2* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov, gi: 17142008 e 17142957). Essas sementes foram plaqueadas em meio MS com kanamicina e as etapas iniciais do desenvolvimento foram acompanhadas e comparadas com plantas do tipo selvagem.

A Figura 37 mostra que as plantas com *APUM-2* nocauteado apresentam atividade meristemática mais lenta do que a selvagem. Enquanto a do tipo selvagem está desenvolvendo o primeiro par de folhas, a nocauteada nem apresenta sinais de atividade meristemática. Além disso, a raiz era menor em relação à selvagem e não desenvolveu ramificações. É importante lembrar que a *Arabidopsis* é uma dicotiledônea e após a germinação surgem os cotilédones que são parecidos com folhas. Sendo assim, na Figura 37(A) o primeiro par de folhas da planta selvagem se desenvolvem perpendicularmente aos cotilédones enquanto que na 37(B) o mutante não tem ainda folhas nascentes existindo apenas os dois cotilédones.

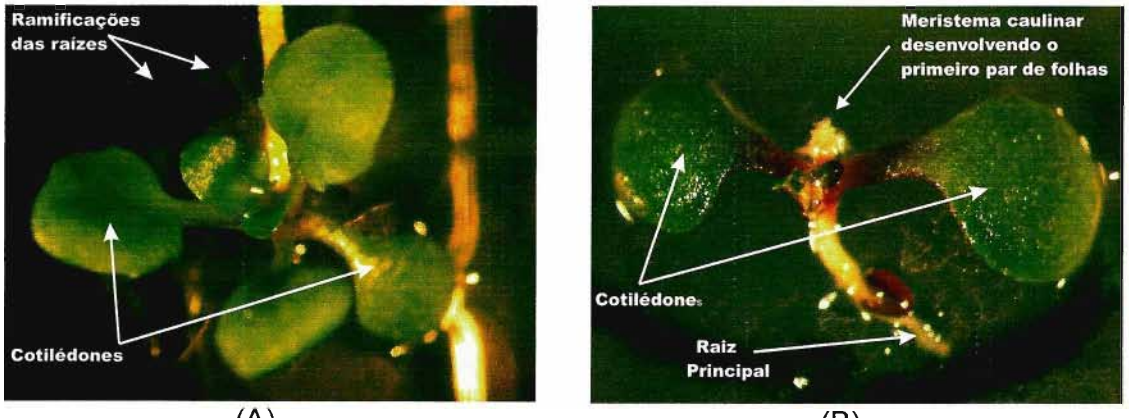



(A) (B)

**Figura 37:** Plantas com uma semana de vida, sendo que, (A) é do tipo selvagem e (B), fotografada com maior aumento do que a selvagem, é uma planta com um T-DNA interrompendo a seqüência de *APUM-2*.

Uma semana depois, essas plantas foram observadas, Figura 38, e a do tipo selvagem estava produzindo o segundo par de folhas enquanto que a planta com o gene interrompido pela inserção do T-DNA ainda estava desenvolvendo o primeiro par. Em adição, essas folhas apresentaram um aspecto diferente das selvagens, parecendo deformadas.

Na Figura 38 também é possível visualizar as raízes, sendo que a da planta como gene interrompido é curta e sem desenvolvimento de raízes laterais e a da selvagem apresentou ramificações e crescimento longitudinal.




(A) (B)

**Figura 38:** Plantas com duas semanas de vida, sendo que, (A) é do tipo selvagem e (B) é uma planta com T-DNA interrompendo a seqüência de *APUM-2*.

O acompanhamento do desenvolvimento das plantas com *APUM*-2 interrompido indicam que a função desta proteína envolvida com algum aspecto da atividade dos meristemas. Comparando este dado com a não obtenção de plantas com os três *APUM* reprimidos, é possível especular que esses genes apresentem função parcialmente redundante, isto é, quando um não está presente os demais podem substituí-lo e a inexistência das três proteínas ao mesmo tempo conduz à letalidade.

Os resultados obtidos com o nocaute de *APUM-2* são condizentes com a construção para expressão constitutiva. A formação de órgãos nas plantas nocauteadas está se mostrando bastante deficiente, mais lenta e as folhas observadas pareciam deformadas, enquanto que, a de expressão constitutiva, o número de órgãos produzidos era maior e as folhas mostravam o limbo mais largo.

Estes estudos são preliminares e será necessário um série de outros experimentos para definir melhor o papel de *APUM-2*. Em primeiro lugar, deverá ser feita uma construção repórter que leve em conta a região a jusante do ATG inicial ou então ensaios de hibridização in situ para a localização real do mensageiro e de imunolocalização da proteína nos diferentes tecidos e estágios do vegetal. Além disso, fazer outros cortes histológicos com melhor resolução podem auxiliar na identificação mais exata das regiões onde o gene em questão é expresso.

Em todos os organismos citados anteriormente, os homólogos do PUMILIO ligam-se a mensageiros alvos, entretanto, o papel biológico desta proteína em *Arabidopsis* ainda não foi definido sendo interessante confirmar se esta função também é conservada em plantas e se for, descobrir qual(is) é (são) o(s) alvo(s) em questão.

Outro fator aparentemente conservado nos outras espécies é a participação de homólogos da proteína NOS no desempenho da atividade biológica do PUMILIO. A análise do banco gênico de *Arabidopsis*, produzido pelo seqüenciamento (THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE, 1999 e 2000), não indica a existência de nenhuma proteína similar, fato que não

descarta a hipótese de existir outros parceiros para APUM que não tenham alguma homologia com NOS.

# VI – CONCLUSÕES

Neste trabalho, gene *APUM-2* foi clonado e estudado através de Northern blot e RT-PCR de amostras de tecidos da planta selvagem, de sistemas repórteres e de genética reversa.

Inicialmente, podemos dizer que transcritos de *APUM-2* podem ser encontrados nos tecidos de raiz, caule, folhas, flores e frutos. Entretanto, os outros dois *APUM* não apresentaram a mesma representatividade que *APUM-2*, sendo expressos em quantidades diferentes em certos tecidos ou sendo ausentes.

O promotor de *APUM-2* conduziu a expressão do repórter em todos os meristemas, incluindo os da raiz. Isto é um ponto importante, já que na literatura são conhecidos apenas dois genes envolvidos na atividade de todos os meristemas e pouco se sabe a respeito da similaridade na regulação gênica entre eles.

A aparente contradição entre os resultados de RT-PCR e a expressão dos genes repórteres sob o controle dos 2050pb anteriores ao ATG inicial de *APUM-2* pode ser explicada de várias maneiras (ver Discussão). Outros experimentos estão sendo desenvolvidos a fim de determinar qual a hipótese correta.

Algumas plantas transgênicas contendo 35S::*APUM-2*::NOS apresentaram fenótipos mostrando perturbações nas regiões meristemáticas.

Não foram obtidas plantas transformadas com a construção para a repressão dos três genes *APUM*, entretanto, a análise de sementes com a seqüência de *APUM-2* interrompida mostra que a atividade meristemática é mais lenta do que no tipo selvagem e o nocaute provoca distúrbios no órgão formado. Isto pode indicar que os três *APUM* reprimidos ao mesmo tempo conduza à inviabilidade do indivíduo e que o nocaute de apenas um seja parcialmente compensado pela função dos demais, podendo-se especular função redundante.

## VII – BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B., BRAY, B., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. Intracellular compartments and protein sorting. In: **Molecular Biology of the Cell**, BOHM, P., DOERFLER, W. cap.12, p.551-598. Garland, New York, 1994.

ALVAREZ, J., GULI, C.L., YO, X.-H. & SMYTH, D.R. TERMINAL FLOWER, a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v.2, p.103-116, 1992.

THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v.402, n.14, p.761-768, 1999.

THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v.402, n.14, p.769-777, 1999.

THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v.408, n.14, p.796-815, 2000.

ASAOKA-TAGUCHI, M., YAMADA, M., NAKAMURA, A., HANYU, K. & KOBAYASHI, S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology*, v.1, n.7, p. 431-437, 1999.

BECHTOLD, N., ELLIS J., PELLETIER G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, v.316, p.1194-1199, 1993.

BENFEY, P.N. & SCHERES, B. Root Development. *Current Biology*, v.10, p. R813-R815, 2001.

BLÁZQUEZ, M.A., SOOWAL, L.N., LEE, I. & WEIGEL, D. LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, v.124, p.3835-3844, 1997.

BOWMAN, J.L. & ESHED, Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science*, v.5, p.110-115, 2000.

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. & JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1.ed. California, John Wiley Professio,p. 1367, 2001.

CANGELOSI, G.A., BEST, E.A., MARTINETTI, G., NESTER, E.W. Genetic Analysis of *Agrobacterium*. *Methods of Enzymology*, v.204, p.384-397, 1991.

CLARK, S.E. Meristems: start your signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.28-32, 2001.

CLARK, S.E. Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Reviews*, v.2, p.276-284, 2001.

CURTIS, D., LEHMAN, R. & ZAMORE, P.D. Translational regulation in development. *Cell*, v.81, p.171-178, 1995.

DAVIS, S.J., VIESTRA, R.D. Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in *Arabidopsis thaliana*. *Weeds Words*, v.3, n.2, p.43, 1996.

DECKER, C.J. & PARKER, R. Diversity of cytoplasmic function for the 3'untranslated region of eukariotic transcript. *Current Opinion of Cell Biology*, v.7, p.386-392, 1995.

DIETRICH, R.A., RADKE, S.E. & HARADA, J.J. Downstream DNA sequences are required to activated a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell*, v.4, p. 1371-1382, 1992.

EDWARDS, T.A., TRINCAO, J., ESCALANTE, C.R., WHARTON, R.P. & AGGARWAL, A.K. Crystallization and characterization of Pumilio: a novel RNA-binding protein. *Journal of Structural Biology*, v.132, p.251-254, 2000.

EDWARDS, T.A., PYLE, S.E., WHARTON, R.P. & AGGARWAL, A.K. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell*, v.105, p.281-289, 2001.

FORBES, A. & LEHMANN, R. Nanos and Pumilio have a critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, v.125, p.679-690, 1998.

GOTO, N., KATON, N. & KRANS, A.R. Morphogenesis of floral organs in *Arabidopsis* : predominant carpel formation of the PIN-FORMED mutant. *Japanese Journal of. Genetics.*, v.9, p.745-757, 1991.

HAZELRIGG, T. The destinations of RNAs. *Cell*, v.95, n.13, p.451-460, 1998.

HEMPEL, F.D., WEIGE, I.D., MANDEL, M.A., DITTA, G., ZAMBRYSSKI, P.C., FELDMAN, L.J. & YANOFSKY, M.F. Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development*, v. 124, p.3845-3853, 1997.

HOEKEMA, P.R., HIRSCH, P.R., HOOYKAAS, P.J.J., SCHELPEROORT, R.A. A binary vector strategy based on segregation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, v.303, p.179-180, 1983.

HUGHES, AL, The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v.256, p.119-124, 1994.

IRISH, V.F. Patterning the flower. *Developmental Biology*, v.209, p.211-220, 1999.

JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A., BEVAN, M.W. Gus fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO Journal*, v.6, n.13, p.3901-3907, 1987.

KAYA, H., SHIBAHARA, K., TAOKA, K., IWABUCHI, M., STILLMAN, B. & ARAKI, T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, v.104, p.131-142, 2001.

KEDDIE, J.S., CARROLL, B.J., THOMAS, C.M., REYES, M.E., KLIMYUK, V., HOLTAN, H., GRUISSEM, W. & JONES, J.D. Transposon tagging of the DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEM gene of tomato. *Plant Cell*, v.10, p.877-888, 1998.

KING, R.W., DESHAIES, R.J., PETERS, J.M. & KIRSCHNER,M.W. How the proteolysis drives the cell cycle. *Science*, v.274, p.1652-1658, 1996.

KRAEMER, B., CRITTENDEN, S., GALLEGOS, M., MOULDER, G., BARSTEAD, R., KIMBLE. J. & WICKENS, M. Nanos-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, v.9, p.1009-1018, 1999.

KUWABARA, P.K. Gametogenesis: Keeping the male element under control. *Current Biology*, v.8, p.R278-R281, 1998.

LARKIN, J.C., OPPENHEIMER, D.G., POLLOCK, S. & MARKS, M.D. *Arabidopsis* GLABROUS gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell*, v.5, p.1739-1748, 1993.

LAUX, T., MAYER, K.F.X., BERGER, J. & JÜRGENS, G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis. Development*, v.122, p.87-96, 1996.

LEWIN, B. **Genes VII**. 7.ed. New York, Oxford University Press, p.990, 2000.

LIN, J. A new expression medium for *Agrobacterium tumefaciens* following electroporation. *Focus*, v.16, n.1, p.18-19, 1994.

LIN, J., GARCIA, N.A., KUO, J. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of *Tobacco* and *Arabidopsis thaliana*. *Focus*, v.16, n.3, p.72-77, 1994.

LYNDON, R.F. **Plant Development – The Cellular Basis**. 1.ed. London, Unwin Hyman Press, p.320, 1990.

MAYER, K.F.X., SCHOOF, H., HAECKER, A., LENHARD, M., JÜRGENS, G. & LAUX, T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, v.95, p.805-815, 1998.

MEYEROVITZ, M.E. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*, v.88, p.299-308, 1997.

MICKLEM, D.R. mRNA locatization during development. *Develop Biology*, v.172, p.377-395, 1995.

MOZO, T., FISCHER, S., SHIZUYA, H. & ALTMANN, T. Construction and caracterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol. Gen. Genet.*, v.258, p.562-570, 1998.

MOZO, T., FISCHER, S., MEIER-EWRT, S., LEHRACH, H. & ALTMANN, T. Use of IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Journal*, v.16, p.371-384, 1998.

MURASHIDE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiology Plant*, v.15, p.493-497, 1962.

MURATA, Y. & WHARTON, R.P. Binding of Pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell*, v.80, p.747-756, 1995.

NAGY, O.J.T. & CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, v. 313, p.810-812, 1985.

NAKAHATA, S., KATSU, Y., MITA, K., INOUE, K., NAGAHAMA, Y. & YAMASHITA, M. Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific Cyc B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog (Xcat-2) and a Cytoplasmic Polyadenilation Element-Binding Protein (CPEB). *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.20945-20953, 2001.

