DANIELA MARIA GERÔNIMO

**Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em
plantas forrageiras tropicais**

Pirassununga

2011

DANIELA MARIA GERÔNIMO

**Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em
plantas forrageiras tropicais**

Pirassununga

2011

DANIELA MARIA GERÔNIMO

**Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em plantas
forrageiras tropicais**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Nutrição e Produção Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

Pirassununga

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Conferido Somente Ficha
Catalográfica

4/8/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2486
FMVZ

Gerônimo, Daniela Maria

Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em plantas
forrageiras tropicais / Daniela Maria Gerônimo. -- 2011.
119 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção
Animal, Pirassununga, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. *Brachiaria brizantha*. 2. *Panicum maximum*. 3. Lignificação.
4. Sequenciamento. 5. Plantas forrageiras. I. Título.

ERRATA

GERÔNIMO, D. M. **Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em plantas forrageiras tropicais.** 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	119 f.	118 f.
Resumo	2º	lignificação em forrageiras	lignificação em plantas forrageiras
Resumo	3º	in tropical forage	in tropical forage plants
Resumo	3º	119 f.	118 f.
Abstract	2º	in tropical forage.	in tropical forage plants.
Abstrac	3º	lignificação em forrageiras	lignificação em plantas forrageiras
Abstract	3º	119 f.	118 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em plantas forrageiras tropicais”, protocolado sob o nº 2184/2011, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research “Molecular characterization of three genes of the lignification in tropical forages”, protocol number 2184/2011, utilizing not using animals, under the responsibility Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GERÔNIMO, Daniela Maria

Título: Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em plantas forrageiras tropicais.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Nutrição e Produção Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico,

*Aos meus queridos e amados pais, Nelson e Regina Célia,
pelo amor, dedicação, compreensão e pelo empenho para
que eu conseguisse chegar até aqui.*

Ofereço,

*Ao meu avô e herói,
Américo Marioto (In memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e do aprendizado.

Agradeço ao meu orientador, Professor Luis Felipe, pela orientação, paciência, compreensão e confiança.

Aos meus pais, Nelson e Regina Célia, por todo amor, dedicação, compreensão e paciência. Aos meus irmãos, Nelson e Daniel, que completam minha alegria de viver.

Agradeço sem cessar a Deus por ter me dado um grande presente, meu namorado André. Meu amigo e companheiro para todas as horas, o ombro onde despejei todos meus problemas, aflições, tristezas e também as alegrias, sem você, meu grande amor, a caminhada seria muito mais difícil e triste.

E ao mesmo tempo em que conheci meu grande amor, ganhei uma nova família, uma segunda mãe e um segundo pai, D. Lúcia e seu Bira, que me acolheram e me tratam como uma filha com todo amor e carinho, não tenho palavras para agradecer o grande bem que vocês me fazem.

Agradeço a essa nova família que me acolheu, Dani, Maurinho, Alexandre, Suzi, Carla, Paulinho, Andréia, Lucas, Bia, Tia Edna e Tio Dico, Claudinha e Ju. Não me esqueço de agradecer aos anjos que me fizeram sorrir quando eu mais precisava Gui, Biel, Pipe e Matheus.

Não posso deixar de agradecer às pessoas que me acolheram em Pirassununga, como a Ju Diniz que me levou para sua casa no primeiro dia que me conheceu e foi minha companheira de baladas e juntas demos muitas risadas. A Paulinha e a Dani, que nos primeiros dias que cheguei a Pirassununga, me levaram para fazer coletas e abater as codornas, agradeço aos bons momentos que passamos juntas. Agradeço a Nara, minha grande amiga, que me escutou com todo carinho, e esteve comigo nos momentos ruins e nos melhores também, tenho saudade dos tempos que nos víamos com mais frequência e fofocávamos horrores e saíamos para dar muitas risadas. A Ju Mega, foi minha ouvinte e minha amiga, não

tenho palavras para descrever o carinho que sinto por você. Ao meu amigo Tenente (Rodrigo) que nos proporcionou dias de lazer e muitas risadas em seu “Clube Ribeiro” e por ter me viciado em um dos melhores seriados que já assisti, The Big Bang Theory. Agradeço a Babi e a Marina pela amizade e pelas risadas que já demos juntas. Não posso deixar de agradecer a Lúcia, técnica do Laboratório de Genômica Funcional, que foi muito compreensiva com os momentos difíceis que passei e foi muito solidária me ajudando demais, além de ter me apresentado à Martini que muito me ajudou nas clonagens dos meus produtos de PCR. E adorei conhecer o pessoal do mestrado e doutorado que foram, muitas vezes, companheiros de balada e de muitos momentos bons, a Ju Barreiro, Mineiro, Henrique, Bruno, Dani Guria, Bizão, Jeferson, Lenita, Anaí, Bixuca, Mayara, Ana Paula, Andres, Boi, Francine, Fernandinha, Nayara, Henry, Iaçanã, Carol Tobias, Monalissa (minha carona oficial), Jhony, Esther, Lari, Camila e Claudinha.

Agradeço aos dois anos de convivência com as meninas da república “Só fadinhas”, Potranca, Bodinha, Caiçara e mais recentemente Tarraxa. Agradeço em especial a Caiçara que foi minha amiga, companheira e minha “blódi” para todas as horas. Não posso deixar de agradecer ao Lucas e sua família, Céci e Seu Jairo, que sempre me receberam em seu rancho com muito torresmo e cerveja. Aos estagiários Bia, Bodinha, Caiçara, Gabi (estagiária e amiga), Biju e Marco que muito ajudaram e contribuíram para as atividades do laboratório.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção animal pelos ensinamentos e convívio.

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

*“De nuestros miedos nacen nuestros corajes
y en nuestras dudas viven nuestras certezas.
Los sueños anuncian otra realidad posible
y los delirios otra razón.
En los extraviados nos esperan hallazgos,
porque es preciso perderse para volver a encontrarse.”*

Eduardo Galeano

RESUMO

GERÔNIMO, D. M. **Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em forrageiras tropicais.** [Molecular characterization of three genes of the lignification pathway in tropical forage]. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

O rápido declínio na digestibilidade da parede celular, devido à lignificação, dificulta o uso eficiente das gramíneas de clima tropical. Objetivou-se detectar e sequenciar o cDNA completo dos principais genes responsáveis pelo processo de biossíntese da lignina, CCoAOMT, C4H e PAL nas gramíneas *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu e *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia. As amostras das espécies de plantas forrageiras foram coletadas do Campo Agrostológico e levadas, imediatamente, para o laboratório para a extração do RNA total. Após tratamento do RNA total com o kit GeneRacer (Invitrogen), obteve-se o comprimento total 3' e 5' do cDNA das forrageiras *B. brizantha* e *P. maximum*. Os primers específicos foram delineados com base nas sequências de *B. brizantha*, *P. maximum* e milho, depositadas no GenBank, e foram aneladas com os primers 3' e 5' do kit GeneRacer para obtenção do comprimento total do gene. As amplificações foram feitas através PCR qualitativo e os produtos foram purificados, clonados e sequenciados em ambas direções. Foram encontrados alguns problemas com a otimização na reação de sequenciamento e obteve-se 67,25 % e 82,22% do gene CCoAOMT, 13,29% e 26,16% do gene PAL e 13,22% do gene C4H em *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. O sequenciamento dos genes codificantes das enzimas envolvidas no processo de lignificação, apresentaram alta similaridade com as sequências nucleotídicas do milho, e foi possível identificar e classificá-los de acordo com as classes que compõem cada gene. *B. brizantha* e *P. maximum* apresentaram 89,6% com CCoAOMT 1 e 88,3% com CCoAOMT 3, 96% e 95% com PAL1 e 96% com C4H1, respectivamente. Ao analisar as similaridades das sequências nucleotídicas dos fragmentos sequenciados, para os genes CCoAOMT, PAL e C4H, entre as demais gramíneas amplamente estudadas, encontrou-se 91% e 91,14% CCoAOMT do arroz, 79,6% e 82% CCoAOMT do trigo, 94,33 e 94,2% CCoAOMT do sorgo, 87 e 86% CCoAOMT da aveia, 90% e 94,25% PAL do arroz, 82% e 93,33% PAL do trigo, 92 % e 89,5% PAL da aveia, 94,33 e 95% PAL do sorgo, 97% e 91% PAL cana-de-açúcar, 90% e 93% PAL da cevada, 76% C4H do arroz, 94% C4H do sorgo, 89%

C4H do trigo e 87% C4H da cevada, em *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. A altíssima similaridade encontrada entre os fragmentos dos genes da via dos fenilpropanóides em *B. brizantha* e *P. maximum*, principalmente com o milho e arroz que possuem seu genoma em avançado estudo e conhecimento, possibilitam o uso do banco de dados destas espécies para estudos futuros de biologia molecular.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*. *Panicum maximum*. Lignificação. Sequenciamento.

ABSTRACT

GERÔNIMO, D. M. **Molecular characterization of three genes of the lignification pathway in tropical forage.** [Caracterização molecular de três genes da via da lignificação em forrageiras tropicais]. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

The rapid decline in digestibility of cell wall, due to lignification, hinders the efficient use of tropical grasses. The objective was to detect and sequence the complete cDNA of the major genes responsible for lignin biosynthesis process, CCoAOMT, PAL and C4H in grasses *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu and *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzania. Samples of fodder plant species were collected from the field agrostology and taken immediately to the laboratory for extraction of total RNA. After treatment of total RNA with the Generac kit (Invitrogen), we obtained the full length 3' and 5' cDNA of forage *B. brizantha* and *P. maximum*. The specific primers were designed based on sequences of *B. brizantha*, *P. maximum* and corn, deposited in GenBank, and were ringed with primers 3' and 5' of the Generac kit to obtain the total length of the gene. The amplifications were performed by qualitative PCR and the products were purified, cloned and sequenced in both directions. We found some problems with optimization in the sequencing reaction and obtained 67.25% and 82.22% of the CCoAOMT gene, 13.29% and 26.16% of PAL gene and 13.22% of the C4H gene in *B. brizantha* and *P. maximum*, respectively. The sequencing of genes encoding enzymes involved in lignification, showed high similarity with the nucleotide sequences of maize, and it was possible to identify and classify them according to the classes that make up each gene. *B. brizantha* and *P. maximum* 89.6% presented with CCoAOMT 1 and 88.3% with CCoAOMT 3, 96% and 95% to 96% with PAL1 and C4H1, respectively. By analyzing the similarities of the nucleotide sequences of the fragments sequenced, the genes for CCoAOMT, PAL and C4H, among the other grasses studied extensively, met 91% and 91.14% of the rice CCoAOMT, 79.6% and 82% of the CCoAOMT wheat, 94.33% and 94.2 CCoAOMT sorghum, 87 and 86% oat CCoAOMT, 90% and 94.25% of the rice PAL, 82 PAL% and 93.33% for wheat, 92% and 89.5 PAL% oats, 95% and 94.33 PAL sorghum, 97% and 91% PAL cane sugar, 90% and 93% PAL barley, rice 76% C4H, C4H 94% sorghum, 89% the C4H C4H wheat and barley 87% in *B. brizantha* and *P.*

maximum, respectively. The high similarity found among the fragments of the genes of the phenylpropanoid pathway in *B. brizantha* and *P. maximum*, especially with corn and rice that have their genome in advanced study and knowledge can enable the use of the database of these species for future studies of molecular biology.