OLIVAS, W. & PARKER, R., The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO Journal*, v.19, n.23, p.6602-6611, 2000.

PARISI, M. & LIN, H. The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis. *Genetics*, v.153, p.235-250, 1999.

PARISI, M. & LIN, H. A duet of Nanos and Pumilio. *Current biology*, v.10, p.R81-R83, 2000.

PERKIN ELMER BIOSYSTEMS. ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing – Ready Reaction Kits. Original and Version 2.0. Protocols. USA, p.1.1-5.7, 1999.

PRZEMECK, G.K.H., MATTSON, J., HARDTKE, C.S., SUNG, Z.R. & BERLETH, T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta*, v.200, p.229-237, 1996.

RICHTER, J.D., THEURKAUF, W.E. The mensage is in the translation. *Science*, v.293, p.60-62, 2001.

SAMBROOK, J., FRISTSH, E.F., MANIATS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Plainview, N.Y., U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 1989.

SHANNON, S. & MEEKS-WAGNER, D.R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v.5, p.639-635, 1993.

SIEBURTH, L.E. & MEYEROWITZ, E.M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spacial regulation are located intragenically. *Plant Cell*, v.9, p.355-365, 1997.

SMYTH, D.R. Flower development. *Current Biology*, v.10, p.R82-R84, 2001.

SONODA, J. & WHARTON, R.P. Recruitment of Nanos to hunchback mRNAs by Pumilio. *Genes & Development*, v.13, p.2704-2712, 1999.

SONODA, J. & WHARTON, R.P. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes & Development*, v.15, p.762-773, 2001.

SOUZA, G.M., da SILVA, A.M. & KUSPA, A. Starvation promotes *Dictyostelium* development by releving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development*, v.26, p.3263-3274, 1999.

SPRINGER, P.S. Gene Traps: Tools for plant development and genomics. *Plant Cell*, v.12, p.1007-1020, 2000.

STEEVES, T.A. & SUSSEX, I.M. **Patterns in Plant Development**. 2. ed. New York, Cambridge University Press, p.388, 1991.

SUBRAMANIAM, K., SEYDOUX, G. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans. Development*, v.126, p.4861-4871, 1999.

SUSSEX, I. Developmental programming of the shoot meristem. *Cell*, v.56, p.225-229, 1989.

TADAUCHI, T., MATSUMOTO, K., HERSKOWITZ, I. & IRIE, K. Post-transcriptional regulation through the *ho* 3'-UTR by Mpt5, as yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO Journal*, v.20, p.552-561, 2001.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2.ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, p.792, 1998.

TAUTZ, D. Regulation of the *Drosophila* segmentation gene hunchback by two morphogenetic centres. *Nature*, v.332, p.281-284, 1988.

TUNG, W.L., CHOW, K.C. A modificated medium of efficient eletrotransformation of *E.coli. Trends in Genetics*, v.11; p128-129, 1995.

VAN DEN BERG, C., WILLEMSEN, V., HENDRIKS, G., WEISBEEK, P. & SCHERES, B. Short-range control of cell differenciation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*, v.390, p.287-289, 1997.

VAN ENGELEN, F.A., MOLTHOFF, J.W., CONNER, A.J., NAP, J.P., PEREIRA, A. & STIEKEMA, W.J. pBINPLUS: na improvided plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research*, v.4, p.288-290, 1995.

VERREAULT, A. De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes & Development*, v.14, p.1430-1438, 2000.

VISION, T.J., BROWN, D.G., TANKSLEY, S.D. The Origins of Genomic Duplications in *Arabidopsis*. *Science*, v.290, p.2114-2116, 2000.

WEN-JUN, S., FORDE, B.G. Efficient transformation of *Agrobacterium ssp.* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, v.17, n.20, p.8385, 1989.

WHARTON, R.P., SONODA, J., LEE, T., PATTERSON, M. & MURATA Y. The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator. *Molecular Cell*, v.1, p.863-872, 1998.

WHARTON, R.P. & STRUHL, G. RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by posterior morphogen *nanos*. *Cell*, v.67, p.955-967, 1991.

WREDEN, C., VERROTTI, A.C., SCHISA, J.A., LIEBERFARB, M.E. & STRICKLAND, S. Nanos and Pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenilation of *hunchback* mRNA. *Development*, v.124, p.3015-1023, 1997.

ZAMORE, P.D., BARTEL, D.P., LEHMANN, R. & WILLIAMSON, J.R. The Pumilio-RNA Interaction: a single RNA binding domain monomer recgnizes a bipartite target sequence. *Biochemistry*, v.38; p.596-604, 1999.

ZHANG, B., GALLEGOS, M, PUOTI, A., DURKIN, E., FIELDS, S., KIMBLE, J. & WICKENS, M.P. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature*, v.390, n.4, p.477-484, 1997.

# VIII – ANEXOS

Alinhamentos entre os genes *APUM*, utilizando as seqüências disponíveis no Gen Bank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) gi:6598426, atraves da ferramenta BLAST.

**(A) Promotores:**

Foi considerada região promotora os 2Kb a montante do ATG inicial.

***APUM-1*:** de 27191 a 25191 pares de bases;

***APUM-2*:** de 22077 a 20077 pares de bases;

***APUM-3*:** de 1398 a 3398 pares de bases.

**(B) Região Estrutural (exons e íntrons):**

De acordo com a anotação do genoma de Arabidopsis:

***APUM-1*:** de 25191 a 21290 pares de bases;

***APUM-2*:** de 20077 a 16069 pares de bases;

***APUM-3*:** de 3398 a 7263 pares de bases.

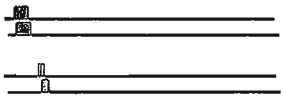
# Blast 2 Sequences results

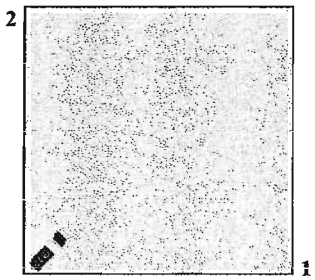
PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.0000 wordsize: 11 Filter ☑ Align

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Sequence 1** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (20077 .. 22077) |
| **Sequence 2** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (25191 .. 27191) |

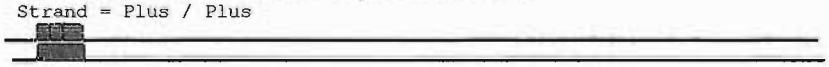




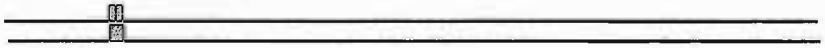

NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score =  152 bits (79), Expect = 1e-33
Identities = 105/113 (92%), Gaps = 2/113 (1%)
 Strand = Plus / Plus
```



```
Query: 20159 aaaaatcataaagatcaaaactttatacctcaa-tatatacaatcctcgaaatactctgt 20217
             ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| | |||| ||||||
Sbjct: 25255 aaaaatcataaagatcaaaactttatacctcaaatatatacaatccccaaaattctctgt 25314

Query: 20218 tgt-agaactaaacccaaagatcaaaacttcattaagcgatactcaaatccat 20269
             | | ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| ||||
Sbjct: 25315 ttttagaactaaacccaaagatcaaaactttattaagcgatactcaaacccat 25367

Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.31
Identities = 34/37 (91%), Gaps = 2/37 (5%)
 Strand = Plus / Plus
```



```
Query: 20336 agagagatagaaaaatg--ggttttatagtgttgacg 20370
             |||||||||| ||||||  |||||||||||||||||
Sbjct: 25441 agagagataggaaaatgtgggttttatagtgttgacg 25477

CPU time:     0.47 user secs.     0.06 sys. secs      0.53 total secs.

Lambda      K      H
    1.33    0.621     1.12

Gapped
Lambda      K      H
    1.33    0.621     1.12
```

```
Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 10
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 10
Number of successful extensions: 9
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 2001
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 25
effective length of query: 1976
effective length of database: 5,151,209,083
effective search space: 10178789148008
effective search space used: 10178789148008
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```

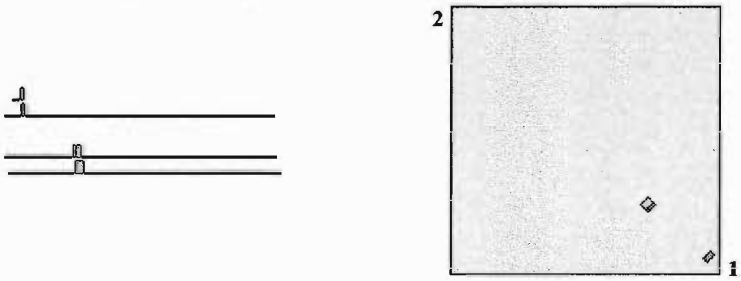
# Blast 2 Sequences results

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.0000 wordsize: 11 Filter Align

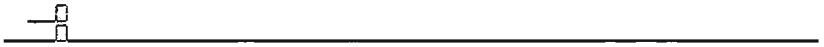
| | | | |
|---|---|---|---|
| **Sequence 1** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (1398 .. 3398) |
| **Sequence 2** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (25191 .. 27191) |




NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

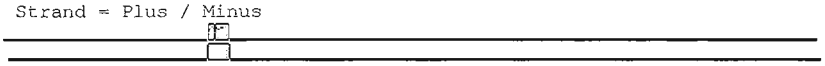
NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score = 50.7 bits (26), Expect = 0.006
Identities = 26/26 (100%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query: 3301  taaagttttgatctttgggtttagtt 3326
             ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 25346 taaagttttgatctttgggtttagtt 25321
```

```
Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.081
Identities = 47/56 (83%), Gaps = 1/56 (1%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query: 2837  atcttgaagtgttgtactttgttaaagctgtgtcct-taaacccaaaactgaaaca 2891
             |||| ||||||||||||||||| ||||| | | | || |||| || ||||||||||
Sbjct: 25741 atctagaagtgttgtactttggtaaaggtctctgctctaaaacccaaactgaaaca 25686
```

```
CPU time:     0.47 user secs.     0.07 sys. secs      0.54 total secs.

Lambda      K      H
    1.33    0.621     1.12

Gapped
Lambda      K      H
    1.33    0.621     1.12


Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 17
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 17
```

```
Number of successful extensions: 10
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 2001
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 25
effective length of query: 1976
effective length of database: 5,151,209,083
effective search space: 10178789148008
effective search space used: 10178789148008
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```

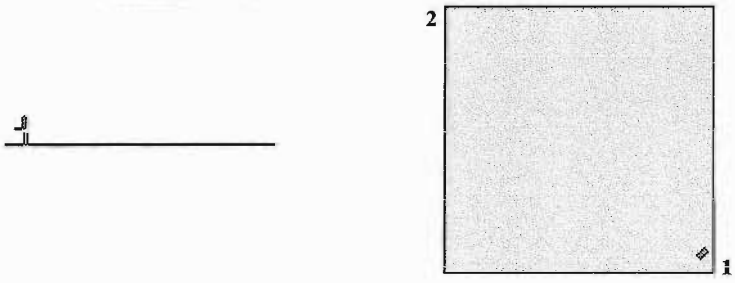
# Blast 2 Sequences results

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.0000 wordsize: 11 Filter ☑ Align

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Sequence 1** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (1398 .. 3398) |
| **Sequence 2** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 2001 (20077 .. 22077) |




NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.081
Identities = 24/24 (100%)
 Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 3303  aagttttgatctttgggtttagtt 3326
             ||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 20246 aagttttgatctttgggtttagtt 20223
```

```
CPU time:     0.32 user secs.     0.05 sys. secs      0.37 total secs.

Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12

Gapped
Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12


Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 8
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 8
Number of successful extensions: 5
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 2001
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 25
effective length of query: 1976
effective length of database: 5,151,209,083
effective search space: 10178789148008
effective search space used: 10178789148008
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
```

```
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```

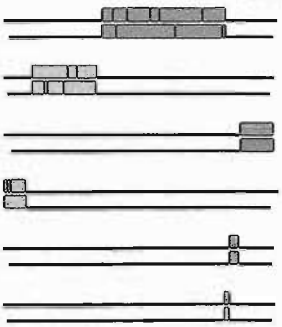
# Blast 2 Sequences results

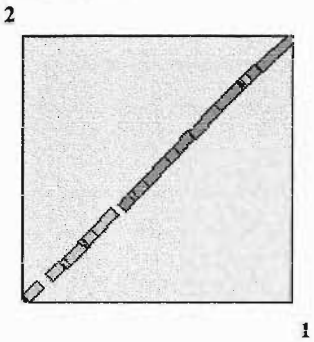
PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.0000 wordsize: 11 Filter ☑ Align

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Sequence 1** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 4009 (16069 .. 20077) |
| **Sequence 2** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 3902 (21290 .. 25191) |

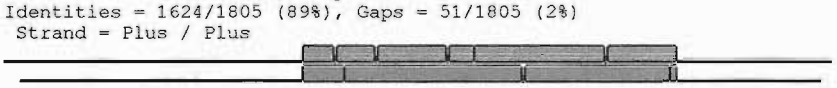





NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score = 2350 bits (1222), Expect = 0.0
Identities = 1624/1805 (89%), Gaps = 51/1805 (2%)
 Strand = Plus / Plus
```



```
Query:                          17552 taccttctgaataacacgacaaccatacatctgtaggctaagaggcaaaacattgtcaaa 17611
                                      ||||||||| || ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||| ||||||
Sbjct:                          22691 taccttctggatgacacggcaaccatacatctgtaagctaagaggcaaaacatggtcaaa 22750
putative pumilio/Mpt5 family RN> 704   ~~~~ K  Q  I  V  R  C  G  Y  M  Q  L  S  L  P  L  V  H  D  F

Query:                          17612 gagtttatctgccaattctcttctctgtggtgggagtccatgctcaaagaactgtaggaa 17671
                                      |||||| ||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22751 gagtttctctgccaattctctcctctgtggcgggagtccatgctcaaagaactgtaggaa 22810
putative pumilio/Mpt5 family RN> 687    L  K  E  A  L  E  R  R  Q  P  P  L  G  H  E  F  F ~~~~~~~~~

Query:                          17672 gataagcaaaattcaggaatctcttatc----------tcaactctaaaataaaaccaaa 17721
                                      |||||||||||||||||||| || |||          | ||||  |||||||||||||
Sbjct:                          22811 gataagcaaaattcaggaatcactcatcttactatggcttaacttcaaaataaaaccaaa 22870
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          17722 gaggaagactaaataaatctaccttctgaatcacatagtttccaaaaacgtcagtcatca 17781
                                      |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22871 gaggaagactaaataaat-taccttctgaatcacatagtttccaaaaacgtcagtcatca 22929
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~ ~~~ K  Q  I  V  Y  N  G  F  V  D  T  M  L

Query:                          17782 gggcaagagcgtgtggcatgatctcctcataaaccatgtttttctcatcacttgttgctg 17841
                                      || ||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct:                          22930 ggacaagagcttgtggcatgatctcctcatagaccatgtttttctcatcagttgttgctg 22989
putative pumilio/Mpt5 family RN> 654     V  L  A  Q  P  M  I  E  E  Y  V  M  N  K  E  D  T  T  A  T
```

```
Query:                          17842 tctcgagtttctgctgaataaaccggcttccatactgatccgaactggtc---------a 17892
                                      |||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||||||||         |
Sbjct:                          22990 tctcgagtttctgctgaataaagcggcttccatattgatccgaactggtcggtcatgcca 23049
putative pumilio/Mpt5 family RN> 640     E  L  K  Q  Q  I  F  R  S  G  Y  Q  D  S  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          17893 tgaaaatccccaagtacacgttagcttgggacaaattgtacacaagaaaaaagataaaag 17952
                                      |||||||||||||||| |||||||||||| ||||||| |||||| ||||  ||||||
Sbjct:                          23050 tgaaaatccccaagtacgcgttagcttgggaaaaattgtaaacaagagaaaatgtaaaag 23109
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          17953 acattcaagggaatacctgaactctacaacatggccagctatttcagcaagttcgaatcc 18012
                                      || ||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||| |||||
Sbjct:                          23110 actttcaaggaaatacctgaactccacaacatggccagctatttcagaaagttcaaatcc 23169
putative pumilio/Mpt5 family RN> 625   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~S  F  E  V  V  H  G  A  I  E  S  L  E  F  G

Query:                          18013 tcttgttttgttacttttgaactcttcaagcattgaagatccaaagccttcatccaaact 18072
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct:                          23170 tcttgttttgttacttttgaactcttcaagcattgaagatccaaagccttcatcaaaact 23229
putative pumilio/Mpt5 family RN> 605    R  T  K  N  S  K  F  E  E  L  M  S  S  G  F  G  E  D  F  S

Query:                          18073 agcatccatgtgccaggaacccattacccctcctgcgtagtttcttgttgcagagggata 18132
                                      ||||||||||||||| |||||||||| |||||| |  || ||||||||||||| ||| |
Sbjct:                          23230 agcatccatgtgccaagaacccattaaccctcccgaataatttcttgttgcagaaggaaa 23289
putative pumilio/Mpt5 family RN> 585    A  D  M  H  W  S  G  M  L  G  G  S  Y  N  R  T  A  S  P  F

Query:                          18133 tcgcatattaacttcacctcgtctcatagggctacagggtgacacaagagaattaggcag 18192
                                      |||||||||||||||| | ||||||||||||||| | ||||||| |||||| || ||||
Sbjct:                          23290 tcgcatattaacttcatcccgtctcatagggctataaggtgacataagagagtttggcat 23349
putative pumilio/Mpt5 family RN> 565    R  M  N  V  E  D  R  R  M  P  S  Y  P  S  M  L  S  N  P  M

Query:                          18193 aagatgatgagccaatgggctgccaggatatgac---------ccaaatgttggactccc 18243
                                      |  |||||||||||||||||||||||||||||||         |||||||||||||||||
Sbjct:                          23350 accatgatgagccaatgggctgccaggatatgacatattagacccaaatgttggactccc 23409
putative pumilio/Mpt5 family RN> 554    G  H  H  A  L  P  S  G  P  Y  S  M  N  S  G  F  T  P  S  G

Query:                          18244 ataatcggtgtggctgttagggctcccggatttgtaagggacaccgtactgtgatttctg 18303
                                      ||||| | | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct:                          23410 ataatagctatggctgttagggctcccggatttgtaagggacaccatactgtgatttctg 23469
putative pumilio/Mpt5 family RN> 525    Y  Y  S  H  S  N  P  S  G  S  K  Y  P  V  G  Y  Q  S  K  Q

Query:                          18304 tgctccaagataagccctctggagttcaagcatattcatgtatga---attacccataaa 18360
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||   |  |||||||||
Sbjct:                          23470 agctccaagataagccctctggagttcaagcatatccatgtatgatgaaccacccataaa 23529
putative pumilio/Mpt5 family RN> 510    A  G  L  Y  A  R  Q  L  E  L  M  D  M  Y  S  S  G  G  M  F

Query:                          18361 gttcacgtccatggaaggatcattgagaagatcaagcgaatcagcatactgatgatacat 18420
                                      ||||   |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||||
Sbjct:                          23530 gttcctatccatggaaggatcattgagaagatcaagtgaatcagcatactgattatacat 23589
putative pumilio/Mpt5 family RN> 485    N  R  D  M  S  P  D  N  L  L  D  L  S  D  A  Y  Q  N  Y  M

Query:                          18421 tggatctgccatatgtgactgaagaccagtacctcctcccatcattcgattactgaatct 18480
                                      ||| ||| |||||||||||||| ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          23590 tgggtctaccatatgtgactggagaccagcacctcctcccatcattcgattactgaatct 23649
putative pumilio/Mpt5 family RN> 465    P  D  V  M  H  S  Q  L  G  A  G  G  G  M  M  R  N  S  F  R

Query:                          18481 gccaagattacgtgattcagagaggttttgaccagatgatacataacctccaccatgaag 18540
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| | ||||  |||||| |
Sbjct:                          23650 gccaagattacgtgattcagagaggttttgaccagaagatacaaagcctcgtccatgatg 23709
putative pumilio/Mpt5 family RN> 445    G  L  N  R  S  E  S  L  N  Q  G  S  S  V  F  G  R  G  H  H

Query:                          18541 tctggaatccattccagaaaatcccatagcagatgctgcagaagcattttcatacactgg 18600
                                      ||| || |||||||||||||||||||| ||| ||| |         ||| ||||||| |||
Sbjct:                          23710 tctagagtccattccagaaaatcccaaagcggatac---------attatcatacattgg 23760
putative pumilio/Mpt5 family RN> 433    R  S  D  M  G  S  F  G  L  A  S  V          N  D  Y  M  P

Query:                          18601 agaatagttattagttccaagttggttagccatcatagaagctacagctggatttaatcc 18660
                                      || | |||||||  | |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||| |
Sbjct:                          23761 agcaaagttattgttcccaagttggttagccatcatagaggctacagctggatttaatgc 23820
```

```
putative pumilio/Mpt5 family RN> 408    A  F  N  N  N  G  L  Q  N  A  M  M  S  A  V  A  P  N  L  A

Query:                           18661 ataattgttgagacaatagtttgggctatcaagatgctggtactgagtagctactccacc 18720
                                        ||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||  || |||||| |||| |
Sbjct:                           23821 gtaattgttgagacaataatttgggctatcaagttgctggtaaggattagctaatccaac 23880
putative pumilio/Mpt5 family RN> 388    Y  N  N  L  C  Y  N  P  S  D  L  Q  Q  Y  P  N  A  L  G  V

Query:                           18721 tccatcattataggtagatccttgtgcccctctcaattgtgaattcctcaacaagccagt 18780
                                       |||| ||||||||| |||||| |||| ||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:                           23881 tccaccattataggcagatccgtgtggccctctcaattgtgaattcctcaacgagccagt 23940
putative pumilio/Mpt5 family RN> 368    G  G  N  Y  A  S  G  H  P  G  R  L  Q  S  N  R  L  S  G  T

Query:                           18781 tgccttctgggcttgatcagatttgtttgggaacccatgttgattgacttcgttatgccc 18840
                                       |||||| ||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                           23941 tgccttatgggcttgatcagatttgtttgggaactcatgttgattgacttcgttatgccc 24000
putative pumilio/Mpt5 family RN> 348    A  K  H  A  Q  D  S  K  N  P  F  E  H  Q  N  V  E  N  H  G

Query:                           18841 accttgcagtccaaacatatagttcctgaccttttccacatcttgctcagcctgaccacg 18900
                                       |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||  ||
Sbjct:                           24001 accttgcagtccaaacatatagttcctgaccttttcgacatcttgctcagcctgactccg 24060
putative pumilio/Mpt5 family RN> 328    G  Q  L  G  F  M  Y  N  R  V  K  E  V  D  Q  E  A  Q  S  R

Query:                           18901 ttcatctaacccgccactgccagacaggttcatgccagataaagcattgacaagatcaga 18960
                                        |||||||||||  ||||||  |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                           24061 atcatctaacccaacactgcatgacaggttcaagccagataaagcattgacaagatcaga 24120
putative pumilio/Mpt5 family RN> 308    D  D  L  G  V  S  C  S  L  N  L  G  S  L  A  N  V  L  D  S

Query:                           18961 agactcgttgagcc---------caccgttgaacgggctttgattacttgtgttcctctt 19011
                                       |||||||||||| |         |||| ||||| ||||| || |||||||||||||||||
Sbjct:                           24121 agactcgttgagaccagaggtaacaccattgaatgggctctggttacttgtgttcctctt 24180
putative pumilio/Mpt5 family RN> 303    S  E  N  L  G  S  T  V  G  N  F  P  S  Q  N  S  T  N  R  K

Query:                           19012 atcatttgaactcactctcccactcccaatgggagtaagacagggactaggcaccctagc 19071
                                       |||||||||||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                           24181 atcatttgaactcattcttccactcccaatgggagtaagacagggactaggcaccctagc 24240
putative pumilio/Mpt5 family RN> 268    D  N  S  S  M  R  G  S  G  I  P  T  L  C  P  S  P  V  R  A

Query:                           19072 aatggcctgtggatctggagttccatttctagacaaagacgaacccagaacagctgcata 19131
                                       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || || ||||||||||||||
Sbjct:                           24241 aatggcctgtggatctggagttccatttctagacaaagaagagcctagaacagctgcata 24300
putative pumilio/Mpt5 family RN> 248    I  A  Q  P  D  P  T  G  N  R  S  L  S  S  G  L  V  A  A  Y

Query:                           19132 gctgtatggagatggtgcaccaatgccttgcgatgcagatggagacagattattcttaga 19191
                                       |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||| |||||
Sbjct:                           24301 gctgtatggagatggtgcaccaatgccttgtgatgcagacggagacagattattattaga 24360
putative pumilio/Mpt5 family RN> 228    S  Y  P  S  P  A  G  I  G  Q  S  A  S  P  S  L  N  N  N  S

Query:                           19192 gtcaacattttcatcaaaggtattacgacttgcaggacgtgagggctgcttagtgacagg 19251
                                       |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |  | ||||||
Sbjct:                           24361 gtcaacattttcatcaaaggtattacgacttgcaggacgtgagggctgttgtgcgacagg 24420
putative pumilio/Mpt5 family RN> 208    D  V  N  E  D  F  T  N  R  S  A  P  R  S  P  Q  Q  A  V  P

Query:                           19252 atgtccatgccccatatcagcctgcacaaaaagcaatccatcaagtttacataagcaaga 19311
                                       ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| || |||||||||||||| ||||
Sbjct:                           24421 atgtccatgccccatatcagcctgcac-aaaagcaatacaccaagtttacataaggaaga 24479
putative pumilio/Mpt5 family RN> 201    H  G  H  G  M  D  A ~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           19312 atatc 19316
                                       |||||
Sbjct:                           24480 atatc 24484
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~

Score = 1210 bits (629), Expect = 0.0
Identities = 865/968 (89%), Gaps = 8/968 (0%)
 Strand = Plus / Plus
```

```
Query:                          16492 acatacctccagcagcaacgagtttttcaacacgagcaacgatatgctttccataagtgt 16551
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||| |||||||||||||||||
Sbjct:                          21657 acatacctccagcagcaacgagtttttcaatacgcgcaacgacatgctttccataagtgt 21716
putative pumilio/Mpt5 family RN> 936   ~~~~~~~  G  A  A  V  L  K  E  I  R  A  V  V  H  K  G  Y  T  Y

Query:                          16552 atttctttaaagcattgagatgcactttaatacgaccaaggatcagctcacgctgttggt 16611
                                      | || ||||||||| | |||||||||| || |||  ||| ||||||||||| |||||||
Sbjct:                          21717 actttttaaagcagtaagatgcactttgatgcgagtaagtatcagctcacgttgttggt 21776
putative pumilio/Mpt5 family RN> 916     K  K  L  A  T  L  H  V  K  I  R  T  L  I  L  E  R  Q  Q  D

Query:                          16612 catcacatgtctctaaaactttttgcactacatagttggcaaactgatccttcatcatcg 16671
                                      ||||||| ||||| |||||||| ||||||||||||| || ||||||||||||||||||
Sbjct:                          21777 catcacaggtctccaaaactttctgcactacatagtttgcgaactgatccttcatcatcg 21836
putative pumilio/Mpt5 family RN> 896     D  C  T  E  L  V  K  Q  V  V  Y  N  A  F  Q  D  K  M  M  A

Query:                          16672 cctaaatacaaaagatgaagaagcttatgagctaatagtttctttattttctccaacaat 16731
                                      |||| |||| || || ||||||||| |||||||||||||||||||||| | || |||||
Sbjct:                          21837 cctatataccaa-gaagaagaagct-atgagctaatagtttctttatttcccccgacaat 21894
putative pumilio/Mpt5 family RN> 896    ~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          16732 catctgaaagtatgtgtttgacaaacctgaagaggctcgttttcatcagttgtgcccagc 16791
                                      |||||||||  | | |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct:                          21895 catctgaaataaag-gtttgacagacctgaagaggctcgttttcatcagttgttcccagc 21953
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~ Q  L  P  E  N  E  D  T  T  G  L

Query:                          16792 atctcatttaccagaaattcccgttcctctggccctccaaaagtcaaacatttctcaaca 16851
                                      |||||||| || || ||||| |||||||| || |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          21954 atctcattcacaagcaattctcgttcctcaggacctccaaaagtcaaacatttctcaaca 22013
putative pumilio/Mpt5 family RN> 865   M  E  N  V  L  L  E  R  E  E  P  G  G  F  T  L  C  K  E  V