Keywords: *Brachiaria brizantha*. *Panicum maximum*. Lignification. Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura dos monolignóis que compõem a lignina, álcool p-coumarílico (unidade H), álcool coniferílico (unidade G) e álcool sinapílico (unidade S)..... 29
- Figura 2 – Estrutura da macromolécula lignina formada pelas ligações cruzadas entre os monolignóis, principalmente entre as cadeias laterais 30
- Figura 3 – Biossíntese dos monolignóis pela via dos fenilpropanóides. As setas indicam a rota metabólica e as enzimas responsáveis por catalisar a reação (BONAWITZ; CHAPLLE, 2010) 32
- Figura 4 – Biossíntese dos monômeros de lignina no citoplasma, exportação para a parede celular secundária, ativação dos monômeros e deposição (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010) 33
- Figura 5 – Fenilalanina amônia-liase (PAL) é a primeira enzima na via dos fenilpropanóides que catalisa a reação de desaminação da fenilalanina em ácido cinâmico. No milho, também é responsável por catalisar a reação de desaminação da tirosina em ácido p-coumárico .. 36
- Figura 6 – Cinamato 4-hidroxilase (C4H) é a segunda enzima da via dos fenilpropanóides catalisando a reação de hidroxilação do ácido cinâmico em ácido p-coumarato. A C4H pertence à família das citocromo monoxigenase P-450 dependente e controla o fluxo principal da via da lignificação 38
- Figura 7 – Cafeoil CoA 3-O-Metiltransferase enzima chave na via dos fenilpropanóides catalisando a reação de metilação do cafeoil-CoA à Feruloil-CoA, essencial para a síntese do monômero guaicil (G) e para o fornecimento de substrato para a síntese da unidade sinringil (S)..... 40
- Figura 8 – Reação de desfosforilação do terminal 5' do RNA total pela fosfatase intestinal de bezerros (CIP) 47
- Figura 9 - Reação de remoção da estrutura 5' do RNA, intacta, mediante pirofosfatase ácida de tabaco (TAP) 48
- Figura 10 – Reação de ligação do RNA Oligo ao final 5' utilizando a enzima T4 RNA ligase 49
- Figura 11 – Reação de transcrição reversa utilizando a enzima *Cloned Avian Myeloblastosis Virus* (AMV), após, obtêm-se o cDNA com sítios de ligação para os primers 5' e 3' do kit GeneRacer 50
- Figura 12 – Amplificação dos finais 5' e 3' do cDNA RACE, respectivamente, utilizando os primers específicos que anelam com os primers

GeneRacer.....	54
Figura 13 - Produtos de PCR purificados pela CyScribe™ GFX Purification Kit (GE Healthcare), 3' e 5' do gene CCoAOMT em <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> , respectivamente.....	57
Figura 14 - Vetor pGEM –T destacando os pontos de referências, T7 RNA polimerase sítio de início de transcrição (1), região de clonagem múltipla (10-113), promotor SP6 RNA polimerase -17 a +3 (124-143), SP6 RNA polimerase sítio de início de transcrição (126), PUC/M13 sítio de ligação do primer de sequenciamento reverso (161-177), <i>lacZ</i> códon inicial (165), <i>lac</i> (185-201), β -lactamase região codificante (1322-2182), região phage f1 (2365-2820), pUC/M13 sítio de ligação do primer de sequenciamento (2941-2957) e promotor T7 RNA polimerase -17 a +3 (2984-3).....	58
Figura 15 - RNA total de <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> , respectivamente, para verificação da qualidade após extração.....	63
Figura 16 – RNA íntegro, <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> , respectivamente, após reação de ligação, pronto para reação de transcrição reversa	64
Figura 17 - Amplificação teste dos primers C4H (136 pb.), CCoAOMT (123 pb.) e PAL (290 pb.) respectivamente, em <i>P. maximum</i>	65
Figura 18 - Amplificação teste dos primers C4H (136 pb.), CCoAOMT (123 pb.) e PAL (290 pb.), respectivamente, em <i>B. brizantha</i>	65
Figura 19 - Amplificações dos cDNAs RACE dos finais 3' (1.060) e 5' (486 pb.) nas espécies de <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> para o gene C4H	66
Figura 20 - Amplificações cDNAs RACE dos finais 3' (883 pb.) e 5' (454 pb.) nas espécies de <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> para o gene CCoAOMT.....	66
Figura 21 - Amplificações cDNAs RACE dos finais 3' (1.181 pb.) e 5' (744 pb.) nas espécies de <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> para o gene PAL	67
Figura 22 - Fragmentos obtidos pelo seqüenciamento do gene CCoAOMT em <i>B. brizantha</i> e em destaque as regiões do gene que ainda faltavam ser cobertos pelo seqüenciamento.....	68
Figura 23 - Fragmentos obtidos pelo seqüenciamento do gene ccoAOMT em <i>P. maximum</i> e em destaque as regiões do gene que ainda faltavam ser cobertos pelo seqüenciamento.....	68
Figura 24 - Comparação dos fragmentos do gene CCoAOMT de <i>B. brizantha</i> com o gene depositado no GeneBank AJ242980.1 Zea mays mRNA Caffeoil CoA O-methyltransferase (gi 5101867).....	69
Figura 25 - Comparação dos fragmentos do gene CCoAOMT de <i>P. maximum</i>	

com o gene depositado no GeneBank AJ242980.1 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase (gi 5101867).....	70
Figura 26. Produtos de PCR da amplificação do gene COMT com os primers internos de <i>B. brizantha</i> e <i>Panicum maximum</i> , purificados e prontos para posterior sequenciamento.	71
Figura 27 - Identidade da sequência nucleotídica do gene CCoAOMT entre <i>P. maximum</i> e arroz	72
Figura 28 - Regiões do gene CCoAOMT cobertas pelo seqüenciamento, e em destaque as regiões quais não foram possíveis seqüenciar na espécie de <i>P. maximum</i>	73
Figura 29 - Identidade entre as sequencias nucleotídicas do gene CCoAOMT do <i>Panicum maximum</i> com o milho (gi 5101867 AJ242980.1 Zea mays mRNA for Caffeoyl CoA O-methyltransferase (ccoAOMT gene), 1136 bp.....	74
Figura 30 - Comparação entre as regiões seqüenciadas do gene CCoAOMT em <i>Brachiaria brizantha</i> com os genes da família CCoAOMT 1 (NM 001159039 Zea mays Caffeoyl CoA O-methyltransferase 1 961 bp), CCoAOMT 2 (AJ 242981 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase 2, 1167bp), CCoAOMT 3 (AY 104670 Zea mays PCO 117754 mRNA sequence, 976bp), CCoAOMT 4 (AY 104406 Zea mays PCO 108855 mRNA sequence, 1146bp) e CCoAOMT 5 (NM 001158979 Zea mays LOC 100286091 (PCO 131734) mRNA, 1075bp), respectivamente	78
Figura 31 - Comparação entre as regiões seqüenciadas do gene CCoAOMT em <i>P. maximum</i> com os genes da família CCoAOMT 1 (NM 001159039 Zea mays Caffeoyl CoA O-methyltransferase 1 961 bp), CCoAOMT 2 (AJ 242981 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase 2, 1167bp), CCoAOMT 3 (AY 104670 Zea mays PCO 117754 mRNA sequence, 976bp), CCoAOMT 4 (AY 104406 Zea mays PCO 108855 mRNA sequence, 1146bp) e CCoAOMT 5 (NM 001158979 Zea mays LOC 100286091 (PCO 131734) mRNA, 1075bp), respectivamente	82
Figura 32 - Árvore filogenética demonstrando a distância, em destaque, entre as espécies <i>Brachiaria brizantha</i> , milho (AJ242980 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), trigo (AB158406 Triticum aestivum CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase, partial CDs), aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), arroz (AY644636 Oryza sativa (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase) e sorgo (XM2436505 Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA)	83
Figura 33 - Árvore filogenética demonstrando a distância, em destaque, entre as espécies <i>Panicum maximum</i> , milho (AJ242980 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), trigo (AB158406 Triticum	

aevestium CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase, partial CDs), aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase) e arroz (AY644636 Oryza sativa (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase). 84

Figura 34 - Fragmento seqüenciado do gene PAL em *B. brizantha* e em destaque o que falta ser seqüenciado do gene PAL (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), utilizado como referência..... 86

Figura 35 - Fragmento do gene PAL seqüenciado em *P. maximum* e em destaque as regiões do gene PAL (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), utilizado como referencia, que ainda faltam ser sequenciadas..... 87

Figura 36 - Alinhamento da sequência consenso do gene PAL obtida em *B. brizantha* com os genes PAL1 (gi|187950257|gb|AY103647.2| Zea mays PCO142084 mRNA sequence), PAL3 (gi|37389371|gb|CF631905.1| zmrws48_0B10-014-f08.s3 zmrws48 Zea mays cDNA 3') e PAL5 (gi|13149319|gb|BG319641.1|Zm03_07a11_AZm03_AAFC_EC ORC_cold_stressed_maize_seedlings Zea mays cDNA clone Zm03_07a11.), respectivamente 88

Figura 37 - Comparação entre o fragmento do gene PAL em *P. maximum* com os genes PAL1 (gi|187950257|gb|AY103647.2| Zea mays PCO142084 mRNA sequence), PAL2 (gi|13149571|gb|BG319893.1|Zm03_07f12_AZm03_AAFC_EC ORC_cold_stressed_maize_seedling Zea mays cDNA clone Zm03_07f12) e PAL3 (gi|37389371|gb|CF631905.1| zmrws48_0B10-014-f08.s3 zmrws48 Zea mays cDNA 3'), respectivamente..... 93

Figura 38 - Representação do fragmento seqüenciado do gene PAL em *B. brizantha*, comparado com o gene PAL depositado no GeneBank para as gramíneas, arroz (gi|29367608|gb|AY224546.1| Oryza sativa (japônica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo (gi|1483609|emb|X99705.1| T.aestivum PAL gene), aveia (gi|260600463|gb|GQ373155.1| Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo (gi|298103857|dbj|AB565487.1| Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar (gi|121615559|gb|EF189195.1| Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e cevada (gi|2052093|emb|Z49147.1| H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp), respectivamente..... 95

Figura 39 – Árvore filogenética destacando a distância entre *B. brizantha* e as gramíneas depositadas no GenBank, arroz (gi|29367608|gb|AY224546.1| Oryza sativa (japônica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds),

trigo (gi|1483609|emb|X99705.1| T.aestivum PAL gene), aveia (gi|260600463|gb|GQ373155.1| Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo (gi|298103857|dbj|AB565487.1| Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar (gi|121615559|gb|EF189195.1| Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), milho (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), e cevada (gi|2052093|emb|Z49147.1| H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp) 95

Figura 40 - Representação do fragmento do gene PAL seqüenciado em *P. maximum* comparado com o gene PAL depositado no GeneBank nas gramíneas, arroz (gi|29367608|gb|AY224546.1| Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo (gi|1483609|emb|X99705.1| T.aestivum PAL gene), aveia (gi|260600463|gb|GQ373155.1| Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo (gi|298103857|dbj|AB565487.1| Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar (gi|121615559|gb|EF189195.1| Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e cevada (gi|2052093|emb|Z49147.1| H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp), respectivamente..... 97

Figura 41 - Árvore filogenética destacando as distâncias entre o fragmento seqüenciado em *P. maximum* e as demais gramíneas depositadas no GenBank, arroz (gi|29367608|gb|AY224546.1| Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo (gi|1483609|emb|X99705.1| T.aestivum PAL gene), aveia (gi|260600463|gb|GQ373155.1| Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo (gi|298103857|dbj|AB565487.1| Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar (gi|121615559|gb|EF189195.1| Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), milho (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), e cevada (gi|2052093|emb|Z49147.1| H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp) 97

Figura 42 - Regiões que ainda faltam ser seqüenciadas em *B. brizantha* tomando como referência o gene C4H no milho (ref|NM_001155686.1| Zea mays trans-cinnamate 4-monooxygenase (LOC100282780), mRNA). .. 99

Figura 43 - Fragmento do gene C4H seqüenciado em *B. brizantha* comparado ao gene C4H 1 (gi|21207253|gb|AY104175.1| Zea mays PCO098406 mRNA sequence)depositado no GeneBank 100

Figura 44 - Comparação do fragmento de C4H seqüenciado em *B. brizantha*, sorgo (gi|14192802|gb|AY034143.1| Sorghum bicolor cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA, complete CDs), arroz (gi|32982611|dbj|AK072588.1| Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023132G16, full insert sequence), trigo (gi|10442760|gb|AF123608.1|AF123608 Triticum aestivum clone CYP73-TA cytochrome P450 mRNA, complete CDs) e a cevada (gi|12030324|emb|AL504109.1| AL504109 Hordeum vulgare Barke roots Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HW04D19 5'), respectivamente 102