Query:                          16852 acgtttgaagcaaacttctgttggctcatctgaacaatcttccccgctaattccttgata 16911
                                      |||||||| || |||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||
Sbjct:                          22014 acgtttgatgcgaacttctgctggctcatctgaacaatcttccccgccaattctttgatt 22073
putative pumilio/Mpt5 family RN> 845   V  N  S  A  F  K  Q  Q  S  M  Q  V  I  K  G  A  L  E  K  I

Query:                          16912 atcacagtacgctcatcaggctttccgtgttccaatacatgctgtcaacaaaacgtgtat 16971
                                      |||||||| |||||||||||||||| || ||||  |||||||||| ||||||| |||||
Sbjct:                          22074 atcacagtgcgctcatcaggctttccatgctccagcacatgctgtccacaaaacatgtat 22133
putative pumilio/Mpt5 family RN> 831   I  V  T  R  E  D  P  K  G  H  E  L  V  H ~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          16972 tagtttttaagcaacctatacaaaataaccagttgtagtataactctt---ttttaacaa 17028
                                       |||||| | ||||  |||| ||||| |||||  | |||| ||||| |   |||| ||||
Sbjct:                          22134 cagttttga-gcaaagtataaaaaatcaccagaaggagtaaaactcatatctttttacaa 22192
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          17029 acctgaataacatagtttccatactgatcttgggccagcatactaatagttgacatgatt 17088
                                      ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| |||| ||||
Sbjct:                          22193 acctgaacaacatagtttccatactgatcttgggccagcatactaacagtggacaggatt 22252
putative pumilio/Mpt5 family RN> 812   ~~ Q  V  V  Y  N  G  Y  Q  D  Q  A  L  M  S  V  T  S  L  I

Query:                          17089 tcatccataaccttactctgagtatcagggtcatggcagtgctccaataccctctgcaac 17148
                                      || |||||||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||| |||||||||
Sbjct:                          22253 tcttccataaccttactctgtgtatcagggtcatggcagtgttccaatactctctgcaac 22312
putative pumilio/Mpt5 family RN> 794   E  E  M  V  K  S  Q  T  D  P  D  H  C  H  E  L  V  R ~~~~~~~

Query:                          17149 ataagacgagaa-gtgttttacttagaagcataagatcaagaactgtgtaatttttcttt 17207
                                      |  ||| || || | ||||||| |||||||||||||||| ||  |||| || |||||
Sbjct:                          22313 aggagatgaaaaagagttttacatagaagcataagatcaaaaaaggtgtcatctttctca 22372
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          17208 attactaagagcaagaacctgaataactcggcacccatatgggtgagtggagagggtcac 17267
                                      || || || |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22373 atcaccaatagcaagaacctgaataacacggcacccatatgggtgagtggagagggtcac 22432
putative pumilio/Mpt5 family RN> 780   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ Q  I  V  R  C  G  Y  P  H  T  S  L  T  V

Query:                          17268 aacattgccaaagaaggtggaaataataaattcgatgttttcttcaggcacacattcaat 17327
                                       |||| ||||||||| || |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22433 cacatggccaaagaaagttgaaataataaactcgatgttttcttcaggcacacattcaat 22492
putative pumilio/Mpt5 family RN> 760    V  H  G  F  F  T  S  I  I  F  E  I  N  E  E  P  V  C  E  I
```

```
Query:                          17328 acacttttgaaccacatggttcccattctgatcacgtacgcatcgcatcacatgtccatc 17387
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||
Sbjct:                          22493 acacttttgaaccacatggttcccattctgatcacgtacacatcgcattacatgtccatc 22552
putative pumilio/Mpt5 family RN> 740   C  K  Q  V  V  H  N  G  N  Q  D  R  V  C  R  M  V  H  G  D

Query:                          17388 gagttctttcaccattttaattttctggtctagatcaaccacctcaattgcctaaaagga 17447
                                       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct:                          22553 aagttctttcaccattttaattttctggtctagatcaaccacctcaattgcctaaaaagg 22612
putative pumilio/Mpt5 family RN> 723   L  E  K  V  M  K  I  K  Q  D  L  D  V  V  E  I  A ~~~~~~~~~

Query:                          17448 taaacata 17455
                                      ||||||||
Sbjct:                          22613 taaacata 22620
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1    ~~~~~~~~

Score =  835 bits (434), Expect = 0.0
Identities = 472/491 (96%)
 Strand = Plus / Plus
```

```
Query:                          19587 tcaaaaccaggtggcatagagaataaagattgactatcattaactttcctcctatcccca 19646
                                      |||||||| ||||||||||||| |||||| || ||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct:                          24701 tcaaaacccggtggcatagagaacaaagatcgattatcattaacttttctcctatcccca 24760
putative pumilio/Mpt5 family RN> 145   E  F  G  P  P  M  S  F  L  S  R  N  D  N  V  K  R  R  D  G

Query:                          19647 acaccacctaaaacattactactccctttaagcctctgagcaaccctcaaatcctcccta 19706
                                      ||||||||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24761 acaccacctaacacattattactccctttaagcctctgagcaaccctcaaatcctcccta 24820
putative pumilio/Mpt5 family RN> 125   V  G  G  L  V  N  N  S  G  K  L  R  Q  A  V  R  L  D  E  R

Query:                          19707 gacatcaaaggcggtggcaacctcggattcaacttcatattagcatagtaataagacaag 19766
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24821 gacatcaaaggcggtggcaacctcggattcaacttcatattagcatagtaataagacaag 24880
putative pumilio/Mpt5 family RN> 105   S  M  L  P  P  P  L  R  P  N  L  K  M  N  A  Y  Y  Y  S  L

Query:                          19767 taagccggatctttcctaaactcctcatcatcgccaccaaacccattacccttgttgcct 19826
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||  ||  |
Sbjct:                          24881 taagccggatctttcctaaactcctcatcatcaccaccaaacccattacccttattaaca 24940
putative pumilio/Mpt5 family RN> 85    Y  A  P  D  K  R  F  E  E  D  D  G  G  F  G  N  G  K  N  V

Query:                          19827 ccaccaaactccaaaaaaggagccccacctccgccgctaaaaagccctccagcagcacta 19886
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct:                          24941 ccaccaaactccaaaaaaggagccccacctccgccgctaaaaagccctccggcagcacta 25000
putative pumilio/Mpt5 family RN> 65    G  G  F  E  L  F  P  A  G  G  G  G  S  F  L  G  G  A  A  S

Query:                          19887 acagaaccatcaacagtcggtggagcagagccactcctatacaaattaagctctctctca 19946
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| |||| |||||||||||||||
Sbjct:                          25001 acagaaccatcaacagtcggtggagcagagccacttctaaacaagttaagctctctctca 25060
putative pumilio/Mpt5 family RN> 45    V  S  G  D  V  T  P  P  A  S  G  S  R  F  L  N  L  E  R  E

Query:                          19947 agctcatcagcttctacttgccttctctgctgctcaccaagtaatactccaatctctttc 20006
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct:                          25061 agctcatcagcttctacttgccttctctgctgctcaccaagcaatactccaatctctttc 25120
putative pumilio/Mpt5 family RN> 25    L  E  D  A  E  V  Q  R  R  Q  Q  E  G  L  L  V  G  I  E  K

Query:                          20007 tcataatcatccccaaaagatgaatcttcgttccctctatgcatcggtcttctccccagt 20066
                                      |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct:                          25121 tcataatcatccccaaaagatgaatcttcgttacctctatgcatcggtcttctccctagt 25180
putative pumilio/Mpt5 family RN> 5     E  Y  D  D  G  F  S  S  D  E  N  G  R  H  M  P  R  R  G  L

Query:                          20067 tccggtatcat 20077
                                      ||||||||||||
Sbjct:                          25181 tccggtatcat 25191
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     E  P  I  M

Score =  394 bits (205), Expect = e-106
```

```
Identities = 259/281 (92%), Gaps = 2/281 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query:                          16069 catcagcctaaagtgggatgtttggttctatgtatagaaaaaccgtaagcaa-ctacaca 16127
                                      ||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:                          21290 catcagcctaaagagggatgtttcgttctatgtatagaaaaaccgtaagcaaactacaca 21349

Query:                          16128 attttacagattt-gcagagaaaacaaagctctccttcacaattttcccgcagattattt 16186
                                      ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct:                          21350 attttacagatttagcagagaaaacaaagctctccttcacaatttccccgcagattattt 21409

Query:                          16187 ccggtttagattttacctaattctcaaaacgctatggcagagccatccaccctagttaag 16246
                                      ||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||  |||||||||||||||||
Sbjct:                          21410 ccggtttagatcttacctaattctcaaaacgctacggcagccccatccaccctagttaag 21469

Query:                          16247 ctgtacaacacttgcggccttacgccatctgaggctgggttagggactgcaaagccatcc 16306
                                      ||||||||  ||||  || |||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct:                          21470 ctgtacattacttaaggtcttaagccatctggggctgggttagggactgcaaagccattc 21529
putative pumilio/Mpt5 family RN> 956                      ^^^ A  M  Q  P  Q  T  L  S  Q  L  A  M  R

Query:                          16307 tcctctctgtatatgagaaaaaacccacttagagacattga 16347
                                      ||||||||| |||| |||||| | ||||||||||||| |||
Sbjct:                          21530 tcctctctgcatataagaaaagaaccacttagagacaatga 21570
putative pumilio/Mpt5 family RN> 954     R  E~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Score =  216 bits (112), Expect = 2e-52
Identities = 128/136 (94%)
 Strand = Plus / Plus

Query:                          19432 aataagaagaggtatcaccaacctgaaagatatcagcaaaactcttctgcttgcctccaa 19491
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24570 aataagaagaggtatcaccaacctgaaagatatcagcaaaactcttctgcttgcctccaa 24629
putative pumilio/Mpt5 family RN> 188   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                       Q  F  I  D  A  F  S  K  Q  K  G  G  L

Query:                          19492 tccccaaacccggcaaaccgatcaatccattagcatcccattcagaagaagaagcactag 19551
                                        |||||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||
Sbjct:                          24630 gtcccaaacccggtaaaccaatcaatccattagcatcccattcagaagcagaagcaccag 24689
putative pumilio/Mpt5 family RN> 168     G  L  G  P  L  G  I  L  G  N  A  D  W  E  S  A  S  A  G  T

Query:                          19552 ttttctcaacctcaaa 19567
                                      |||||||| | |||||
Sbjct:                          24690 ttttctcaccttcaaa 24705
putative pumilio/Mpt5 family RN> 163     K  E  G  E  F

Score = 77.6 bits (40), Expect = 9e-11
Identities = 58/67 (86%)
 Strand = Plus / Plus

Query:                          19356 agagaaaacattaacaaagtatcaaagcataatcaactatagacaccagaaagaagctaa 19415
                                      ||||||||||||| |||||  |||||||||||||||||||||||| |  ||||||||  ||
Sbjct:                          24512 agagaaaacattagcaaagcgtcaaagcataatcaactatagacaaccaaaagaagtaaa 24571
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          19416 caagaag 19422
                                       ||||||
Sbjct:                          24572 taagaag 24578
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     ~~~~~~~

CPU time:     0.22 user secs.     0.06 sys. secs      0.28 total secs.

Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12
```

```
Gapped
Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12


Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 41
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 41
Number of successful extensions: 28
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 4009
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 26
effective length of query: 3983
effective length of database: 5,156,418,751
effective search space: 20538015885233
effective search space used: 20538015885233
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```

# Blast 2 Sequences results

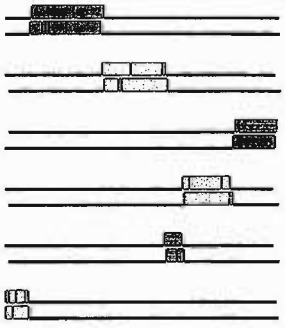
PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

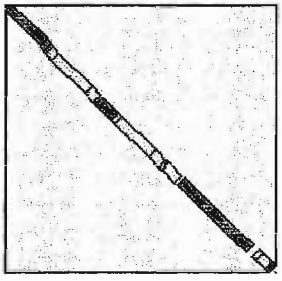
**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.000( wordsize: 11 Filter Align

**Sequence 1** gi 6598426 Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 **Length** 3866 (3398 .. 7263)

**Sequence 2** gi 6598426 Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 **Length** 3902 (21290 .. 25191)

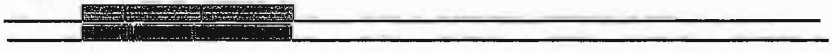





NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

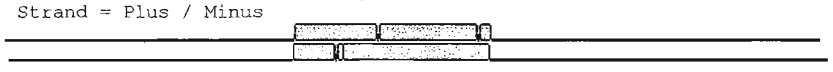
NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score = 1292 bits (672), Expect = 0.0
Identities = 888/979 (90%), Gaps = 16/979 (1%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query:                          5911  tttcctatttttaacttttttaggcaattgaggtggttgatctagaccagaaaatccaaat 5970
                                      |||| ||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
Sbjct:                          22625 tttcatatgtttaccttttttaggcaattgaggtggttgatctagaccagaaaattaaaat 22566
putative pumilio/Mpt5 family RN> 723  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ A  I  E  V  V  D  L  D  Q  K  I  K  M

Query:                          5971  ggtcaaagaacttgatggacatgtgatgcgatgtgtacgtgatcagaatgggaaccatgt 6030
                                      ||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22565 ggtgaaagaacttgatggacatgtaatgcgatgtgtacgtgatcagaatgggaaccatgt 22506
putative pumilio/Mpt5 family RN> 736    V  K  E  L  D  G  H  V  M  R  C  V  R  D  Q  N  G  N  H  V

Query:                          6031  ggttcaaaagtgtattgaatgtgtgcctgaagaaaacattgagtttattatttcaacttt 6090
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22505 ggttcaaaagtgtattgaatgtgtgcctgaagaaaacatcgagtttattatttcaacttt 22446
putative pumilio/Mpt5 family RN> 756    V  Q  K  C  I  E  C  V  P  E  E  N  I  E  F  I  I  S  T  F

Query:                          6091  ctttggccatgtggtgaccctctccactcacccatacgggtgccgtgttattcaggttct 6150
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22445 ctttggccatgtggtgaccctctccactcacccatatgggtgccgtgttattcaggttct 22386
putative pumilio/Mpt5 family RN> 776    F  G  H  V  V  T  L  S  T  H  P  Y  G  C  R  V  I  Q ~~~~~

Query:                          6151  tcctactggtgattaagaaatatgacacctttttcgatcttatgcttctatgtaaaactg 6210
                                      | ||| |||||||| ||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22385 tgctattggtgattgagaaagatgacacctttttgatcttatgcttctatgtaaaactc 22326
putative pumilio/Mpt5 family RN> 22385 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
```

```
Query:                          6211  tttcccatctcctgttgcagagagtattggaacactgccataaccctgatacacagagta 6270
                                      |||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct:                          22325 tttttcatctcctgttgcagagagtattggaacactgccatgaccctgatacacagagta 22266
putative pumilio/Mpt5 family RN> 794   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ R  V  L  E  H  C  H  D  P  D  T  Q  S

Query:                          6271  aggttatggaagaaatcctgtccactgttagtatgctgacccaagatcagtatggaaact 6330
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct:                          22265 aggttatggaagaaatcctgtccactgttagtatgctggcccaagatcagtatggaaact 22206
putative pumilio/Mpt5 family RN> 807   K  V  M  E  E  I  L  S  T  V  S  M  L  A  Q  D  Q  Y  G  N

Query:                          6331  atgttgttcaggtttgtaaa---agatgagttttactgcaactcttgannnnnnnattgg 6387
                                      |||||||||||||||||||   | ||||||||||| |  ||  |||       ||
Sbjct:                          22205 atgttgttcaggtttgtaaaaagatatgagttttactccttctggtga-ttttttatact 22147
putative pumilio/Mpt5 family RN> 827   Y  V  V  Q  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          6388  ttgatctaaactgatacatgttttgtgtacagcatgtactggagcatggaaagcctgatg 6447
                                      ||| || ||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22146 ttgctcaaaactgatacatgttttgtggacagcatgtgctggagcatggaaagcctgatg 22087
putative pumilio/Mpt5 family RN> 831   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ H  V  L  E  H  G  K  P  D

Query:                          6448  agcgcactgtgataatcaaagagttagcggggaagattgttcagatgagccaacagaagt 6507
                                      |||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:                          22086 agcgcactgtgataatcaaagaattggcggggaagattgttcagatgagccagcagaagt 22027
putative pumilio/Mpt5 family RN> 840   E  R  T  V  I  I  K  E  L  A  G  K  I  V  Q  M  S  Q  Q  K

Query:                          6508  ttgcatcaaacgttgttgagaagtgtttgacttttggaggtcctgaggaacgggaattgc 6567
                                      | ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:                          22026 tcgcatcaaacgttgttgagaaatgtttgacttttggaggtcctgaggaacgagaattgc 21967
putative pumilio/Mpt5 family RN> 860   F  A  S  N  V  V  E  K  C  L  T  F  G  G  P  E  E  R  E  L

Query:                          6568  tggtgaatgagatgctgggcacaactgatgaaaacgagcctcttcaggtttgtcaaacac 6627
                                      | ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| |
Sbjct:                          21966 ttgtgaatgagatgctgggaacaactgatgaaaacgagcctcttcaggtctgtcaaac-c 21908
putative pumilio/Mpt5 family RN> 880   L  V  N  E  M  L  G  T  T  D  E  N  E  P  L  Q  ~~~~~~~~~~~~ ~

Query:                          6628  atgctttcagatgatggtctgggggaacaccgaacaaagaatctaataagctcataagt- 6686
                                       |  |||||||||| ||| ||||||      || |||||| || || ||||||||  |
Sbjct:                          21907 tttatttcagatgattgtc-gggggga------aataaagaaact-attagctcatagctt 21856
putative pumilio/Mpt5 family RN> 21907 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~      ~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          6687  -ttcttcttgtgtatataggcgatgatgaaggatcagtttgcaaactatgtagtgcaaaa 6745
                                       |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| ||
Sbjct:                          21855 cttcttcttg-gtatataggcgatgatgaaggatcagttcgcaaactatgtagtgcagaa 21797
putative pumilio/Mpt5 family RN> 21855 ~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ A  M  M  K  D  Q  F  A  N  Y  V  V  Q  K

Query:                          6746  agtcctggagacatgtgatgaccaacagcgtgaactgatactgactcgtattaaagtgca 6805
                                      |||  ||||||| ||||||||||||||| ||||| |||||||| ||||| || ||||||||
Sbjct:                          21796 agttttggagacctgtgatgaccaacaacgtgagctgatacttactcgcatcaaagtgca 21737
putative pumilio/Mpt5 family RN> 910     V  L  E  T  C  D  D  Q  Q  R  E  L  I  L  T  R  I  K  V  H

Query:                          6806  tctgaatgctctaaagaaatacacttacggaaagcatatcgttgcccgtgttgaaaaact 6865
                                      ||| | |||| |||| || |||||||| ||||||||| ||||||| ||| ||||||||||
Sbjct:                          21736 tcttactgctttaaaaaagtacacttatggaaagcatgtcgttgcgcgtattgaaaaact 21677
putative pumilio/Mpt5 family RN> 930     L  T  A  L  K  K  Y  T  Y  G  K  H  V  V  A  R  I  E  K  L

Query:                          6866  cgttgctgctggaggtatg 6884
                                      |||||||||||||||||||
Sbjct:                          21676 cgttgctgctggaggtatg 21658
putative pumilio/Mpt5 family RN> 950     V  A  A  G  ~~~~~

Score = 1217 bits (633), Expect = 0.0
Identities = 833/923 (90%), Gaps = 23/923 (2%)
 Strand = Plus / Minus
```



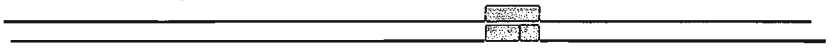
```
Query:                          4965  atgctgattcgtttgatcttcttaatgacccttcaatggacaggaactat------ggta 5018
                                      ||||||||||  ||||||||||| ||||| ||||| ||||| ||||||| |      |||
```

```
Sbjct:                           23576 atgctgattcacttgatcttctcaatgatccttccatggataggaactttatgggtggtt 23517
putative pumilio/Mpt5 family RN> 489   Y  A  D  S  L  D  L  L  N  D  P  S  M  D  R  N  F  M  G  G

Query:                           5019  attcatacatgaatatgcttgaaattcagagggcttatctcggatctcagaaatcacagt 5078
                                         ||||||||| ||||||||||| | |||||||||||||| ||| |||||||||||||||
Sbjct:                           23516 catcatacatggatatgcttgaactccagagggcttatcttggagctcagaaatcacagt 23457
putative pumilio/Mpt5 family RN> 509   S  S  Y  M  D  M  L  E  L  Q  R  A  Y  L  G  A  Q  K  S  Q

Query:                           5079  atggtcttccttacaaatcagggagccctaacagccatagctattatggcagtccaacat 5138
                                       ||||| | ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct:                           23456 atggtgtcccttacaaatccgggagccctaacagccatagctattatgggagtccaacat 23397
putative pumilio/Mpt5 family RN> 529   Y  G  V  P  Y  K  S  G  S  P  N  S  H  S  Y  Y  G  S  P  T

Query:                           5139  ttgggtctaatatgtcatatcctggcagcccattggctcatcatggtatgccaaactctc 5198
                                       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                           23396 ttgggtctaatatgtcatatcctggcagcccattggctcatcatggtatgccaaactctc 23337
putative pumilio/Mpt5 family RN> 549   F  G  S  N  M  S  Y  P  G  S  P  L  A  H  H  G  M  P  N  S

Query:                           5199  ttatgtcaccttacagccctatgagacgaggtgaagtaaatatgcgatatcccgctgcaa 5258
                                       ||||||||||||| |||||||||||||| | |||||| |||||||||| |||  ||||||
Sbjct:                           23336 ttatgtcaccttatagccctatgagacgggatgaagttaatatgcgatttccttctgcaa 23277
putative pumilio/Mpt5 family RN> 569   L  M  S  P  Y  S  P  M  R  R  D  E  V  N  M  R  F  P  S  A

Query:                           5259  caagaaactatactggaggggtaatgggttcttggcacatggatgctagtttggatgaag 5318
                                       ||||||| ||| | |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:                           23276 caagaaattattcgggagggttaatgggttcttggcacatggatgctagttttgatgaag 23217
putative pumilio/Mpt5 family RN> 589   T  R  N  Y  S  G  G  L  M  G  S  W  H  M  D  A  S  F  D  E

Query:                           5319  gatttggatcttcaatgcttgaagagttcaaaagtaacaaaacaagagggttcgaacttt 5378
                                       | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||||
Sbjct:                           23216 gctttggatcttcaatgcttgaagagttcaaaagtaacaaaacaagaggatttgaacttt 23157
putative pumilio/Mpt5 family RN> 609   G  F  G  S  S  M  L  E  E  F  K  S  N  K  T  R  G  F  E  L

Query:                           5379  ctgaaatagctggccatgttgtagagttcaggtattccctttaaattcttttaccttttt 5438
                                       |||||||||||||||||||||| ||||||||||||| |||| ||| |||||||| |||| 
Sbjct:                           23156 ctgaaatagctggccatgttgtggagttcaggtatttccttgaaagtcttttacattttc 23097
putative pumilio/Mpt5 family RN> 629   S  E  I  A  G  H  V  V  E  F  S~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           5439  tcttgtgtacactttgtcccaagctaacgcgtacttggggattttcat---------gac 5489
                                       |||||| |||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||         |||
Sbjct:                           23096 tcttgtttacaatttttcccaagctaacgcgtacttggggattttcatggcatgaccgac 23037
putative pumilio/Mpt5 family RN> 23096 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           5490  cagttcggatcagtatggaagccggtttattcagcagaaactcgagacagcaacaactga 5549
                                       |||||||||||| ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                           23036 cagttcggatcaatatggaagccgctttattcagcagaaactcgagacagcaacaactga 22977
putative pumilio/Mpt5 family RN> 640   ~~~  S  D  Q  Y  G  S  R  F  I  Q  Q  K  L  E  T  A  T  T  D

Query:                           5550  tgagaaaaacatggtttatgaggagatcatgccaaaagctcttgccctgatgactgacgt 5609
                                       ||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||| |||||||||||||||
Sbjct:                           22976 tgagaaaaacatggtctatgaggagatcatgccacaagctcttgtcctgatgactgacgt 22917
putative pumilio/Mpt5 family RN> 659    E  K  N  M  V  Y  E  E  I  M  P  Q  A  L  V  L  M  T  D  V

Query:                           5610  ttttggaaactatgtgattcagaaggtatagatttatttagtcttcctctttgattttat 5669
                                       ||||||||||||||||||||||||||||   |||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct:                           22916 ttttggaaactatgtgattcagaaggta---atttatttagtcttcctctttggttttat 22860
putative pumilio/Mpt5 family RN> 679    F  G  N  Y  V  I  Q  K ~~~~   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           5670  ttggagttgagagtgagacatagtaacatgagagattcctggatgttgcttatcttccta 5729
                                       |     ||||   | || |||||||| ||||| |||||||| || |||||||||||||||
Sbjct:                           22859 t-----ttgaagttaagccatagtaagatgagtgattcctgaattttgcttatcttccta 22805
putative pumilio/Mpt5 family RN> 22859 ~     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           5730  cagttctttgagcatggactcccaccacagagaagagaattgggagagaaactcattgac 5789
                                       ||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||| |||||||||| |||||
Sbjct:                           22804 cagttctttgagcatggactcccgccacagaggagagaattggcagagaaactctttgac 22745
putative pumilio/Mpt5 family RN> 687   ~~~ F  F  E  H  G  L  P  P  Q  R  R  E  L  A  E  K  L  F  D
```

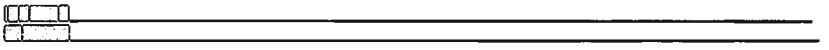
```
Query:                          5790  aatgttttgcctcttagcttacagatgtatggttgtcgtgtcatccagaaggtaaagtct 5849
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          22744 catgttttgcctcttagcttacagatgtatggttgccgtgtcatccagaaggtaaagtct 22685
putative pumilio/Mpt5 family RN> 706   H  V  L  P  L  S  L  Q  M  Y  G  C  R  V  I  Q  K ~~~~~~~~~~

Query:                          5850  agttctcacgtgttttaatgttc 5872
                                      ||||| ||| ||||||| |||||
Sbjct:                          22684 agttcccacctgttttactgttc 22662
putative pumilio/Mpt5 family RN> 22684 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Score =  977 bits (508), Expect = 0.0
Identities = 575/606 (94%), Gaps = 9/606 (1%)
 Strand = Plus / Minus

Query:                          3401  atgataccggaactagggagaagaccgatgcatagaggtaacgaagattcatcttttggg 3460
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          25191 atgataccggaactagggagaagaccgatgcatagaggtaacgaagattcatcttttggg 25132
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     M  I  P  E  L  G  R  R  P  M  H  R  G  N  E  D  S  S  F  G

Query:                          3461  gatgattacgagaaagagattggagtattgcttggtgagcagcagagaaggcaagtagag 3520
                                      |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          25131 gatgattatgagaaagagattggagtattgcttggtgagcagcagagaaggcaagtagaa 25072
putative pumilio/Mpt5 family RN> 21    D  D  Y  E  K  E  I  G  V  L  L  G  E  Q  Q  R  R  Q  V  E

Query:                          3521  gcggatgagcttgagagagagcttaacttgtatagaagtggctctgctccaccgactgtt 3580
                                      || |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          25071 gctgatgagcttgagagagagcttaacttgtttagaagtggctctgctccaccgactgtt 25012
putative pumilio/Mpt5 family RN> 41    A  D  E  L  E  R  E  L  N  L  F  R  S  G  S  A  P  P  T  V

Query:                          3581  gatggttctcttagtgctgccggagggctttttagcggcggaggtggggcttcttttctg 3640
                                      ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||
Sbjct:                          25011 gatggttctgttagtgctgccggagggctttttagcggcggaggtggggctcctttttg 24952
putative pumilio/Mpt5 family RN> 61    D  G  S  V  S  A  A  G  G  L  F  S  G  G  G  G  A  P  F  L