Figura 45 - Árvore filogenética destacando as distâncias entre *B. brizantha*, sorgo (gi|14192802|gb|AY034143.1| Sorghum bicolor cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA, complete CDs), arroz (gi|32982611|dbj|AK072588.1| Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023132G16, full insert sequence), trigo (gi|10442760|gb|AF123608.1|AF123608 Triticum aestivum clone CYP73-TA cytochrome P450 mRNA, complete CDs), milho (gi|21207253|gb|AY104175.1| Zea mays PCO098406 mRNA sequence) depositado no GenBank e a cevada (gi|12030324|emb|AL504109.1| AL504109 Hordeum vulgare Barke roots Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HW04D19 5') 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes alvos do estudo, sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho e T _m utilizado.....	51
Tabela 2 – Programa utilizado no termociclador com as temperaturas, tempo e ciclos	52
Tabela 3 - Primers do kit GeneRacer, tamanho dos primers, sequência e T _m , especialmente delineados para amplificar os finais 5' e 3' do cDNA	54
Tabela 4 – Mix preparado para as amplificações dos finais	55
Tabela 5 – Parâmetros cíclicos adotado segundo informações do fabricante.	55
Tabela 6 – Primers de seqüenciamento para produtos clonados em vetor pGEM e as sequências forward e reversa	61
Tabela 7 – Leitura em espectrofotômetro das amostras de <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, razão (260/280 nm) e concentração (µg/mL), para verificação da qualidade e quantidade de RNA extraído.....	63
Tabela 8 - Genes da família CCoAOMT em milho depositados no GenBank e contig depositados no Maize Wall	74
Tabela 9 – Genes da família PAL no milho, identificação dos contigs do MAIZEWALL e o número de identificação no GenBank	87
Tabela 10 - Genes da família C4H em milho, contigs depositados no MaizeWall e identificação no GenBank.	99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência do gene CCoAOMT em <i>P. maximum</i>	71
Quadro 2 – Sequencia consenso dos fragmentos obtidos do gene CCoAOMT em <i>B. brizantha</i>	71
Quadro 3 – Sequencia do gene CCoAOMT em <i>Panicum maximum</i>	72
Quadro 4 – Alinhamento múltiplo entre os cinco genes da família CCoAOMT em milho com o fragmento sequenciado em <i>B. brizantha</i>	75
Quadro 5 – Alinhamento múltiplo entre os cinco genes da família CCoAOMT em milho com o fragmento sequenciado em <i>P. maximum</i>	79
Quadro 6 – Sequência consenso do gene PAL em <i>B. brizantha</i>	84
Quadro 7 – Sequência consenso do gene PAL em <i>P. Maximum</i>	85
Quadro 8 – Comparação do fragmento sequenciado em <i>P. maximum</i> com gene PAL depositado no GeneBank NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA, com 92,5% de similaridade.....	85
Quadro 9 - Comparação do fragmento sequenciado em <i>B. brizantha</i> com o gene PAL depositado no GeneBank NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA, Com 92,5% de similaridade.....	86
Quadro 10 – Alinhamento múltiplo entre os genes PAL4, PAL5, PAL3, PAL <i>B. brizantha</i> , PAL1 e PAL2, respectivamente.....	88
Quadro 11 – Alinhamento múltiplo entre a sequencia consenso do gene PAL em <i>P. maximum</i> e os genes da família PAL no milho PAL4, PAL5, PAL3, PAL2 e PAL1.....	91
Quadro 12 – Fragmento do gene C4H sequenciado em <i>B.brizantha</i>	98
Quadro 13 - Comparação entre as sequências nucleotídicas do fragmento sequenciado em <i>B. brizantha</i> e o gene C4H em milho.....	98
Quadro 14 - Comparação entre as sequencia nucleotídicas entre o fragmento sequenciado do gene C4H em <i>B. brizantha</i> com o gene C4H1 em milho (gi 21207253 gb AY104175.1 Zea mays PCO098406 mRNA sequence) depositado no GenBank.....	100
Quadro 15 - Alinhamento entre as sequências C4H em <i>Brachiaria brizantha</i> e C4H1(gi 21207253 gb AY104175.1 Zea mays PCO098406 mRNA sequence) e C4H2 (gi 76935211 gb DV174235.1 ZM_BFb0177L18.r ZM_BFb Zea mays cDNA 5') no milho.....	100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	25
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1 QUALIDADE DE FORRAGEM.....	26
3.2 LIGNINA.....	28
3.2.1 Biossíntese, polimerização e deposição da lignina	31
3.3 PRINCIPAIS GENES CODIFICADORES DAS ENZIMAS DA VIA DE BIOSSÍNTESE DA LIGNINA.....	33
3.3.1 Fenilalanina amônia-liase (PAL)	35
3.3.2 Cinamato 4-hidroxilase (C4H).....	37
3.3.3 Cafeoil–CoA 3–O-Metiltransferase (CCoAOMT).....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 LOCAIS E LABORATÓRIOS.....	41
4.2 MATERIAL VEGETAL	41
4.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	42
4.4 LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	43
4.5 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE.....	43
4.5.1 Higienização da cuba de eletroforese	44
4.5.2 Preparo de solução tampão 10X para o gel de agarose-formaldeído	44
4.5.3 Preparo de solução tampão de corrida do gel de agarose-formaldeído 1X	44
4.5.4 Tampão de carregamento para RNA	45
4.5.5 Preparo do gel de agarose-formamida 1,2%	45
4.5.6 Preparo das amostras de RNA para a eletroforese em gel FA	45
4.6 REAÇÃO RACE - PCR (AMPLIFICAÇÃO RÁPIDA DE TERMINAIS LIVRES DE CDNA).....	46

4.6.1 Reação de desfosforilação do RNA total	46
4.6.2 Reação de remoção da estrutura 5' do RNA	47
4.6.4 Transcrição Reversa (Cloned AMV RT Reaction)	49
4.7 DELINEAMENTO DOS PRIMERS.....	50
4.8 AMPLIFICAÇÃO TESTE DOS PRIMERS	51
4.8.1 Preparo de gel de agarose 1%	52
4.8.2 Preparo de solução estoque TBE 5X	52
4.8.3 Síntese de cDNA com Kit Superscript III First – Strand Synthesis System for RT-PCR	53
4.9 AMPLIFICAÇÃO DOS FINAIS DOS cDNAs (RACE – PCR).....	54
4.10 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE PRODUTOS DE PCR E PRODUTOS DE RACE-PCR CLONADOS.....	55
4.10.1 Concentração e purificação dos produtos de PCR.....	55
4.10.2 Clonagem dos produtos de PCR utilizando pGEM®-T Vector	57
4.10.3 Purificação do DNA plasmidial	59
4.10.4 Reação de Sequenciamento	60
5 RESULTADOS	63
5.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	63
5.2 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS POR PCR.....	64
5.4 AVALIAÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES DOS FINAIS DOS cDNAs RACE	65
5.4 ANÁLISES DO SEQUENCIAMENTO	67
5.4.1 Análise do seqüenciamento do gene CCoAOMT em <i>Brachiaria brizantha</i> e <i>Panicum maximum</i>	67
5.4.4 Análise do sequenciamento do gene C4H em <i>B. brizantha</i> e <i>P. maximum</i>	97
6 DISCUSSÃO	103
6.1 GENE CCoAOMT EM <i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i> E <i>PANICUM MAXIMUM</i>	103
6.2 GENE PAL EM <i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i> E <i>PANICUM MAXIMUM</i>	105
6.3 GENE C4H EM <i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i>	107

7 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção com base em gramíneas de clima tropical, a qualidade da forragem disponível torna-se um limitante para a maximização da produção animal. Devido a essa importância, a qualidade tem sido um dos principais focos dos programas de melhoramento em forrageiras, onde o aumento da qualidade tem garantido ganhos superiores kg/animal/hectare (CASLER, 1997). O declínio da qualidade nutricional das plantas forrageiras ocorre em função do estágio de desenvolvimento, ou seja, com a maturidade ocorrem alterações na composição química das plantas, um dos principais é o acúmulo progressivo de lignina, afetando principalmente a digestibilidade.

A lignina é um importante composto fenólico intrínseco à parede celular secundária das plantas, fornecendo rigidez, hidrofobicidade, sustentação e proteção contra patógenos. No entanto, em plantas forrageiras tropicais a lignificação dos tecidos limita a quantidade de energia digestível disponível aos ruminantes, resultando em uma dificuldade no aproveitamento da celulose e hemicelulose pelos animais (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004). A lignina causa, também, impactos negativos na indústria de papel e no processamento da biomassa vegetal para produção de biocombustíveis, por isso é alvo de muitos estudos. A via dos fenilpropanóides é responsável pela síntese dos monolignóis que compõem a lignina, unidades guaiacílicas (G) derivadas do álcool coniferílico, unidades siringílicas (S) derivadas do álcool sinapílico e unidades p-hidroxifenílicas (H) derivadas do álcool p-coumarílico.

Visando melhor compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos no processo de biossíntese das ligninas, vários trabalhos têm buscado a caracterização de enzimas e genes envolvidos nessa rota metabólica (VOM ENDT et al., 2000). Todas as enzimas da via dos fenilpropanóides são conhecidas e caracterizadas em diversas espécies, fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-coumarato CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA transferase (HCT), coumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase (CCoAOMT), cinamoil-CoA redutase (CCR), cinamil álcool desidrogenase (CAD), ferulato 5-hidroxilase (F5H), e ácido caféico O-metiltransferase (COMT). Nas últimas

duas décadas, resultados significativos foram obtidos através da alteração da expressão individual de genes dos fenilpropanóides e da via biossintética dos monolignóis e estudando a consequência sobre a quantidade e composição da lignina (VANHOLME et al., 2008). Para isso, o sequenciamento possibilita a identificação genética das enzimas e abre a possibilidade de manipulações dos componentes envolvidos no processo de lignificação.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese central deste trabalho é que a síntese de lignina no colmo de plantas forrageiras é controlada pela expressão gênica, e que o conhecimento do papel destes genes é imprescindível para avanços de engenharia genética visando a melhoria da qualidade nutricional de plantas forrageiras tropicais. O objetivo do presente trabalho foi detectar e seqüenciar o cDNA completo dos genes CCoAOMT, C4H e PAL nas gramíneas *Panicum maximum* e *Brachiaria brizantha*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUALIDADE DE FORRAGEM

As forragens apresentam um importante papel na produção de ruminantes, cuja parede celular (fibra) corresponde de 50 a 80% da matéria seca e representa a maior fonte de energia nutricional. O sistema digestivo dos ruminantes associado à população microbiana, são adaptados para obter energia da parede celular de plantas forrageiras, porém, menos de 50% dessa fração é facilmente digerida e utilizada pelo animal (HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999). Portanto, a qualidade da fibra é o fator mais limitante à produção de ruminantes em regiões tropicais (WATTIAUX; MERTENS; SATTER, 1991). Estudos de alimentação e pastejo demonstram que pequenas mudanças na digestibilidade de forrageiras, promovem um impacto significativo no desempenho do animal, isto é, na produção de carne e leite (CASLER; VOGUEL, 1999).

A limitação na utilização da fibra das forragens ocorre pela presença de um importante componente químico das paredes celulares, a lignina, que restringe a degradação dos polissacarídeos estruturais pelas enzimas hidrolíticas, limitando assim a bioconversão das fibras em produto animal (GRABBER, 2005). Portanto, a lignina está negativamente correlacionada à digestibilidade de forragens (WATTIAUX; MERTENS; SATTER, 1991). Normalmente, o consumo de matéria seca correlaciona-se negativamente com o teor de parede celular. No entanto, o teor de fibra das plantas forrageiras, não é o único fator controlador do consumo, pois, a qualidade da fibra e consequentemente, sua digestibilidade e eficiência com a qual os nutrientes digeridos são utilizados pelo animal.

A qualidade de uma planta forrageira corresponde a sua capacidade em gerar desempenho animal, ou seja, manutenção, crescimento, reprodução e lactação, associado à sua composição química, digestibilidade, consumo voluntário e interação de fatores hereditários e ambientais (MOORE, 1994). Segundo Raymond (1969), a qualidade das forrageiras pode ser definida por três fatores de maior importância: digestibilidade, potencial de consumo e a eficiência energética.

Entretanto, esses três componentes não podem ser definidos na ausência de um animal, portanto, a qualidade não pode ser definida como uma característica agronômica (CASLER, 1997).

A qualidade de forragem pode variar em função do estágio de desenvolvimento da planta em decorrência de alterações na composição química, digestibilidade e estrutura da vegetação, os quais têm influência direta no consumo de animais em pastejo (REIS; DA SILVA, 2006). As forragens, ao atingirem a maturidade fisiológica apresentam, geralmente, uma menor degradabilidade das hastes e folhas, devido ao acúmulo e progressiva lignificação dos tecidos (WILSON; HATFIELD, 1997). A concentração de lignina está diretamente relacionada com a proporção de matéria seca indigestível das forragens (BUXTON; MERTENS; FISHER, 1996). Segundo Buxton e Casler (1993), nas hastes de forragens maduras, até 2/3 da FDN e mais da metade de polissacarídeos estruturais podem ser completamente indigestível.

As gramíneas tropicais apresentam valores nutritivos inferiores às de clima temperado, devido às diferenças histo-anatômicas marcantes entre os grupos fotossintético C4 e C3 (DENGLER; DENGLER; DONNELLY, 1994), que explicam as variações qualitativas. As gramíneas do ciclo C4 possuem maior proporção de feixes vasculares, maior proporção de tecidos menos digestíveis, como a bainha parenquimatosa dos feixes vasculares e esclerênquima, e menor proporção de células do mesófilo, que em gramíneas C3 (WILSON; DEINUM; ENGELS, 1991). Em países de clima tropical, a melhora na digestibilidade da forragem possui um impacto maior na produção animal do que em países de clima temperado, devido a menor digestibilidade das gramíneas tropicais de ciclo C4, em relação às gramíneas temperadas do ciclo C3 (VAN SOEST, 1994).

Portanto, o declínio da qualidade nutricional das plantas forrageiras tropicais de ciclo C4 é um dos maiores limitantes ao desempenho animal nos trópicos, e deve ser foco dos programas de melhoramento genético, bem como de programas visando o desenvolvimento de plantas transgênicas com melhor qualidade nutricional. O processo de lignificação da parede celular de plantas influencia não somente a indústria pecuária, mas também é um componente indesejável na indústria de papel (BAUCHER; PETIT-CONIL; BOERJAN, 2003), e para a produção

de álcool celulósico a partir do bagaço da cana-de-açúcar ou outras biomassas (CHEN; DIXON, 2007).

3.2 LIGNINA

A lignina é um importante componente intrínseco das paredes celulares secundárias das plantas e representa o segundo biopolímero mais abundante do planeta, respondendo por 25 a 30% da biomassa terrestre, sendo superado apenas pela celulose (VOM ENDT et al., 2000). Tem um importante significado evolutivo, permitindo a adaptação das plantas à vida terrestre a partir de plantas aquáticas (RASTOGI; DWIVEDI, 2008), conferindo suporte mecânico como rigidez e força, hidrofobicidade aos elementos vasculares permitindo o transporte de água e nutrientes (WHETTEN; SEDEROF, 1995). Além disso, as ligninas desempenham papel de defesa ao ataque de patógenos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980), ancoragem e sustentação de polissacarídeos da parede celular durante a deposição dos mesmos (NAKASHIMA et al., 1997).

Apesar de sua importância para as plantas, a composição da lignina, quantidade e distribuição, tem profundas consequências econômicas, exercendo um grande impacto negativo na digestibilidade da forragem, produção de polpa para a indústria de papel e processamento da biomassa vegetal para produção de biocombustível (WHETTEN; SEDEROF, 1991). Na obtenção da polpa de celulose e papel, a lignina deve ser removida mediante processamento químico severo, sendo oneroso tanto em termos financeiros quanto ambientais (VOM EDIT et al., 2000). Enquanto na pecuária, a lignina é indigestível e inibe a fermentação ruminal dos polissacarídeos da parede celular das plantas forrageiras (KONDO et al., 1998). A lignificação da parede celular durante o desenvolvimento e envelhecimento da planta tem sido identificada como o principal fator limitante na degradabilidade e digestibilidade das culturas forrageiras (BUXTON; RUSSELL, 1998).

A lignina é um composto fenólico resultante da polimerização oxidativa de três tipos de álcoois hidrocínamicos, denominados monolignóis (WHETTEN; MACKAY;

SEDEROFF, 1998). Estes monolignóis variam em seu grau de hidroxilação e metoxilação para formar unidades p-Hidroxi-fenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura dos monolignóis que compõem a lignina, álcool p-coumarílico (unidade H), álcool coniferílico (unidade G) e álcool sinapílico (unidade S)

As unidades H, G e S em gramíneas, estão interligadas por ligações éter β-O-4 e através de ligações carbono-carbono que são extremamente resistentes (BARRIÈRE et al., 2009), formando a macromolécula lignina (Figura 2). Além destas ligações, os monolignóis também fazem ligações cruzadas com os polissacarídeos da parede celular, tais como polissacarídeos e proteínas. A frequência média das unidades H, G e S nos internódios maduros de milho foram 2.5, 37.5 e 60%, respectivamente (LAPIERRE, 1993). A baixa quantidade da unidade H, que é quase cinco vezes maior que em plantas dicotiledôneas, pode afetar significativamente as propriedades da parede celular das gramíneas, aumentando a frequência das ligações inter-resistentes (BARRIÈRE et al., 2009). A lignina de gramíneas é caracterizada também, por um alto conteúdo de compostos fenólicos livres. Portanto, a estrutura da lignina tem sido objeto de estudo em inúmeros trabalhos científicos, aos quais estabelecem propostas estruturais e formação biossintética (BOERJAN, RALPH; BAUCHER, 2003).

Os monolignóis são produtos do metabolismo dos fenilpropanóides, que inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações (MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento das plantas e interações ambientais (ALLINA et al., 1998). E nestes caminhos há a atuação de enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina.

Figura 2 – Estrutura da macromolécula lignina formada pelas ligações cruzadas entre os monolignóis, principalmente entre as cadeias laterais

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese dos monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores nos compartimentos citoplasmáticos. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis.

Embora os pesquisadores tenham estudado a lignina por mais de um século,

muitos aspectos de sua biossíntese, processos bioquímicos que levam a desidrogenação dos monolignóis, polimerização e deposição são fontes inesgotáveis de discussão (BOERJAN; RALPH, BOERJAN, 2003). A via biossintética dos monolignóis já foi redesenhada várias vezes e continua sendo assunto de debate (DIXON et al., 2001).

3.2.1 Biossíntese, polimerização e deposição da lignina

A biossíntese dos monolignóis começa com a desaminação da fenilalanina e envolve sucessivas reações de hidroxilação do anel aromático, seguido por metilação e à conversão da carboxila da cadeia lateral de um grupo álcool, formando uma grande rede metabólica (Figura 3), que inclui todas as possíveis conversões enzimáticas. Presumivelmente, todas as enzimas da via de lignificação são conhecidas (HISANO; NANDAKUMAR; WANG, 2009): fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-coumarato CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA transferase (HCT), coumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase (CCoAOMT), cinamoil-CoA redutase (CCR), cinamil álcool desidrogenase (CAD), ferulato 5-hidroxilase (F5H), e ácido caféico O-metiltransferase (COMT).

A maioria das enzimas da via biossintética dos monolignóis são multifuncionais. No entanto, estas enzimas apresentam ampla especificidade ao substrato e catalizam mais de uma reação, formando consequentemente uma grande rede de reações (RASTOGI; DWIVEDI, 2008). A maioria dessas enzimas são solúveis, exceto as monoxigenases citocromo-P-450-dependente, cinamato 4-hidroxilase (C4H) e ferulato 5-hidroxilase (F5H), que estão localizadas na superfície externa do retículo endoplasmático das células que sintetizam a lignina. Em estudo recente, Guillaumie et al. (2007), mostraram que a maioria das enzimas da via dos fenilpropanóides do milho, com exceção de C3H e COMT, pertencem a famílias multigênicas.

exato não está bem esclarecido (MORREEL et al., 2004).

A deposição da lignina é um dos últimos estágios de diferenciação celular do xilema e, principalmente, ocorre durante o espessamento da parede celular secundária (DONALDSON, 2001). Na parede celular, a maior parte da deposição da lignina é precedida pela deposição dos carboidratos (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Durante a deposição, a lignina pode formar ligações químicas com os componentes da hemicelulose, eliminando gradualmente água, formando um ambiente de interação hidrofóbica. As condições ambientais também podem influenciar na quantidade e composição da lignina.

Figura 4 – Biossíntese dos monômeros de lignina no citoplasma, exportação para a parede celular secundária, ativação dos monômeros e deposição (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010)

3.3 PRINCIPAIS GENES CODIFICADORES DAS ENZIMAS DA VIA DE BIOSÍNTESE DA LIGNINA

A lignina é, portanto, um produto da via dos fenilpropanóides, no entanto, esta via também é responsável pela síntese de outros polímeros hidrofóbicos como a cutina, suberina e esporopolenina, além de metabólitos solúveis especializados, incluindo flavonóides, ácido hidroxicinâmico, éster, lignanas, taninos e estilbenos (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010). Essas substâncias possuem funções como defesa, pigmentação, produção de fragrâncias e regulação no crescimento (DIXON; LAMB, 1990). Portanto, um vasto número de metabólitos das plantas são derivados via

desaminação da fenilalanina, hidroxilação e subsequente modificação. Como toda via metabólica, não são todas as enzimas que são alteradas de forma a controlar o fluxo de lignificação das plantas (SILVA et al., 2010).

Uma das maneiras mais diretas de se alterar o conteúdo e composição da lignina na parede celular é utilizar técnicas de transgenia para modificar a expressão das enzimas responsáveis pela sua biossíntese. Algumas modificações nas enzimas da via dos fenilpropanóides acarretaram efeitos indesejáveis como lesões localizadas fluorescentes e alteração na morfologia das flores e pigmentação em plantas de tabaco (ELKIND et al., 1990), menor produção de massa e sobrevivência em *Panicum virgatum* (CASLER; BUXTON; VOGEL, 2002) e menor resistência a infecção ao vírus do mosaico em tabaco (PALLAS et al., 1996). Uma preocupação quanto à redução do teor de lignina, é reduzir concomitantemente a aptidão da forrageira ao ambiente, reduzindo a produção total de massa, tolerância à seca ou a pragas, como a cigarrinha das pastagens.

Os genes de cada etapa da via biossintética da lignina, foram clonados e o impacto sobre a quantidade e composição da lignina foi estudada através de mutantes ou pela modificação genética em várias espécies, principalmente *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), milho (*Zea mays*), alfafa (*Medicago sativa*), choupos (*Populus* spp.), e tabaco (*Nicotiana tabacum*), mais recentemente no linho (*Linum usitatissimum*) (DAY et al., 2009), *Pinus radiata* (WAGNER et al., 2007), *Picea abies*, e do arroz (*Oriza sativa*) (LI et al., 2009). A partir desses estudos, pode-se concluir que a redução da expressão de cada gene da via biossintética da lignina, exceto F5H, diminui a quantidade de lignina na parede celular em graus diferentes, dependendo do gene, da espécie e o nível de redundância do gene (VANHOLME et al., 2008).

Neste sentido, em um estudo recente com 11 cultivares de *P. maximum*, Stabile (2009), estudou a expressão de seis genes da via da lignificação (PAL, C3H, C4H, CAD, CCR e CCoAOMT) e identificou a expressão dos genes CCoAOMT e C4H como os únicos correlacionados com a queda da digestibilidade da parede celular do colmo que ocorre com o avanço da maturidade, posicionando os mesmos como fortes candidatos para estudos de engenharia genética que reduzam a expressão destes genes visando a obtenção de cultivares de *P. maximum* com maior

digestibilidade da fibra do colmo e com queda mais lenta da digestibilidade com o avanço da maturidade.