Query:                          3641  gaatttggtggagttaataagggtaatgggtttggtggtgatgatgaggagtttaggaaa 3700
                                      || |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24951 gagtttggtggtgttaataagggtaatgggtttggtggtgatgatgaggagtttaggaaa 24892
putative pumilio/Mpt5 family RN> 81    E  F  G  G  V  N  K  G  N  G  F  G  G  D  D  E  E  F  R  K

Query:                          3701  gatccagcttacttgtcttattactatgctaatatgaagttgaatccgaggttgccacct 3760
                                      ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24891 gatccggcttacttgtcttattactatgctaatatgaagttgaatccgaggttgccaccg 24832
putative pumilio/Mpt5 family RN> 101   D  P  A  Y  L  S  Y  Y  Y  A  N  M  K  L  N  P  R  L  P  P

Query:                          3761  cctttgatgtctagggaggatttgagggttgctcagaggcttaaagggagtaataatgtg 3820
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24831 cctttgatgtctagggaggatttgagggttgctcagaggcttaaagggagtaataatgtg 24772
putative pumilio/Mpt5 family RN> 121   P  L  M  S  R  E  D  L  R  V  A  Q  R  L  K  G  S  N  N  V

Query:                          3821  ttaggtggtgttggggataggagaaaagtgaatgacagtcggtctttgttctctatgcca 3880
                                      |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| | ||| |||||||||||||||||
Sbjct:                          24771 ttaggtggtgttggggataggagaaaagttaatgataatcgatctttgttctctatgcca 24712
putative pumilio/Mpt5 family RN> 141   L  G  G  V  G  D  R  R  K  V  N  D  N  R  S  L  F  S  M  P

Query:                          3881  cctggttttgaggctggaaaacctggtgcttctgcttctgagtgggatgctaatggattg 3940
                                      || |||||||| | ||  ||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct:                          24711 ccgggttttgaaggtgagaaaactggtgcttctgcttctgaatgggatgctaatggattg 24652
putative pumilio/Mpt5 family RN> 161   P  G  F  E  G  E  K  T  G  A  S  A  S  E  W  D  A  N  G  L

Query:                          3941  att---------ggtttgggacttggaggcaagcagaagagttttgctgatatctttcag 3991
                                      |||         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24651 attggtttaccgggtttgggacttggaggcaagcagaagagttttgctgatatctttcag 24592
putative pumilio/Mpt5 family RN> 181   I  G  L  P  G  L  G  L  G  G  K  Q  K  S  F  A  D  I  F  Q

Query:                          3992  gttggt 3997
                                      ||||||
Sbjct:                          24591 gttggt 24586
```

```
putative pumilio/Mpt5 family RN> 24591 ~~~~~~

Score =  873 bits (454), Expect = 0.0
Identities = 633/715 (88%), Gaps = 10/715 (1%)
 Strand = Plus / Minus

Query:                           3992  gttggttatttttgatactctgctaatgtttctctgtgtgtatgtgttgtgtatagttc 4051
                                       |||| ||||  |||||  || ||||||||||| ||| ||||| |||||||||||||| |||
Sbjct:                          24548  gttgattatgctttgacgctttgctaatgttt-tctctgtgtgtgtgttgtgtatatttc 24490
putative pumilio/Mpt5 family RN> 24548 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                           4052  tcctgaatactcttgcttatataaacttggtggattacttttgtgtaggcggatatgggg 4111
                                       ||||  ||| |||| ||||| ||||||||||| ||| |||||||| |||| |||||||||
Sbjct:                          24489  tccttgatattcttccttatgtaaacttggtgtattgcttttgtgcaggctgatatgggg 24430
putative pumilio/Mpt5 family RN> 201   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ A  D  M  G

Query:                           4112  cat------cctgttgtacagcagccctcacgtcctgctagtcgtaataccttttgatgag 4165
                                       |||      ||||| | ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24429  catggacatcctgtcgcacaacagccctcacgtcctgcaagtcgtaataccttttgatgaa 24370
putative pumilio/Mpt5 family RN> 205    H  G  H  P  V  A  Q  Q  P  S  R  P  A  S  R  N  T  F  D  E

Query:                           4166  aatgttgactctaataataacctgtctccatctgcatcacaaggcattggagcgccatct 4225
                                       |||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||| || ||||||
Sbjct:                          24369  aatgttgactctaataataatctgtctccgtctgcatcacaaggcattggtgcaccatct 24310
putative pumilio/Mpt5 family RN> 225    N  V  D  S  N  N  N  L  S  P  S  A  S  Q  G  I  G  A  P  S

Query:                           4226  ccatactgctatgcagctgttctgggttcatctttgtctagaaatggaactccagatcca 4285
                                       |||||| ||||||||||||||| || || |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24309  ccatacagctatgcagctgttctaggctcttctttgtctagaaatggaactccagatcca 24250
putative pumilio/Mpt5 family RN> 245    P  Y  S  Y  A  A  V  L  G  S  S  L  S  R  N  G  T  P  D  P

Query:                           4286  cagggcattgctagggtgcctagtccttgccttactcccattggcagtggaagagtgagt 4345
                                       |||| |||||||||||||||||||| || ||||||||||||| ||||||||| |||||
Sbjct:                          24249  caggccattgctagggtgcctagtccctgtcttactcccattgggagtggaagaatgagt 24190
putative pumilio/Mpt5 family RN> 265    Q  A  I  A  R  V  P  S  P  C  L  T  P  I  G  S  G  R  M  S

Query:                           4346  tcaaatgataagaggaacacaagtaatcaaagcccgttcaacggtgttacatctggtctc 4405
                                       |||||||||||||||||||||||||| || ||||| ||||| |||||||| |||||||||
Sbjct:                          24189  tcaaatgataagaggaacacaagtaaccagagcccattcaatggtgttacctctggtctc 24130
putative pumilio/Mpt5 family RN> 285    S  N  D  K  R  N  T  S  N  Q  S  P  F  N  G  V  T  S  G  L

Query:                           4406  aacgagtcttctgatcttgtcaatgctttatccggcttgaacctgtcaggcactggcggg 4465
                                       |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||| ||  |||
Sbjct:                          24129  aacgagtcttctgatcttgtcaatgctttatctggcttgaacctgtcatgcagtgttggg 24070
putative pumilio/Mpt5 family RN> 305    N  E  S  S  D  L  V  N  A  L  S  G  L  N  L  S  C  S  V  G

Query:                           4466  ctagatgaacgtggtcaggctgagcaagatgtcgaaaaggtcaggaactatatgtttgga 4525
                                        ||||||| ||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          24069  ttagatgatcggagtcaggctgagcaagatgtcgaaaaggtcaggaactatatgtttgga 24010
putative pumilio/Mpt5 family RN> 325    L  D  D  R  S  Q  A  E  Q  D  V  E  K  V  R  N  Y  M  F  G

Query:                           4526  ctgcaagatgggcataatgaagtcaatccacatgggttcccaaacagatctgatcaagc- 4584
                                       ||||||| ||||||||| |||||||||| ||||| ||||||||||| ||||||||||||
Sbjct:                          24009  ctgcaaggtgggcataacgaagtcaatcaacatgagttcccaaacaaatctgatcaagcc 23950
putative pumilio/Mpt5 family RN> 345    L  Q  G  G  H  N  E  V  N  Q  H  E  F  P  N  K  S  D  Q  A

Query:                           4585  --taggggaactgcttcgtgcaggaattcacaaatgagagggtcacaaggatctgcatat 4642
                                         || || |||||  ||||  ||||||||||||| |||||||| |||| |||||||| |||
Sbjct:                          23949  cataaggcaactggctcgttgaggaattcacaattgagagggccacacggatctgcctat 23890
putative pumilio/Mpt5 family RN> 365    H  K  A  T  G  S  L  R  N  S  Q  L  R  G  P  H  G  S  A  Y

Query:                           4643  aatagtggaagtggagtagctaatccttaccagcatcatgatagcccaaactatt 4697
                                       ||| |||||  |||| |||||||||||||||||| | ||||||||||||| ||||
Sbjct:                          23889  aatggtggagttggattagctaatccttaccagcaacttgatagcccaaattatt 23835
putative pumilio/Mpt5 family RN> 385    N  G  G  V  G  L  A  N  P  Y  Q  Q  L  D  S  P  N  Y
```

```
Score =  271 bits (141), Expect = 3e-69
Identities = 222/260 (85%), Gaps = 3/260 (1%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query:                          4691  aactattacgcattaaatccagctgtagcttctatgatggctaaccaacttggaactaat 4750
                                      ||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |  |||
Sbjct:                          23829 aacaattacgcattaaatccagctgtagcctctatgatggctaaccaacttgggaacaat 23770
putative pumilio/Mpt5 family RN> 405    N  N  Y  A  L  N  P  A  V  A  S  M  M  A  N  Q  L  G  N  N

Query:                          4751  aactattctccaatgtatgaaaatgcttctgccactttgggatattctgcaatggactcc 4810
                                      |||| | ||||||||||||| ||||  || ||   |||||||| ||||| |||||||||
Sbjct:                          23769 aactttgctccaatgtatgataatgtatccgc---tttgggattttctggaatggactct 23713
putative pumilio/Mpt5 family RN> 425    N  F  A  P  M  Y  D  N  V  S  A     L  G  F  S  G  M  D  S

Query:                          4811  agacttcatggtggaagttttgtttcttctggtcaaaacctctctgaatcacgaaatatt 4870
                                      |||| ||||||  || | ||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||
Sbjct:                          23712 agacatcatggacgaggctttgtatcttctggtcaaaacctctctgaatcacgtaatctt 23653
putative pumilio/Mpt5 family RN> 444    R  H  H  G  R  G  F  V  S  S  G  Q  N  L  S  E  S  R  N  L

Query:                          4871  ggcagggtcggtaatcgaatgatggaaggaggtacgggtcacccgtcacatcttgcagac 4930
                                      |||||  || ||||||||||||||| ||||||| | |||| || ||||||| | | ||||
Sbjct:                          23652 ggcagattcagtaatcgaatgatgggaggaggtgctggtctccagtcacatatggtagac 23593
putative pumilio/Mpt5 family RN> 464    G  R  F  S  N  R  M  M  G  G  G  A  G  L  Q  S  H  M  V  D

Query:                          4931  ccgatgtatcatcagtatgc 4950
                                      || |||||| ||||||||||
Sbjct:                          23592 ccaatgtataatcagtatgc 23573
putative pumilio/Mpt5 family RN> 484    P  M  Y  N  Q  Y  A

Score =  246 bits (128), Expect = 1e-61
Identities = 261/315 (82%), Gaps = 10/315 (3%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query:                          6956  agagagacaatataatcaattctatcgcattacaatgtctctaagtggttgtt--cttat 7013
                                      |||||||||| |||| || || |||  |||| || ||||||||||||||| ||  |||||
Sbjct:                          21601 agagagacaaaataagcatttttatgacatttcattgtctctaagtggttcttttcttat 21542
putative pumilio/Mpt5 family RN> 21601 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          7014  atgcagagaggagaatggctttgcagtcattaccccagcctctggtggcgtaaggccgca 7073
                                      ||||||||||||||||||||||||||||  || ||||||| | | |||| |||| ||  |
Sbjct:                          21541 atgcagagaggagaatggctttgcagtccctaacccagccccagatggcttaagacctta 21482
putative pumilio/Mpt5 family RN> 954   ~~~~~~E  R  R  M  A  L  Q  S  L  T  Q  P  Q  M  A ^^^

Query:                          7074  agtgttgtacagcttaactagggtggatggctctgccataacgttttgagaattaggtaa 7133
                                      |||  |||||||||||||||||||||||||  ||||| || ||||||||||||||||||
Sbjct:                          21481 agtaatgtacagcttaactagggtggatggggctgccgtagcgttttgagaattaggtaa 21422

Query:                          7134  gatctaaacc---aaaaatctgcggagaaataatgagagagagctttgttttgttctccg 7190
                                      ||||||||||   || ||||||||| |||||  |||  ||||||||||||   ||||| |
Sbjct:                          21421 gatctaaaccggaaataatctgcggggaaattgtgaaggagagctttgtt---ttctctg 21365

Query:                          7191  caaaatctgt-acattgtgtagtttcttaccgttttgactatacatagaaccaaagatcc 7249
                                      | |||||||| | ||||||||||||  |  || |||  ||||||||||||| ||| ||||
Sbjct:                          21364 ctaaatctgtaaaattgtgtagtttgcttacggtttttctatacatagaacgaaacatcc 21305

Query:                          7250  c-ccttaggctgatg 7263
                                      | | ||||||||||
Sbjct:                          21304 ctctttaggctgatg 21290

CPU time:     1.29 user secs.     0.03 sys. secs      1.32 total secs.

Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12
```

```
Gapped
Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12


Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 41
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 41
Number of successful extensions: 26
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 3866
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 26
effective length of query: 3840
effective length of database: 5,156,210,751
effective search space: 19799849283840
effective search space used: 19799849283840
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```

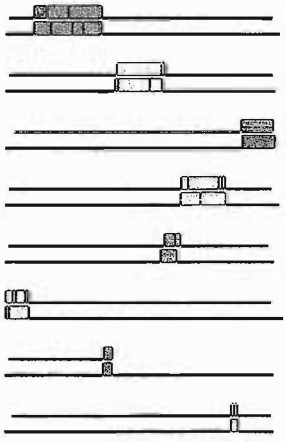
# Blast 2 Sequences results

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

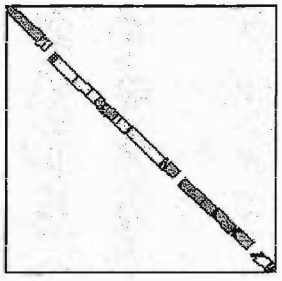
**BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.2 [Dec-14-2001]**

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.0000 wordsize: 11 Filter ☑ Align

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Sequence 1** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 3866 (3398 .. 7263) |
| **Sequence 2** | gi 6598426 | Arabidopsis thaliana chromosome II section 166 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F16P2, T27A16 | **Length** 4009 (16069 .. 20077) |



2

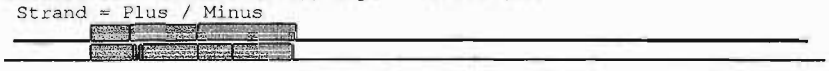


1

NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

```
Score = 1140 bits (593), Expect = 0.0
Identities = 856/973 (87%), Gaps = 14/973 (1%)
 Strand = Plus / Minus
```

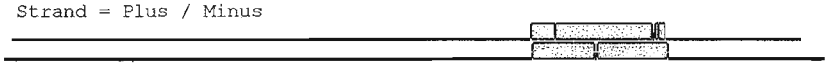


```
Query:                          5916  tatttttaactttttaggcaattgaggtggttgatctagaccagaaaatccaaatggtca 5975
                                      ||| |||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||| |
Sbjct:                          17455 tatgtttatccttttaggcaattgaggtggttgatctagaccagaaaattaaaatggtga 17396
putative pumilio/Mpt5 family RN> 727   ~~~~~~~~~~~~~~~~~ A  I  E  V  V  D  L  D  Q  K  I  K  M  V

Query:                          5976  aagaacttgatggacatgtgatgcgatgtgtacgtgatcagaatgggaaccatgtggttc 6035
                                      ||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          17395 aagaactcgatggacatgtgatgcgatgcgtacgtgatcagaatgggaaccatgtggttc 17336
putative pumilio/Mpt5 family RN> 741   K  E  L  D  G  H  V  M  R  C  V  R  D  Q  N  G  N  H  V  V

Query:                          6036  aaaagtgtattgaatgtgtgcctgaagaaaacattgagtttattatttcaactttctttg 6095
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||| || |||||||
Sbjct:                          17335 aaaagtgtattgaatgtgtgcctgaagaaaacatcgaatttattatttccaccttctttg 17276
putative pumilio/Mpt5 family RN> 761   Q  K  C  I  E  C  V  P  E  E  N  I  E  F  I  I  S  T  F  F

Query:                          6096  gccatgtggtgaccctctccactcacccatacgggtgccgtgttattcaggttcttccta 6155
                                      || |||| |||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||| ||
Sbjct:                          17275 gcaatgttgtgaccctctccactcacccatatgggtgccgagttattcaggttcttgctc 17216
putative pumilio/Mpt5 family RN> 781   G  N  V  V  T  L  S  T  H  P  Y  G  C  R  V  I  Q ~~~~~~~~~~
```

```
Query:                         6156  ctggtgattaagaaatatgacacctttttcgatcttatgcttctatgtaaaactgtttcc 6215
                                      | || || ||||||| || |||  || | ||||||||||||||| ||||||   ||| 
Sbjct:                         17215 ttagtaataaagaaaaattacacagttcttgatcttatgcttctaagtaaaac-acttct 17157
putative pumilio/Mpt5 family RN> 17215 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~

Query:                         6216  catctcctgttgcagagagtattggaacactgccataaccctgatacacagagtaaggtt 6275
                                     | |||  ||||||||| |||||| |||||||||| ||||||||||| |||||||||||||
Sbjct:                         17156 cgtcttatgttgcagagggtattggagcactgccatgaccctgatactcagagtaaggtt 17097
putative pumilio/Mpt5 family RN> 798   ~~~~~~~~~~~~~~~ R  V  L  E  H  C  H  D  P  D  T  Q  S  K  V

Query:                         6276  atggaagaaatcctgtccactgttagtatgctgacccaagatcagtatggaaactatgtt 6335
                                     ||||| ||||||| |||| ||| |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                         17096 atggatgaaatcatgtcaactattagtatgctggcccaagatcagtatggaaactatgtt 17037
putative pumilio/Mpt5 family RN> 813   M  D  E  I  M  S  T  I  S  M  L  A  Q  D  Q  Y  G  N  Y  V

Query:                         6336  gttcaggtttgtaaaagatgagttttactgcaactcttgannnnnnnattggttg-atct 6394
                                      ||||||||||| ||| | |||| |||| |||||  | |         ||||||  |  
Sbjct:                         17036 attcaggtttgttaaaaaagagttatactacaactggtta-ttttgtataggttgcttaa 16978
putative pumilio/Mpt5 family RN> 833   I  Q ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                         6395  aaactgatacatgttttgtgtacagcatgtactggagcatggaaagcctgatgagcgcac 6454
                                     ||||| ||||| ||||||| ||||||||||| |||| || ||||||||||||||||||| ||
Sbjct:                         16977 aaactaatacacgttttgttgacagcatgtattggaacacggaaagcctgatgagcgtac 16918
putative pumilio/Mpt5 family RN> 835   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ H  V  L  E  H  G  K  P  D  E  R  T

Query:                         6455  tgtgataatcaaagagttagcggggaagattgttcagatgagccaacagaagtttgcatc 6514
                                     |||||| |||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct:                         16917 tgtgattatcaaggaattagcggggaagattgttcagatgagccaacagaagtttgcttc 16858
putative pumilio/Mpt5 family RN> 847    V  I  I  K  E  L  A  G  K  I  V  Q  M  S  Q  Q  K  F  A  S

Query:                         6515  aaacgttgttgagaagtgtttgacttttggaggtcctgaggaacgggaattgctggtgaa 6574
                                     ||||||||||||||| |||||||||||||||||||| || |||||||||||||| ||||| ||
Sbjct:                         16857 aaacgttgttgagaaatgtttgacttttggagggccagaggaacgggaatttctggtaaa 16798
putative pumilio/Mpt5 family RN> 867    N  V  V  E  K  C  L  T  F  G  G  P  E  E  R  E  F  L  V  N

Query:                         6575  tgagatgctgggcacaactgatgaaaacgagcctcttcaggtttgtcaaacacatgcttt 6634
                                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct:                         16797 tgagatgctgggcacaactgatgaaaacgagcctcttcaggtttgtcaaacacatacttt 16738
putative pumilio/Mpt5 family RN> 887    E  M  L  G  T  T  D  E  N  E  P  L  Q ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                         6635  cagatgatggtctgggggaacaccgaacaaagaatctaatatagctcataagtttct---t 6691
                                     |||||||| || ||| | |      || |||| || || ||||||||||| ||||   |
Sbjct:                         16737 cagatgattgt-tggagaa------aataaagaaact-attagctcataagcttcttcat 16686
putative pumilio/Mpt5 family RN> 16737 ~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~      ~~~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                         6692  cttgtgtatataggcgatgatgaaggatcagtttgcaaactatgtagtgcaaaaagtcct 6751
                                     ||| ||||| |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||  |
Sbjct:                         16685 cttttgtatttaggcgatgatgaaggatcagtttgccaactatgtagtgcaaaaagtttt 16626
putative pumilio/Mpt5 family RN> 900   ~~~~~~~~~~~~~~~ A  M  M  K  D  Q  F  A  N  Y  V  V  Q  K  V  L

Query:                         6752  ggagacatgtgatgaccaacagcgtgaactgatactgactcgtattaaagtgcatctgaa 6811
                                      |||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||   |||||||||||||||||| ||
Sbjct:                         16625 agagacatgtgatgaccaacagcgtgagctgatccttggtcgtattaaagtgcatctcaa 16566
putative pumilio/Mpt5 family RN> 916    E  T  C  D  D  Q  Q  R  E  L  I  L  G  R  I  K  V  H  L  N

Query:                         6812  tgctctaaagaaatacacttacggaaagcatatcgttgcccgtgttgaaaaactcgttgc 6871
                                     |||| ||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct:                         16565 tgctttaaagaaatacacttatggaaagcatatcgttgctcgtgttgaaaaactcgttgc 16506
putative pumilio/Mpt5 family RN> 936    A  L  K  K  Y  T  Y  G  K  H  I  V  A  R  V  E  K  L  V  A

Query:                         6872  tgctggaggtatg 6884
                                     |||||||||||||
Sbjct:                         16505 tgctggaggtatg 16493
putative pumilio/Mpt5 family RN> 956    A  G ~~~~~~

Score =  979 bits (509), Expect = 0.0
Identities = 648/710 (91%), Gaps = 14/710 (1%)
 Strand = Plus / Minus
```