A enzima PAL catalisa a primeira etapa da biossíntese dos fenilpropanóides, responsável pela deaminação da fenilalanina a ácido cinâmico, junto com C_4H são essenciais a síntese de todos os fenilpropanóides (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

3.3.1 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

É uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, catalisando a desaminação da fenilalanina à cinamato. PAL é a primeira enzima da via dos fenilpropanóides (Figura 5), e possibilita a formação de diversos metabólitos secundários (WINKEL, 2004). O surgimento da via do fenilpropanóides possibilitou um número importante de adaptações para a sobrevivência das plantas (FERRER et al., 2008). Foi isolado o cDNA completo do gene PAL do milho sendo possível observar que a enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina e também L-tirosina (ROSLER et al., 1997). Um grande número de estudos demonstram que a expressão de PAL varia de acordo com estímulos ambientais, incluindo infecção ou ferimento por patógenos, depleção de nutrientes, irradiação de UV, temperaturas extremas e outras condições de estresse (DIXON; PAIVA, 1995).

Na maioria das espécies vegetais, a enzima PAL faz parte de uma família multigênica, e embora ainda não comprovado, tem-se especulado que cada gene tem papel metabólico distinto como flavonóides, lignina, etc. (ANTEROLA; LEWIS, 2002). Em *Arabidopsis thaliana* a enzima PAL tem quatro genes, PAL1 a PAL4, (RAES et al., 2003), no entanto, apenas dois (PAL1 e PAL2) tem sido amplamente analisados geneticamente (ROHDE et al., 2004). No tomate encontrou-se 5 genes, sendo o PAL5 mais comum (CHANG et al., 2008), o tabaco, por exemplo, contém quatro genes PAL (FUKASAWA-AKADA; KUNG; WATSON, 1996), assim como a *Arabidopsis thaliana*. Enquanto no genoma do milho, estão presentes três grupos de genes, provavelmente duplicados, portanto seis genes (BARRIÈRE et al., 2010). A deleção no éxon II do gene ZmPAL, introduzindo um códon de parada prematura, tem sido associado com maior digestibilidade da planta (ANDERSEN et al., 2007).

Figura 5 – Fenilalanina amônia-liase (PAL) é a primeira enzima na via dos fenilpropanóides que catalisa a reação de desaminação da fenilalanina em ácido cinâmico. No milho, também é responsável por catalisar a reação de desaminação da tirosina em ácido p-coumárico

A inibição severa do gene PAL, geralmente leva à diminuição dos níveis de lignina e de outros metabólitos da via dos fenilpropanóides. Porém, a redução de sua atividade em 20 a 25%, torna-se limitante para a via dos fenilpropanóides, tal redução foi observada em tabaco transgênico (SEWALT et al, 1997). A inibição severa nas plantas de tabaco proporcionou certa diminuição no teor de lignina, bem como, baixa estatura, diminuição da viabilidade do pólen e alteração nas folhas e na morfologia das flores (ELKIND et al., 1990). Outra complicação decorrente de enzimas pertencentes a famílias multigênicas, como o caso da PAL, é o fato de que nenhum dos alelos que ocorrem naturalmente ou os hipomórficos quimicamente induzidos desse gene tem sido relatado até o momento (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010). Em *Arabidopsis thaliana*, Rodhe et al. (2004), analisaram geneticamente os

duplos mutantes (PAL1 e PAL2) e concluíram que a dupla mutação acarretou alterações fenotípicas, incluindo infertilidade, significativa redução no acúmulo de lignina e alterações na ultra-estrutura da parede celular secundária. Enquanto os mutantes PAL1, PAL2, PAL3 e PAL4, quádruplo mutante, reduziu o teor de lignina em 30%, no entanto, as plantas apresentaram infertilidade e níveis de fluorescência (HUANG et al., 2010).

3.3.2 Cinamato 4-hidroxilase (C4H)

A enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) pertence ao grupo da super família das citocromo monoxigenase P450-dependente, a característica marcante das enzimas pertencentes a essa super família, é devido a localização, em todas as vias, de maneira estratégica catalisando reações exotérmicas, marcando pontos de fluxo irreversível (EHLTING et al., 2006). É uma proteína associada à membrana, que junto com outras enzimas, forma a unidade reguladora do metabolismo dos fenilpropanóides (CHEN et al., 2006). C4H é a segunda enzima chave na via biossintética dos fenilpropanóides (Figura 6), e desempenha a função fundamental na etapa enzimática, catalisando a hidroxilação do cinamato a p-coumarato. Após esta etapa, o p-coumarato é transformado p-coumaril CoA, pela enzima 4CL, este precursor pode seguir pela via de síntese dos flavonóides, taninos, estilbenos, etc., ou pode seguir pela via de biossíntese da lignina.

Vários estudos têm caracterizado a expressão de C4H em espécies divergentes, e, enquanto a expressão de C4H é detectável na maioria dos órgãos analisados, porém, é expressa predominantemente em órgãos com a biossíntese de fenilpropanóides de alta e / ou em fase de lignificação (EHLTING et al., 2006). Em *Zinnia elegans* há uma grande atividade de C4H, na diferenciação das células do mesófilo para elementos traqueais, correlacionando com a deposição de lignina (YE, 1995). Nas espécies de *Arabidopsis* e ervilha o gene C4H é altamente expresso principalmente no caule e raízes (FRANK et al., 1996;. MIZUTANI et al., 1997;. URBAN et al., 1997).

Figura 6 – Cinamato 4-hidroxilase (C4H) é a segunda enzima da via dos fenilpropanóides catalisando a reação de hidroxilação do ácido cinâmico em ácido p-coumarato. A C4H pertence à família das citocromo monooxigenase P-450 dependente e controla o fluxo principal da via da lignificação

O cinamato 4-hidroxilase (C4H), que é um citocromo P450 e um controle de fluxo principal para lignificação (ANTEROLA; LEWIS, 2002) foi constatada em duas famílias distintas, de classe I e classe II, que são funcionalmente idênticas, mas mostram sequências ao redor de 60% de similaridade. Algumas espécies, como *Arabidopsis*, apresenta somente a classe I (COSTA et al., 2003), enquanto outros, tais como na família solanaceae (batata, tomate, tabaco) têm ambos (EHLTHING et al., 2006). Ambas as formas foram submetidos ao senso e antisenso na manipulação de tabaco em que a classe I (SEWALT et al., 1997) e classe II, formas da enzima (BLEE et al., 2001) têm sido alvo, com consequente redução do teor de lignina. No milho são encontradas as duas classes do gene C4H (BARRIÈRE et al., 2009).

3.3.3 Cafeoil-CoA 3-O-Metiltransferase (CCoAOMT)

Acreditava-se que o ácido caféico O-metiltransferase se tratava de uma enzima bifuncional metilando o ácido caféico e o ácido 5-hidroxiferúlico, e por isso, também foi chamada de cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase (CCoAOMT). No entanto, Zhong et al. (1998), forneceram evidências genéticas sólidas para o envolvimento de CCoAOMT na biossíntese da lignina. Estes estudos suportam fortemente um modelo em que CCoAOMT e COMT estão especificamente envolvidos na metilação nas posições 3 e 5 de precursores dos monolignóis, tioéster CoA e aldeído, respectivamente (Figura 7).

Portanto, Cafeoil-CoA redutase 3-O-metiltransferase (CcoAOMT) desempenha um papel essencial na síntese de lignina, unidade guaiacil (G), bem como no fornecimento de substratos para a síntese das unidades de lignina siringila (S). Barrière et al. (2007), afirmam que em milho, alfafa e *Arabidopsis*, a biossíntese da unidade G é dependente da atividade de CCoAOMT, enquanto a biossíntese das unidades S são dependentes da atividade das enzimas COMT/OMT, porém não pode-se considerar como uma resposta definitiva. Estudos semelhantes envolvendo alfafa e *Arabidopsis*, com menor atividade de CCoAOMT, resultaram em redução significativa no teor de lignina, com significativo efeito nos monômeros G, aumentando assim a proporção das unidades S/G, porém sem afetar a quantidade das unidades S (CHEN et al., 2006; DOL et al., 2007). Entretanto, resultados contrários foram descritos em experimentos com plantas de tabaco, onde a redução da atividade de CCoAOMT resultou em grande redução dos monômeros S se comparados com as unidades G (ZHONG et al., 1998). Enquanto em plantas modificadas para redução na atividade de CcoAOMT1 e COMT, ao mesmo tempo, resultaram no cessamento do crescimento e a composição da lignina era principalmente de unidades H (DO et al., 2007).

No genoma do milho foram identificados 5 genes CCoAOMT (BARRIÈRE et al., 2009). Em plantas de milho, os 5 genes CCoAOMT identificados até o momento, apresentam uma baixa similaridade dos ácidos nucléicos entre os genes (GUILLAUMIE et al., 2007). Este fato sugere que os diferentes genes CCoAOMT, provavelmente, estão envolvidos na via de síntese dos monômeros G e possivelmente envolvidos especificamente em cada estágio ou tecidos (BARRIÈRE et al., 2007). Ye et al. (1994), foram os primeiros a relacionar a expressão de CcoAOMT com a deposição diferencial nos elementos traqueais em *Zinnia elegans*.

Diferentemente, o ácido caféico O-metiltransferase (COMT) está presente em

somente um gene, encontrado no genoma do milho e do arroz (Os08g06100) (BARRIÈRE et al., 2007). Essa singularidade vem corroborar com o fato deste gene estar envolvido apenas na etapa de metilação do 5-Hidroxiciniferaleído (DAVIN et al., 2008), enquanto que as enzimas CCoAOMT possuem uma rigorosa afinidade com CoA-ésteres (BARRIÈRE et al., 2009). Em comparação com COMT, os genes CCoAOMT aparecerem antes na escala evolutiva das plantas, de acordo com a existência mais primitiva das unidades G comparativamente com as subunidades S. Portanto o caminho de síntese da unidade G da lignina, e possivelmente dos monolignóis S, é baseada na metilação do cafeoil-CoA em feruloil-CoA pela enzima CCoAOMT (BARRIÈRE et al., 2007).

Figura 7 – Cafeoil CoA 3-O-Metiltransferase enzima chave na via dos fenilpropanóides catalisando a reação de metilação do cafeoil-CoA à Feruloil-CoA, essencial para a síntese do monômero guaicil (G) e para o fornecimento de substrato para a síntese da unidade sinringil (S)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS E LABORATÓRIOS

As amostras de plantas forrageiras foram coletadas no Campo Agrostológico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus de Pirassununga, estado de São Paulo.

As análises moleculares foram realizadas no Centro de Pesquisa de Bovinos (CEPBOV), no Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do professor Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, localizada em Piracicaba, sob responsabilidade do professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho.

A clonagem dos produtos de PCR e purificação do DNA plasmidial foi realizada no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, localizada em Pirassununga, sob responsabilidade do professor Dr. Flávio Vieira Meirelles.

4.2 MATERIAL VEGETAL

Amostras das espécies de plantas forrageiras, *B. brizantha* Stapf. cv. Marandu e *P. maximum* Jacq. cv. Tanzânia foram coletadas do Campo Agrostológico utilizando-se uma tesoura de poda para o corte das hastes e folhas. Após a coleta, de maneira aleatória dentro do canteiro, o material vegetal foi armazenado em sacos

plásticos e levado imediatamente para o Laboratório de Genômica Funcional, para o procedimento de extração do RNA total das amostras.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Para as análises é recomendável a purificação das moléculas de RNA para que estejam mais intactas e mais completas em termos de comprimento, de forma mais pura e íntegra possível. As amostras de *B. brizantha* e *P. maximum* foram submetidas à extração do RNA pelo método Trizol® (Invitrogen). Esse produto comercial consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que deriva da técnica desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (1987), para o isolamento de RNA total de células e tecidos, livre de ribonucleases (RNAses). As ribonucleases são enzimas extremamente resistentes a vários tratamentos, e são responsáveis pela degradação do RNA, representando a maior preocupação durante a extração do RNA total.

Os tecidos vegetais frescos foram previamente cortados em pedaços bem pequenos, para facilitar a etapa seguinte. A próxima etapa consistiu em trituração por moagem, em um almofariz com o pistilo, sob baixa temperatura com a utilização de nitrogênio líquido. Pesou-se 2,5 g dos tecidos macerados e foram transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 6 mL do reagente Trizol® (Invitrogen). Para homogeneização e auxílio à lise das células, foi utilizado o misturador de líquido de bancada tipo Turraz por 30 segundos. A solução foi centrifugada a 4.500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos a 4 °C.

A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para 6 a 8 tubos Eppendorf de 1,5 mL (1,0 mL por tubo) para lavagem com 200 µL de clorofórmio sob agitação vigorosa por 15 segundos e posterior incubação de 3 minutos em temperatura ambiente, seguido de nova centrifugação a 10.500 rpm por 15 minutos a 4 °C. A mistura se separa em três fases: inferior orgânica (avermelhada), interfase e a fase superior e mais clara. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorf de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol, incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugados a 10.500 rpm por 10 minutos a 4 °C, para a

recuperação do RNA total através da precipitação.

O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado com álcool etílico 75% sob agitação vigorosa e centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após, o álcool etílico foi removido e o *pellet* secou por 10 minutos em temperatura ambiente com o tubo invertido. O RNA total foi ressuspenso em 40 a 100 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (H_2O_{DEPC}) e aquecido, em bloco aquecedor, por 10 minutos a 55 °C para melhor dissolver o *pellet*. Após, foi agitado intensamente, centrifugado em centrífuga de bancada e pipetado múltiplas vezes.

Foram separados alíquotas de 6 µL, onde 1 µL foi utilizado para leitura em espectrofotômetro e 5 µL para eletroforese em gel de agarose-formaldeído para verificar a integridade do RNA.

4.4 LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO

As leituras em espectrofotômetro auxiliaram para a determinação da concentração de RNA total e o conhecimento da razão A260/A280 adotada como parâmetro de qualidade da amostra ou da extração.

A leitura foi realizada com o aparelho *GeneQuant Pro* (Amersham Biosciences). Foi utilizado 1,0 µL de amostra diluído em 59 µL de água MiliQ (H_2O_{miliQ}) e o fator de diluição aparelho foi ajustado para 60. Como referência para leitura, foi utilizada H_2O_{miliQ} . Foram anotadas as leituras dos comprimentos de onda A230, A260, A280, a razão 260/280 e a concentração em µg/mL.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE

O RNA quando separado em géis não desnaturantes não migra precisamente de acordo com o tamanho, pois o RNA não encontra-se desnaturado. O comportamento eletroforético do RNA depende do seu tamanho, carga e principalmente da estrutura secundária da molécula (*stem-loop*). Os géis contendo

agentes desnaturantes como o formaldeído eliminam o efeito da estrutura secundária.

4.5.1 Higienização da cuba de eletroforese

A higienização da cuba é necessária, antes do uso, para eliminar possíveis contaminantes ambientais e, principalmente, RNAses que podem interferir nos resultados. Portanto, lavou-se a cuba com detergente neutro e feito enxágue com água destilada. Após, deixou-se secar com álcool 70% em temperatura ambiente e prosseguiu-se de molho na água oxigenada por 10 minutos. O enxágue final foi feito com H_2O_{DEPC} , deixando-o agir por 5 minutos.

4.5.2 Preparo de solução tampão 10X para o gel de agarose-formaldeído

Para o preparo da solução tampão 10 X para o gel de agarose-formaldeído (gel FA 10X) foi utilizado 10,47 g de MOPS 20 mM (3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid), 1,7 g de Acetato de sódio 5 mM, 5 mL de etanol e 180 mL de H_2O_{DEPC} . O pH foi ajustado para 7 e completou-se com H_2O_{MilliQ} para 250 mL.

4.5.3 Preparo de solução tampão de corrida do gel de agarose-formaldeído 1X

Foi utilizado pra o preparo do tampão de corrida do gel FA 1X 50 mL da solução tampão do gel FA 10X, 10 mL de formaldeído 37% (12,3M) e 440 mL de H_2O_{DEPC} .

4.5.4 Tampão de carregamento para RNA

Utilizou-se 25 mg de azul de bromofenol, 80 μ L de 0,5 M EDTA pH 8,0 (ácido etilenodiaminotetraacético), 750 μ L de formaldeído 37% (12,3M), 2 mL de glicerol, 3,084 mL de formamida e 4 mL de tampão 10X do gel FA. O tampão foi separado em alíquotas em tubos eppendorf de 1,5 mL.

4.5.5 Preparo do gel de agarose-formamida 1,2%

Para o preparo do gel FA 1,2%, adaptado para cuba de 50 mL, utilizou-se 0,6 g de agarose, 5 mL de tampão FA 10X e completar até 50 mL com água livre de RNase. Essa mistura foi aquecida até que a agarose tivesse totalmente derretida. Após a solução atingir 55 °C (morno), foi adicionado 9 mL de formaldeído 37% (12,3) e 1 μ L de solução estoque de brometo de etídeo (0,04 μ g/mL). Misturou-se cuidadosamente e a mistura foi despejada no suporte do gel, devidamente vedado, da cuba de eletroforese. Antes de correr o gel foi necessário o equilíbrio no tampão de corrida do gel FA 1X por 30 minutos no mínimo.

4.5.6 Preparo das amostras de RNA para a eletroforese em gel FA

Foi adicionado 1 μ L de tampão de carregamento (loading) em 4 μ L de amostra de RNA e misturado gentilmente com a pipeta. Essa mistura foi incubada a 65 °C por 3 minutos e após esfriar em gelo, foi aplicada no gel FA equilibrado. A fonte de eletroforese foi ligada a 70 Volts, deixando correr do pólo positivo para o negativo por 80 minutos.

4.6 REAÇÃO RACE - PCR (AMPLIFICAÇÃO RÁPIDA DE TERMINAIS LIVRES DE CDNA)

O kit GeneRacertm (Invitrogen) é um método para obtenção do comprimento total 3' e 5' do cDNA. Este método consiste em três tratamentos nas moléculas de RNA antes da síntese de cDNA. A primeira reação é de desfosforilação, onde o RNA total é tratado com fosfatase intestinal de bezerros (CIP- calf intestinal phosphatase), responsável pela desfosforilação do terminal 5' (Figura 8). Na segunda reação o RNA desfosforilado é tratado com ácido pirofosfatase de tabaco (TAP- tobacco acid pyrophosphatase), removendo a estrutura do terminal 5' intacta (Figura 9). Na terceira reação ocorre a ligação do final 5' ao GeneRacertm RNA Oligo usando T4 RNA ligase (Figura 10). O GeneRacertm RNA Oligo será um sítio de ligação aos primers do kit após a transcrição do RNA em cDNA (Figura 11). Após a transcrição reversa, obtêm-se o cDNA com sítios de ligação nos finais 5' e 3' para os primers do kit. Para a obtenção do final 5', é necessário amplificar o cDNA com o primer específico reverso e GeneRacertm 5' Primer, e para obtenção do final 3' é necessário amplificar o cDNA com o primer específico forward e GeneRacertm 3' Primer.

4.6.1 Reação de desfosforilação do RNA total

Segundo recomendações do fabricante, é necessário utilizar de 1 a 5 µg de RNA total em H₂O_{DEPC}. Foi utilizado 5 µg de RNA total, 1 µL de tampão 10X CIP, 1 µL de RNaseOuttm (40 U/ µL), 1 µL de CIP (10U/ µL) e H₂O_{DEPC} para completar 10 µL. Pipetaram-se múltiplas vezes, centrifugou-se brevemente e a reação foi incubada a 50 °C por uma hora em bloco aquecedor. Após o período de incubação, seguiu-se a precipitação do RNA.

Figura 8 – Reação de desfosforilação do terminal 5' do RNA total pela fosfatase intestinal de bezerros (CIP)

Para a precipitação do RNA utilizou-se 90 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e 100 μL de fenol: clorofórmio, que age como desproteinizante desnaturando e retirando as proteínas que estiverem acopladas ao RNA, e agitou-se vigorosamente por aproximadamente 30 segundos e centrifugado em microcentrífuga de bancada em velocidade máxima por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, devidamente identificado, e adicionou-se 2 μL de glicogênio de mexilhão, 10 μL de acetato de sódio 3M (pH 5,4) e 220 μL de etanol 95%, foi agitado vigorosamente e deixado em gelo por 10 minutos.

A utilização de glicogênio faz-se necessário devido sua ação coprecipitante de ácidos nucleicos, porém o glicogênio não aumenta a precipitação do RNA, mas como ele precipita nas mesmas condições, formam um pellet visível facilitando a manipulação, enquanto o acetato de sódio diminui ainda mais a solubilidade do RNA no álcool, aumento sua precipitação. Centrifugou-se em velocidade máxima a 4 °C, após, o sobrenadante foi removido tomando muito cuidado com o pellet. Foi adicionado 500 μL de etanol 70% que permite uma lavagem hidratante ao pellet, agitado vigorosamente, e centrifugado em velocidade máxima a 4 °C por 2 minutos. O sobrenadante foi totalmente removido, pois excesso de etanol pode inibir futuras reações como o PCR, e o pellet secou por 10 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 7 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

4.6.2 Reação de remoção da estrutura 5' do RNA

Após a reação de desfosforilação e precipitação do RNA é necessário o tratamento com pirofosfatase ácida de tabaco (TAP– tobacco acid pyrophosphatase), responsável por remover a estrutura 5' do RNA intacta. Este tratamento deixa um fosfato na extremidade 5', necessário para a ligação do GeneRacertm RNA Oligo.

Figura 9 - Reação de remoção da estrutura 5' do RNA, intacta, mediante pirofosfatase ácida de tabaco (TAP)

Foi adicionado aos 7 µL de RNA desfosforilado, 1 µL de 10X TAP Buffer, 1 µL de RNASEOut (40U/ µL) e 1 µL de TAP (0,5U/ µL), totalizando 10 µL. Depois de pipetar múltiplas vezes, agitar vigorosamente com auxílio de um vórtex, centrifugar brevemente apenas para coletar o líquido, a reação foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, a reação foi centrifugada brevemente e seguido-se imediatamente com a precipitação do RNA, assim como citada acima, terminando a precipitação com 7 µL de RNA sem a estrutura 5'.

4.6.3 Reação de ligação do RNA Oligo ao RNA

Esta reação é responsável pela ligação do GeneRacertm RNA Oligo ao final 5' do RNA utilizando a enzima T4 RNA ligase, providenciando sítios de ligação aos GeneRacertm PCR primers depois do RNA ser transcrito a cDNA. Os 7 µL da reação anterior foram adicionado aos tubos do kit GeneRacertm contendo RNA Oligo liofilizado (0,25 µg). Pipetou-se múltiplas vezes e centrifugou-se brevemente. Os tubos foram incubados a 65 °C por 5 minutos. Após, permaneceram no gelo por 2 minutos e foram adicionados à reação os demais reagentes, 1 µL de 10X Ligase

Buffer, 1 µL de ATP (10 mM), 1 µL de RNase Out (40 U/ µL) e T4 RNA ligase (5 U/ µL). A reação foi incubada por 1 hora a 37 °C em bloco aquecedor, em seguida centrifugou-se brevemente e colocou-se no gelo e seguiu precipitação já descrita anteriormente, porém, nessa reação de precipitação, o RNA foi ressuspenso em 11 µL de água DEPC, onde 1 µL foi utilizado para verificar a integridade do RNA em gel desnaturante.