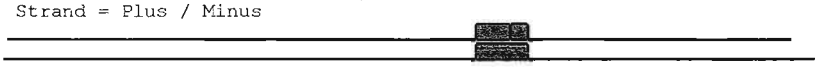
```
Query:                          4965  atgctgattcgtttgatcttcttaatgacccttcaatggacaggaactat---ggtaatt 5021
                                      ||||||||||| |||||||||| ||||| ||||| ||||||  ||||| |   |||||||
Sbjct:                          18407 atgctgattcgcttgatcttctcaatgatccttccatggacgtgaactttatgggtaatt 18348
putative pumilio/Mpt5 family RN> 497   Y  A  D  S  L  D  L  L  N  D  P  S  M  D  V  N  F  M  G  N

Query:                          5022  catacatgaatatgcttgaaattcagagggcttatctcggatctcagaaatcacagtatg 5081
                                      ||||||||||||||||||| | ||||||||||||| ||| | ||||||||||||||| |
Sbjct:                          18347 catacatgaatatgcttgaactccagagggcttatcttggagcacagaaatcacagtacg 18288
putative pumilio/Mpt5 family RN> 517   S  Y  M  N  M  L  E  L  Q  R  A  Y  L  G  A  Q  K  S  Q  Y

Query:                          5082  gtcttccttacaaatcagggagccctaacagccatagctattatggcagtccaacatttg 5141
                                      || | ||||||||||| |||||||||||||||| | | ||||||| ||||||||||||
Sbjct:                          18287 gtgtcccttacaaatccgggagccctaacagccacaccgattatgggagtccaacatttg 18228
putative pumilio/Mpt5 family RN> 537   G  V  P  Y  K  S  G  S  P  N  S  H  T  D  Y  G  S  P  T  F

Query:                          5142  ggtctaatatgtcatatcctggcagcccattggctcatcatggtatgccaaactctctta 5201
                                      ||||         |||||||||||||||||||||||||||  | |||| || ||||||
Sbjct:                          18227 ggtc---------atatcctggcagcccattggctcatcatcttctgcctaattctcttg 18177
putative pumilio/Mpt5 family RN> 557   G  S           Y  P  G  S  P  L  A  H  H  L  L  P  N  S  L

Query:                          5202  tgtcaccttacagccctatgagacgaggtgaagtaaatatgcgatatcccgctgcaacaa 5261
                                      ||||||| |  |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||
Sbjct:                          18176 tgtcaccctgtagccctatgagacgaggtgaagttaatatgcgatatccctctgcaacaa 18117
putative pumilio/Mpt5 family RN> 574   V  S  P  C  S  P  M  R  R  G  E  V  N  M  R  Y  P  S  A  T

Query:                          5262  gaaactatactggaggggtaatgggttcttggcacatggatgctagtttggatgaaggat 5321
                                      |||||||  | |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct:                          18116 gaaactacgcaggaggggtaatgggttcctggcacatggatgctagtttggatgaaggct 18057
putative pumilio/Mpt5 family RN> 594   R  N  Y  A  G  G  V  M  G  S  W  H  M  D  A  S  L  D  E  G

Query:                          5322  ttggatcttcaatgcttgaagagttcaaaagtaacaaaacaagagggttcgaactttctg 5381
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| |||
Sbjct:                          18056 ttggatcttcaatgcttgaagagttcaaaagtaacaaaacaagaggattcgaacttgctg 17997
putative pumilio/Mpt5 family RN> 614   F  G  S  S  M  L  E  E  F  K  S  N  K  T  R  G  F  E  L  A

Query:                          5382  aaatagctggccatgttgtagagttcaggtattccctttaaattcttttacctttttct 5441
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||  ||||||| |||||||||
Sbjct:                          17996 aaatagctggccatgttgtagagttcaggtattcccttgaatgtcttttatctttttct 17937
putative pumilio/Mpt5 family RN> 634   E  I  A  G  H  V  V  E  F  S~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Query:                          5442  tgtgtacactttgtcccaagctaacgcgtacttggggattttcatgaccagttcggatca 5501
                                      |||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          17936 tgtgtacaatttgtcccaagctaacgtgtacttggggattttcatgaccagttcggatca 17877
putative pumilio/Mpt5 family RN> 644   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~  S  D  Q

Query:                          5502  gtatggaagccggtttattcagcagaaactcgagacagcaacaactgatgagaaaaacat 5561
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct:                          17876 gtatggaagccggtttattcagcagaaactcgagacagcaacaagtgatgagaaaaacat 17817
putative pumilio/Mpt5 family RN> 647     Y  G  S  R  F  I  Q  Q  K  L  E  T  A  T  S  D  E  K  N  M

Query:                          5562  ggtttatgaggagatcatgccaaaagctcttgccctgatgactgacgtttttggaaacta 5621
                                      |||||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          17816 ggtttatgaggagatcatgccacacgctcttgccctgatgactgacgtttttggaaacta 17757
putative pumilio/Mpt5 family RN> 667     V  Y  E  E  I  M  P  H  A  L  A  L  M  T  D  V  F  G  N  Y

Query:                          5622  tgtgattcagaaggtatagatttatttagtcttcctctttgattttattt 5671
                                      |||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct:                          17756 tgtgattcagaagg--tagatttatttagtcttcctctttggttttattt 17709
putative pumilio/Mpt5 family RN> 687     V  I  Q  K ~  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Score =  788 bits (410), Expect = 0.0
Identities = 464/491 (94%)
 Strand = Plus / Minus
```

```
Query:                          3401  atgataccggaactagggagaagaccgatgcatagaggtaacgaagattcatcttttggg 3460
                                      ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          20077 atgataccggaactggggagaagaccgatgcatagagggaacgaagattcatcttttggg 20018
putative pumilio/Mpt5 family RN> 1     M  I  P  E  L  G  R  R  P  M  H  R  G  N  E  D  S  S  F  G

Query:                          3461  gatgattacgagaaagagattggagtattgcttggtgagcagcagagaaggcaagtagag 3520
                                      |||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          20017 gatgattatgagaaagagattggagtattacttggtgagcagcagagaaggcaagtagaa 19958
putative pumilio/Mpt5 family RN> 21    D  D  Y  E  K  E  I  G  V  L  L  G  E  Q  Q  R  R  Q  V  E

Query:                          3521  gcggatgagcttgagagagagcttaacttgtatagaagtggctctgctccaccgactgtt 3580
                                      || ||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          19957 gctgatgagcttgagagagagcttaatttgtataggagtggctctgctccaccgactgtt 19898
putative pumilio/Mpt5 family RN> 41    A  D  E  L  E  R  E  L  N  L  Y  R  S  G  S  A  P  P  T  V

Query:                          3581  gatggttctcttagtgctgccggagggctttttagcggcggaggtggggcttcttttctg 3640
                                      ||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||
Sbjct:                          19897 gatggttctgttagtgctgctggagggctttttagcggcggaggtggggctccttttttg 19838
putative pumilio/Mpt5 family RN> 61    D  G  S  V  S  A  A  G  G  L  F  S  G  G  G  G  A  P  F  L

Query:                          3641  gaatttggtggagttaataagggtaatgggtttggtggtgatgatgaggagtttaggaaa 3700
                                      || |||||||||||  || |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct:                          19837 gagtttggtggaggcaacaagggtaatgggtttggtggcgatgatgaggagtttaggaaa 19778
putative pumilio/Mpt5 family RN> 81    E  F  G  G  G  N  K  G  N  G  F  G  G  D  D  E  E  F  R  K

Query:                          3701  gatccagcttacttgtcttattactatgctaatatgaagttgaatccgaggttgccacct 3760
                                      ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          19777 gatccggcttacttgtcttattactatgctaatatgaagttgaatccgaggttgccaccg 19718
putative pumilio/Mpt5 family RN> 101   D  P  A  Y  L  S  Y  Y  Y  A  N  M  K  L  N  P  R  L  P  P

Query:                          3761  cctttgatgtctagggaggatttgagggttgctcagaggcttaaagggagtaataatgtg 3820
                                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct:                          19717 cctttgatgtctagggaggatttgagggttgctcagaggcttaaagggagtagtaatgtt 19658
putative pumilio/Mpt5 family RN> 121   P  L  M  S  R  E  D  L  R  V  A  Q  R  L  K  G  S  S  N  V

Query:                          3821  ttaggtggtgttggggataggagaaaagtgaatgacagtcggtctttgttctctatgcca 3880
                                      |||||||||||||||||||||||| ||||| ||||| ||||  ||||| ||||||||||||
Sbjct:                          19657 ttaggtggtgttggggataggaggaaagttaatgatagtcaatctttattctctatgcca 19598
putative pumilio/Mpt5 family RN> 141   L  G  G  V  G  D  R  R  K  V  N  D  S  Q  S  L  F  S  M  P

Query:                          3881  cctggttttga 3891
                                      ||||||||||||
Sbjct:                          19597 cctggttttga 19587
putative pumilio/Mpt5 family RN> 161   P  G  F  D

Score =  785 bits (408), Expect = 0.0
Identities = 576/650 (88%), Gaps = 19/650 (2%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query:                          4058  atactcttgcttatataaacttggtggattactttt-gtgtaggcggatatggggcat-- 4114
                                      ||| |||||||||| |||||||| |||||| ||||| ||| |||| ||||||||||||
Sbjct:                          19315 atattcttgcttatgtaaacttgatggattgctttttgtgcaggctgatatggggcatgg 19256
putative pumilio/Mpt5 family RN> 19315 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ A  D  M  G  H  G

Query:                          4115  ----cctgttgtacagcagccctcacgtcctgctagtcgtaataccttttgatgagaatgt 4170
                                          |||||     |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct:                          19255 acatcctgtcactaagcagccctcacgtcctgcaagtcgtaataccttttgatgaaaatgt 19196
putative pumilio/Mpt5 family RN> 215    H  P  V  T  K  Q  P  S  R  P  A  S  R  N  T  F  D  E  N  V

Query:                          4171  tgactctaataataacctgtctccatctgcatcacaaggcattggagcgccatctccata 4230
                                      ||||||||| ||||| |||||||||||||||||| ||||||||||| || ||||||||||||
Sbjct:                          19195 tgactctaagaataatctgtctccatctgcatcgcaaggcattggtgcaccatctccata 19136
putative pumilio/Mpt5 family RN> 235    D  S  K  N  N  L  S  P  S  A  S  Q  G  I  G  A  P  S  P  Y

Query:                          4231  ctgctatgcagctgttctgggttcatctttgtctagaaatggaactccagatccacaggg 4290
```

```
                                        | ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                            19135 cagctatgcagctgttctgggttcgtctttgtctagaaatggaactccagatccacaggc 19076
putative pumilio/Mpt5 family RN> 255     S  Y  A  A  V  L  G  S  S  L  S  R  N  G  T  P  D  P  Q  A

Query:                            4291  cattgctagggtgcctagtccttgccttactcccattggcagtggaagagtgagttcaaa 4350
                                        ||||||||||||||||||||| || |||||||||||||| ||||| |||||||||||||
Sbjct:                            19075 cattgctagggtgcctagtccctgtcttactcccattgggagtgggagagtgagttcaaa 19016
putative pumilio/Mpt5 family RN> 275     I  A  R  V  P  S  P  C  L  T  P  I  G  S  G  R  V  S  S  N

Query:                            4351  tgataagaggaacacaagtaatcaaagcccgttcaacggtgttacatctggtctcaacga 4410
                                        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||         ||| ||||||||
Sbjct:                            19015 tgataagaggaacacaagtaatcaaagcccgttcaacgg---------tgggctcaacga 18965
putative pumilio/Mpt5 family RN> 295     D  K  R  N  T  S  N  Q  S  P  F  N  G           G  L  N  E

Query:                            4411  gtcttctgatcttgtcaatgctttatccggcttgaacctgtcaggcactggcgggctaga 4470
                                        ||||||||||||||||||||||||||| ||| |||||||||| |||| ||||||| ||||
Sbjct:                            18964 gtcttctgatcttgtcaatgctttatctggcatgaacctgtctggcagtggcgggttaga 18905
putative pumilio/Mpt5 family RN> 312     S  S  D  L  V  N  A  L  S  G  M  N  L  S  G  S  G  G  L  D

Query:                            4471  tgaacgtggtcaggctgagcaagatgtcgaaaaggtcaggaactatatgtttggactgca 4530
                                        ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                            18904 tgaacgtggtcaggctgagcaagatgtggaaaaggtcaggaactatatgtttggactgca 18845
putative pumilio/Mpt5 family RN> 332     E  R  G  Q  A  E  Q  D  V  E  K  V  R  N  Y  M  F  G  L  Q

Query:                            4531  agatgggcataatgaagtcaatccacatgggttcccaaacagatctgatcaagc---tag 4587
                                        || |||||||| |||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||    |
Sbjct:                            18844 aggtgggcataacgaagtcaatcaacatgggttcccaaacaaatctgatcaagcccagaa 18785
putative pumilio/Mpt5 family RN> 352     G  G  H  N  E  V  N  Q  H  G  F  P  N  K  S  D  Q  A  Q  K

Query:                            4588  gggaactgcttcgtgcaggaattcacaaatgagagggtcacaaggatctgcatataatag 4647
                                        || |||||  | ||  |||||||||||| |||||||| ||||||||||| | ||||||
Sbjct:                            18784 ggcaactggcttgttgaggaattcacaattgagaggggcacaaggatctacctataatga 18725
putative pumilio/Mpt5 family RN> 372     A  T  G  L  L  R  N  S  Q  L  R  G  A  Q  G  S  T  Y  N  D

Query:                            4648  tggaagtggagtagctaatccttaccagcatcatgatagcccaaactatt 4697
                                        |||| ||||||||||| ||  |||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct:                            18724 tggaggtggagtagctactcagtaccagcatcttgatagcccaaactatt 18675
putative pumilio/Mpt5 family RN> 392     G  G  G  V  A  T  Q  Y  Q  H  L  D  S  P  N  Y

Score =  308 bits (160), Expect = 3e-80
Identities = 234/266 (87%), Gaps = 6/266 (2%)
 Strand = Plus / Minus
```



```
Query:                            4691  aactattacgcattaaatccagctgtagcttctatgatggctaaccaacttggaactaat 4750
                                        ||| |||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                            18669 aacaattatggattaaatccagctgtagcttctatgatggctaaccaacttggaactaat 18610
putative pumilio/Mpt5 family RN> 410     N  N  Y  G  L  N  P  A  V  A  S  M  M  A  N  Q  L  G  T  N

Query:                            4751  aactattctccaatgtatgaaaatgcttctgc--ca----ctttgggatattctgcaatg 4804
                                        ||||||||||||| ||||||||||||||||||||  ||    || |||||| ||||| ||||
Sbjct:                            18609 aactattctccagtgtatgaaaatgcttctgcagcatctgctatgggattttctggaatg 18550
putative pumilio/Mpt5 family RN> 430     N  Y  S  P  V  Y  E  N  A  S  A  A  S  A  M  G  F  S  G  M

Query:                            4805  gactccagacttcatggtggaagttttgtttcttctggtcaaaacctctctgaatcacga 4864
                                        || |||||||||||||||| ||| ||| || |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                            18549 gattccagacttcatggtggaggttatgtatcatctggtcaaaacctctctgaatcacgt 18490
putative pumilio/Mpt5 family RN> 450     D  S  R  L  H  G  G  G  Y  V  S  S  G  Q  N  L  S  E  S  R

Query:                            4865  aatattggcagggtcggtaatcgaatgatggaaggaggtacgggtcacccgtcacatctt 4924
                                        ||| |||||||  || |||||||||||||| ||||||||| ||||  | ||||||| |
Sbjct:                            18489 aatcttggcagattcagtaatcgaatgatgggaggaggtactggtcttcagtcacatatg 18430
putative pumilio/Mpt5 family RN> 470     N  L  G  R  F  S  N  R  M  M  G  G  G  T  G  L  Q  S  H  M

Query:                            4925  gcagacccgatgtatcatcagtatgc 4950
                                        ||||| || |||||||||||||||||
Sbjct:                            18429 gcagatccaatgtatcatcagtatgc 18404
putative pumilio/Mpt5 family RN> 490     A  D  P  M  Y  H  Q  Y  A
```

```
Score =  264 bits (137), Expect = 6e-67
Identities = 246/283 (86%), Gaps = 12/283 (4%)
 Strand = Plus / Minus

Query:                          6988  caatgtctctaagtgg--ttgttcttatatgcagagaggagaatggctttgcagtcatta 7045
                                      ||||||||||||||||  || |||| |||| |||||||||| ||||||||||||||  ||
Sbjct:                          16346 caatgtctctaagtgggttttttctcatatacagagaggaggatggctttgcagtcccta 16287
putative pumilio/Mpt5 family RN> 16346 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~E  R  R  M  A  L  Q  S  L

Query:                          7046  ccccagcctctggtggcgtaaggccgcaagtgttgtacagcttaactagggtggatggct 7105
                                       ||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          16286 acccagcctcagatggcgtaaggccgcaagtgttgtacagcttaactagggtggatggct 16227
putative pumilio/Mpt5 family RN> 967    T  Q  P  Q  M  A ^^^

Query:                          7106  ctgccataacgttttgagaattaggtaagatctaaacc---aaaaatctgcggagaaata 7162
                                      |||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||   || |||||||||  ||||
Sbjct:                          16226 ctgccatagcgttttgagaattaggtaaaatctaaaccggaaataatctgcgggaaaatt 16167

Query:                          7163  atgagagagagctttgttttgttctccgcaaaatctgt-acattgtgtagtttcttaccg 7221
                                       |||  |||||||||||||   ||||| || |||||||| | ||||||||||| ||||| |
Sbjct:                          16166 gtgaaggagagctttgtt---ttctctgc-aaatctgtaaaattgtgtagttgcttacgg 16111

Query:                          7222  ttttgactatacatagaaccaaagatccc-ccttaggctgatg 7263
                                      ||||  |||||||||||||||| ||||| | ||||||||||||
Sbjct:                          16110 tttt-tctatacatagaaccaaacatcccactttaggctgatg 16069

Score =  231 bits (120), Expect = 4e-57
Identities = 136/144 (94%)
 Strand = Plus / Minus

Query:                          5700  agagattcctggatgttgcttatcttcctacagttctttgagcatggactcccaccacag 5759
                                      ||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          17695 agagattcctgaattttgcttatcttcctacagttctttgagcatggactcccaccacag 17636
putative pumilio/Mpt5 family RN> 691   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ F  F  E  H  G  L  P  P  Q

Query:                          5760  agaagagaattgggagagaaactcattgacaatgttttgcctcttagcttacagatgtat 5819
                                      ||||||||||||| ||| |||||| ||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct:                          17635 agaagagaattggcagataaactctttgacaatgttttgcctcttagcctacagatgtat 17576
putative pumilio/Mpt5 family RN> 700    R  R  E  L  A  D  K  L  F  D  N  V  L  P  L  S  L  Q  M  Y

Query:                          5820  ggttgtcgtgtcatccagaaggta 5843
                                      ||||||||||| || |||||||||
Sbjct:                          17575 ggttgtcgtgttattcagaaggta 17552
putative pumilio/Mpt5 family RN> 720    G  C  R  V  I  Q  K ~~~~

Score =  112 bits (58), Expect = 3e-21
Identities = 101/120 (84%), Gaps = 9/120 (7%)
 Strand = Plus / Minus

Query:                          3887  tttgaggctggaaaacctggtgcttctgcttctgagtgggatgctaatggattgattggt 3946
                                      ||||||| ||  ||| || |||||||| ||||||| |||||||||||||||||||| |||
Sbjct:                          19567 tttgaggttgagaaaactagtgcttcttcttctgaatgggatgctaatggattgatcggt 19508
putative pumilio/Mpt5 family RN> 171    F  E  V  E  K  T  S  A  S  S  S  E  W  D  A  N  G  L  I  G

Query:                          3947  ttg---------ggacttggaggcaagcagaagagttttgctgatatctttcaggttggt 3997
                                      |||         ||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:                          19507 ttgccgggtttggggattggaggcaagcagaagagttttgctgatatctttcaggttggt 19448
putative pumilio/Mpt5 family RN> 191    L  P  G  L  G  I  G  G  K  Q  K  S  F  A  D  I  F  Q ~~~~~~

CPU time:     1.61 user secs.     0.05 sys. secs      1.66 total secs.
```

```
Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12

Gapped
Lambda     K      H
    1.33    0.621     1.12


Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 52
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 52
Number of successful extensions: 32
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 3866
length of database: 5,162,042,083
effective HSP length: 26
effective length of query: 3840
effective length of database: 5,156,210,751
effective search space: 19799849283840
effective search space used: 19799849283840
T: 0
A: 30
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 21 (41.1 bits)
```