Figura 10 – Reação de ligação do RNA Oligo ao final 5' utilizando a enzima T4 RNA ligase

4.6.4 Transcrição Reversa (Cloned AMV RT Reaction)

A reação de transcrição reversa foi realizada com a enzima *Cloned Avian Myeloblastosis Virus* (AMV). Para esta reação adicionou-se aos 10 µL de RNA da reação de ligação, 1 µL de Primer GeneRacer Oligo dT e 1 µL de dNTP, e foi incubado a 65 °C em um bloco aquecedor por 5 minutos. Ao retirar do bloco aquecedor a reação foi deixada em gelo por 2 minutos. Após uma breve centrifugação, adicionou-se 4 µL de 5X RT Buffer, 1 µL de Cloned AMV RT (15U/ µL), 2 µL de H₂O_{MILIQ} e 1 µL de Rnase Out, totalizando 20 µL. Pipetaram-se múltiplas vezes e a reação foi colocada em bloco aquecedor por 45 °C por uma hora. Após uma hora, aumentou-se a temperatura para 85 °C por 15 minutos para inativar a enzima AMV RT.

Figura 11 – Reação de transcrição reversa utilizando a enzima *Cloned Avian Myeloblastosis Virus* (AMV), após, obtêm-se o cDNA com sítios de ligação para os primers 5' e 3' do kit GeneRacer

4.7 DELINEAMENTO DOS PRIMERS

Os primers específicos foram delineados com base nas sequências de *B. brizantha* e *P. maximum* depositadas no GenBank (HM007818.1, HM007816.1, HM007814.1) e também com base nas sequências do milho, para os três principais genes envolvidos no processo de lignificação das plantas forrageiras, COMT, C4H e PAL. Os primers específicos foram utilizados em conjunto com os primers do Kit GeneRacer[™] para obtenção dos finais 5'e 3'. Para isso, foram seguidas algumas especificações, como o conteúdo de GC entre 50 a 70% para obtenção de uma alta temperatura de anelamento. Para aproximar a temperatura de anelamento foi utilizada uma fórmula bem simples: $4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$, cujo resultado é a temperatura aproximada da T_m , onde G, C, A e T representam o número destas bases na sequência do primer.

Para tanto foi utilizado também o software *Primer Express® 3.0* (Applied Biosystems). Os *primers* foram avaliados no *Primer BLAST* do NCBI (National Center for Biotechnology National) e para a seleção dos melhores *primers* em cada sequência foi utilizado o software *OligoAnalyser 3.1* da empresa Integrated DNA Technologies (IDTDNA) (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes alvos do estudo, sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho e Tm utilizado.

Gene	Sequência	Tamanho	Tm
PAL_F	5'-GACGTCTCCCGTGGCAAGGCG-3'	21	70 °C
PAL_R	5'-GGTTGTGCTGCTCAGCGCTCTG-3'	22	70 °C
C4H_F	5'-CGTCCTCCGCCATTCTCCG-3'	21	65 °C
C4H_R	5'-ATCTCGCCCTTCTCTCGGCC-3'	21	65 °C
COMT_F	5'-ACCCGCGAGAGCCGGAGAGC-3'	20	68 °C
COMT_R	5'-CGCCGATGAGCTTGATGAGCATG-3'	23	68 °C
COMT_3'_F	5'-CGGCTCCGTCGTGCTCCCC-3'	19	67 °C
COMT_5'_R	5'-GGGGAGCAGCACGGAGCCG-3'	19	67 °C

A partir de um sequenciamento parcial com o gene COMT, foi possível obter conhecimento sobre a região que vai dos 500 pb até 850 pb do gene, até então desconhecida. Portanto, para obter o final 3' e o meio desse gene, foi necessário o delineamento de primers internos. Os primers denominados COMT_3'_F e COMT_5'_R, são a mesma sequência, pois foram delineados para anelarem com os primers do kit GeneRacer e/ou com o primer forward delineado anteriormente (COMT_F).

4.8 AMPLIFICAÇÃO TESTE DOS PRIMERS

Os novos primers foram testados em reação de PCR com cDNA de *B. brizantha* e *P. maximum*, sintetizados a partir do RNA pelo kit Superscripttm III RT, sem passar pelas reações do kit GeneRacertm. O protocolo seguido para a reação de PCR, com concentração de MgCl₂ de 1,5 mM, começou com o preparo de uma mix com 5 µL de 10x PCR Buffer, 1 µL de dNTP (10mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,25 µL de primer específico forward (10 mM), 1,25 µL de primer específico reverse (10 mM), 0,25 µL de Taq DNA Polymerase (5U/ µL) e 38,75 µL de H₂O_{MILIQ} autoclavada. Foi colocado 49 µL do mix em cada tubo de PCR adicionando 1 µL de cDNA a cada tubo, e um tubo com 1 µL de H₂O_{MILIQ}. O programa no termociclador para amplificação utilizou quarenta e quatro ciclos (Tabela 2).

Tabela 2 – Programa utilizado no termociclador com as temperaturas, tempo e ciclos

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	45 segundos	1
94 °C	45 segundos	
65 a 68 °C	30 segundos	44
72 °C	30 segundos	
94 °C	1 minuto	
65 a 68 °C	30 segundos	1
72 °C	1 minuto	
4 °C	infinito	

4.8.1 Preparo de gel de agarose 1%

Após amplificação em termociclador, as amostras foram aplicadas em gel de agarose. Para a preparação do gel de agarose 1% foram utilizado 50 mL de 0,5X TBE e 0,50g de agarose. Ambos foram colocados em um erlenmeyer (250 mL) e aquecidos até que a agarose estivesse totalmente dissolvida. A solução foi deixada em bancada até atingir 55 °C (temperatura morna), após foi adicionado 2 µL de Brometo de Etídeo, para uma concentração no gel de 0,04 µg/mL, e misturado gentilmente. A solução de agarose foi dispensada na cuba de eletroforese, devidamente vedada e com pente adequado. Com o gel solidificado, após 30 minutos aproximadamente, foi adicionado TBE 0,5X até cobrir o gel em pelo menos 1 mm. O pente e as laterais que garantem a vedação da cubeta foram removidos e aplicados em cada poço 5 µL de amostra com 1 µL de loading DNA. Após, a cuba foi fechada e ligada a eletricidade de modo a permitir a migração do DNA do pólo negativo para o positivo com a voltagem de 70 Voltz. Ao fim de 70 minutos, o gel foi analisado no transluminador com luz UV e fotografado.

4.8.2 Preparo de solução estoque TBE 5X

A solução estoque de TBE 5X foi preparada para 1 litro de H₂O_{MILIQ} e adicionados 54 g de base Tris, 27,5 g de ácido bórico e 20 mL de 0,5 M de EDTA, e ajustado para pH 8. Essa solução é diluída dez vezes para utilização no preparo e para cobrir o gel de agarose na cuba de eletroforese, sendo denominado TBE 0,5X.

4.8.3 Síntese de cDNA com Kit Superscript III First – Strand Synthesis System for RT-PCR

Para a síntese de cDNA, a concentração de RNA de cada amostra deve ser de 1 a 5 µg, para esta síntese foi utilizado 5 µg de amostra de *B. brizantha* (concentração de 2.028 µg/mL) e de *P. maximum* (concentração de 972 µg/mL). Portanto, o número de amostras utilizadas para síntese foi duas e mais um tubo denominado -RT. Foi preparado, primeiramente, um mix contendo 3 µL de 10mM dNTP e 3 µL de Oligo dT, pipetou-se múltiplas vezes e foi distribuído 2 µL do mix a cada tubo Eppendorf de 600 µL devidamente identificado. Adicionou-se 2,5 µL de RNA de *B. brizantha* com 5,5 µL de H₂O_{DEPC}, ao tubo identificado para a devida amostra. E para os tubos identificados para a amostra de *P. maximum*, foi adicionado 5,15 µL de RNA com 2,85 µL de H₂O_{DEPC}, e no tubo denominado -RT também foi adicionado RNA total adicionado de H₂O_{DEPC}. Essa reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos, depois a reação foi colocada em gelo por pelo menos um minuto. Enquanto isso foi preparado o segundo mix com 6 µL de 10X RT Buffer, 12 µL de 25 mM MgCl₂, 6 µL de 0,1DTT e 3 µL de RNase OUT, após misturar foi distribuído 9 µL deste mix a cada tubo. Adicionou-se 1 µL de SuperScript III RT (200U/ µL) aos tubos com RNA total de *B. brizantha* e de *P. maximum*, enquanto no tubo denominado -RT adicionou-se 1 µL de água. Após misturar gentilmente, a reação foi incubada a 50 °C em bloco aquecedor por 50 minutos. A reação foi terminada a 85 °C por 5 minutos, para inativação da enzima e em seguida colocada em gelo para proceder a remoção do RNA. Para a remoção do RNA, adicionou-se 1 µL de RNase H a cada tubo e foram incubados a 37 °C por 20 minutos, depois disso os cDNAs já estavam prontos para prosseguir com amplificação por PCR.

4.9 AMPLIFICAÇÃO DOS FINAIS DOS cDNAS (RACE – PCR)

Para a amplificação dos finais 5' e 3' dos cDNAs, utilizou-se os primers específicos dos três genes de interesse deste estudo (Figura 12), anelando com os primers do kit GeneRacer (Tabela 3).

Figura 12 – Amplificação dos finais 5' e 3' do cDNA RACE, respectivamente, utilizando os primers específicos que anelam com os primers GeneRacer

Tabela 3 - Primers do kit GeneRacer, tamanho dos primers, sequência e Tm, especialmente delineados para amplificar os finais 5' e 3' do cDNA

Nome	Tamanho	Sequencia	Tm
GeneRacer tm 5'Primer	23	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	74 °C
GeneRacer tm 3'Primer	25	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3	76 °C

A reação de amplificação por PCR – RACE foi seguida conforme especificações do fabricante, primeiramente todos os reagentes foram descongelados em gelo. Antes do preparo do mix (Tabela 4), todos os reagentes foram agitados com o auxílio de um agitador de bancada e brevemente centrifugados.

Para determinação dos parâmetros de ciclos foi necessário levar em conta a combinação entre GeneRacer primer e os primers específicos. O fabricante recomenda de 25 a 35 ciclos, dependendo da abundância de transcrição. Foi adotado 35 ciclos e o tempo recomendado pelo fabricante (Tabela 5).

Tabela 4 – Mix preparado para as amplificações dos finais

Reagente	5'RACE	3'RACE
GeneRacer™ 5'Primer, 10 µM	3 µL	-
Primer Gene-Específico R, 10 µM	1 µL	-
GeneRacer™ 3'Primer, 10 µM	-	3 µL
Primer Gene – Específico F, 10 µM	-	1 µL
cDNA	1 µL	1 µL
10X PCR Buffer	5 µL	5 µL
10 µM Solução de dNTP	1 µL	1 µL
50 µM Mg Cl ₂	2 µL	2 µL
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	0,5 µL	0,5 µL
H ₂ O MiliQ autoclavada	36,5 µL	36,5 µL
Total	50 µL	50 µL

Tabela 5 – Parâmetros cíclicos adotado segundo informações do fabricante.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	2 minutos	1
94 °C	45 segundos	
65 °C a 70 °C	30 segundos	35
72 °C	45 segundos	
94 °C	1 minuto	
65 °C a 70 °C	30 segundos	1
72 °C	1 minuto	
4 °C	Infinito	

Após, 5 µL da reação de amplificação foi aplicada em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram purificados e levados para realizar a reação de sequenciamento.

4.10 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE PRODUTOS DE PCR E PRODUTOS DE RACE-PCR CLONADOS

4.10.1 Concentração e purificação dos produtos de PCR

Antes de passar pelo processo de purificação para a reação de sequenciamento, foi necessário precipitar as amostras e ressuspender em um volume menor para concentrá-las. Foi adicionado 3 vezes a quantidade dos produtos de PCR de etanol absoluto e 1/10 de acetato de sódio, deixado de um dia para o outro em freezer -20 °C. No dia seguinte, o precipitado foi centrifugado a 14.000 rpm por 35 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 500 µL de etanol 75%, os tubos foram agitados vigorosamente com auxílio de um vórtex e centrifugados a 7.000g por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi descartado e os tubos foram invertidos e secaram em temperatura ambiente por 15 minutos. O pellet foi dissolvido em H₂O_{DEPC}, na proporção de metade da quantidade inicial.

Para a purificação foi utilizado o CyScribe™ GFX Purification Kit (GE Healthcare). Primeiramente, separaram-se os tubos e as colunas devidamente identificados com os nomes de cada amostra. Adicionou-se à coluna, 500 µL do tampão de captura e adicionou-se 100 µL de cada, volume máximo dos produtos de PCR que podem ser processados por esse protocolo, segundo instruções do fabricante. Pipetaram-se múltiplas vezes e centrifugou-se a 15000 rpm por 30 segundos. O líquido que sobrou no tubo coletor foi descartado e adicionou-se à coluna 500 µL de tampão de lavagem, e centrifugou-se a 15000 rpm por 30 segundos. Em seguida, o tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL devidamente identificado. Após, adicionou-se o tubo coletor 50 µL de tampão de eluição de preferência em temperatura morna e permaneceu em temperatura ambiente por um minuto. Centrifugou-se a 15000 rpm por um minuto para recuperação dos produtos de PCR, a coluna foi descartada e os produtos de PCR, agora purificados, foram verificado quantos a sua integridade em gel de agarose 1% (Figura 13).

Porém, é possível identificar através do gel de agarose na figura, uma grande perda de produtos e isso pode ter interferido na qualidade do sequenciamento.

Figura 13 - Produtos de PCR purificados pela CyScribe™ GFX Purification Kit (GE Healthcare), 3' e 5' do gene CCoAOMT em *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente

Com as dificuldades encontradas no protocolo de purificação com a coluna GFX, foi necessário buscar uma nova alternativa que pouco interferisse na quantidade final dos produtos de PCR. Um novo protocolo utilizado foi a purificação com ExoSAP-IT (GE- Healthcare). ExoSAP-IT utiliza duas enzimas hidrolíticas, Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de camarão, responsáveis por remover os dNTPs e Primers não consumidos durante a reação de PCR, e que interferem na reação de sequenciamento. A fosfatase alcalina de camarão hidrolisa os dNTPs restantes na reação de PCR. ExoSAP-IT é adicionado diretamente aos produtos de PCR, eliminando a purificação pela coluna com apenas com uma pipetagem e duas incubações, e os produtos de PCR já estão prontos para o sequenciamento. Portanto, foi adicionado 2 µL de ExoSAP-IT a 5 µL dos produtos de PCR, pipetou-se múltiplas vezes e a reação foi incubada em termociclador a 37 °C por 15 minutos, e para inativação da enzima, mais 15 minutos a 80 °C. Os produtos de PCR já estão prontos para a reação de sequenciamento.

4.10.2 Clonagem dos produtos de PCR utilizando pGEM®-T Vector (Promega) para sequenciamento

Foram feitas algumas tentativas, para poupar tempo, em sequenciar os produtos de PCR diretamente, mas não houve sucesso em todas as amostras.

Portanto, fez-se necessário a clonagem dos produtos para aumentar nosso produto final para o seqüenciamento.

Primeiramente, foi realizado o protocolo de reação de ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM® -T (Promega) (Figura 14), usando 2X Rapid Ligation Buffer, o mapa dos pontos de referência do vetor apresenta-se na figura 13. Para esta reação foi utilizado 4 µL dos produtos de PCR, 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL de pGEM-T Vector (50 ng), T4 DNA Ligase (3U / µL), totalizando 11 µL. Após homogenizar pipetando múltiplas vezes, a reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora.

Figura 14 - Vetor pGEM -T destacando os pontos de referências, T7 RNA polimerase sítio de início de transcrição (1), região de clonagem múltipla (10-113), promotor SP6 RNA polimerase - 17 a +3 (124-143), SP6 RNA polimerase sítio de início de transcrição (126), PUC/M13 sítio de ligação do primer de sequenciamento reverso (161-177), *lacZ* códon inicial (165), *lac* (185-201), β-lactamase região codificante (1322-2182), região phage f1 (2365-2820), pUC/M13 sítio de ligação do primer de sequenciamento (2941-2957) e promotor T7 RNA polimerase -17 a +3 (2984-3)

Após, realizou-se a transformação bacteriana utilizando a reação de ligação, descrita anteriormente. Adicionou-se 2 µL da reação de ligação aos tubos de One Shot® Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) sem pipetar e sem movimentos bruscos, devido a fragilidade das bactérias competentes, e foi deixado por 20 minutos em gelo. Após realizou-se um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e

imediatamente colocado em gelo por 2 minutos. Foi adicionado 300 μ L de S.O.C. Medium (Invitrogen) a cada tubo e foram incubados por 1 hora em agitação constante, aproximadamente 150 rpm, à 37 °C.

Durante o período de incubação, foi preparado o meio sólido LB. Para 300 mL de água destilada adicionou-se 6g de LB Broth e 4,5 g de ágar, após homogeneizar a solução, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Depois do meio esfriar, foi adicionado 60 μ L de ampicilina em 30 mL de meio LB e colocados nas placas de Petri, devidamente identificadas. Após solidificação, adicionou-se 10 μ L de IPTG (1M) e 32 μ L de X-GAL (80 ng/ μ L), espalhando bem sobre o meio solidificado. Usando IPTG e X-GAL facilita a seleção das colônias devido à coloração branca e azul. Normalmente, os clones contendo os produtos de PCR produzem colônias brancas, enquanto as colônias azuis podem ser resultados de clones de fragmentos.

A semeadura nas placas com ágar LB/ ampicilina/ IPTG/ X-GAL, foi realizada perto de um bico de Bunsen para evitar possíveis contaminações. Adicionou-se 100 μ L da cultura bacteriana transformada sobre a placa, e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalsky, flambada antes e após a utilização, as placas foram deixadas de um dia para outro em estufa incubadora a 37 °C.

4.10.3 Purificação do DNA plasmidial

Para a purificação do DNA plasmidial foi necessário escolher uma colônia, de uma única placa seletiva semeada, descrita anteriormente, e inoculada em 5 mL de meio LB com ampicilina em um tubo de 15 mL. Incubou-se por aproximadamente 8 horas com agitação vigorosa (250 rpm) a 37 °C. Após o período de incubação, foi inoculado 200 μ L da cultura inicial em 100 mL de meio de cultivo seletivo LB por 16 horas sob agitação vigorosa (250 rpm) a 37 °C.

As bactérias foram coletadas por centrifugação a 6000 x g por 15 minutos a 4 °C. Em um tubo suficientemente grande para a mistura dos três tampões de lise, o pellet bacteriano foi ressuspenso em 10 mL de Buffer P1 (EndoFree[®] Plasmid Maxi

Kit), misturou-se até desfazer o pellet bacteriano. Adicionou-se 10 mL do Buffer P2 (EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit), foi misturado várias vezes por inversão até obtenção de coloração homogênea, e foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após, foi adicionado 10 mL de Buffer P3 gelado, para melhor precipitação, e misturado por inversão várias vezes, até a solução apresentar-se incolor.

O lisado bacteriano foi adicionado ao cartucho QIAfilter Maxi, e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos, após período de incubação, o êmbolo foi inserido ao cartucho QIAfilter Maxi para filtragem do lisado em um tubo de 50 mL, cerca de 25 mL do lisado foi recuperado após filtragem. Adicionou-se ao lisado filtrado 2,5 mL de Buffer ER (tampão de remoção de endotoxinas), e misturou-se por inversão diversas vezes e incubou-se por 30 minutos em gelo, ao adicionar o tampão o filtrado apresentou-se turvo mas após o período de incubação ficou claro. Antes de adicionar o lisado bacteriano à coluna QIAGEN-Tip, aplicou-se 10 mL do Buffer QBT para equilibrar, e deixou-se que a coluna esvaziasse por gravidade. Ao adicionar o lisado à coluna, foi deixado em temperatura ambiente por 10 minutos. A coluna foi lavada duas vezes com 30 mL de Buffer QC, as lavagens são necessárias para remover os contaminantes da preparação dos plasmídios e para as cepas bacterianas que contém grandes quantidades de hidratos de carbonos.

O DNA foi eluído em 15 mL de Buffer QN e recolhido em tubo de 30 mL. Precipitou-se o DNA adicionando 10,5 mL de isopropanol, à temperatura ambiente, misturando gentilmente por inversão e centrifugou-se imediatamente a 15000 xg por 10 minutos. O isopropanol foi descartado e o pellet lavado em 5 mL de etanol 70%, à temperatura ambiente, e centrifugou-se a 15 000 xg por 10 minutos. O pellet secou em temperatura ambiente por 10 minutos e foi ressuspenso em 120 µL de TE. Foi colocado em gel de agarose pra confirmar integridade do plasmídio e também feito leitura em espectrofotômetro para quantificação.

4.10.4 Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamentos foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba. As reações de sequenciamentos seguiram o protocolo do kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Os reagentes utilizados para a reação de sequenciamento foram, 3 µL de Tampão Save Money (200 mM de Tris pH 9,0 e 0,5mM MgCl₂), 1 µL de primer de sequenciamento M13 (Tabela 6), 2 µL de Kit Big Dye, 100 ng de DNA e H₂O_{MILIQ} para completar 10 µL. A reação de sequenciamento consistiu em desnaturação 95 °C por 15 segundos, anelamento de 65 °C a 70 °C (os primers contém diferentes T_m) por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto, totalizando 25 ciclos, e a reação termina a 10 °C por tempo indeterminado.

Tabela 6 – Primers de sequenciamento para produtos clonados em vetor pGEM e as sequências forward e reversa

Primer de sequenciamento	Sequência
M13 Forward (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverso/pUC	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Para a purificação da reação de sequenciamento foi adicionado 2 µL de acetato de sódio/ EDTA (1,5 M NaAc e 259 mM EDTA) em cada poço da placa pipetando múltiplas vezes e agitar a placa vigorosamente com auxílio de um vórtex por aproximadamente 4 minutos. Adicionou-se 60 µL de etanol absoluto e pipetaram-se múltiplas vezes e em seguida colocou-se em centrífuga refrigerada a 4 °C por 45 minutos a 4.000 rpm. Após, o líquido da placa foi descartado e com a placa invertida sobre um papel toalha centrifugou-se por 1 minuto para retirar o excesso do líquido. Adicionou-se 150 µL de etanol 70% e levou-se a centrífuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 4.000 rpm. O etanol foi descartado e novamente com a placa invertida sobre um papel toalha, centrifugou-se por 1 minuto para retirada do excesso do álcool. A placa ficou secando em temperatura ambiente no escuro, após seca, foi selada com adesivo e embalada com papel alumínio e armazenada no freezer -20 °C, aguardando a aplicação no sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied

Biosystem).

A qualidade e o alinhamento das seqüências foram obtidas utilizando softwares Phred e Cap3 e para as comparações foi utilizado o programa Vetor NTI Advance 9.0 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparadas com sequencias de gramíneas com o genoma amplamente estudado e se encontram depositadas no GeneBank.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Para verificação da qualidade e quantificação do RNA extraído, foram realizadas leituras em espectrofotômetro e eletroforese em gel desnaturante. A razão ideal para comprovação da qualidade e pureza dos ácidos nucleicos, em água, é entre 1,6 a 2,0 (SAMBROK, 2001). Os resultados das leituras dos comprimentos de onda 260 nm, 280nm, razão 260/280 nm e a concentração µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 – Leitura em espectrofotômetro das amostras de *B. brizantha* e *P. maximum* em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, razão (260/280 nm) e concentração (µg/mL), para verificação da qualidade e quantidade de RNA extraído

Amostras	260 nm	280 nm	Razão 260/280 nm	Concentração (µg/mL)
<i>Brachiaria brizantha</i>	0,885	0,486	1,895	2028
<i>Panicum maximum</i>	0,485	0,291	1,919	972

A eletroforese em gel de agarose-formaldeído permitiu a avaliação da integridade do RNA total extraído eliminando o efeito da estrutura secundária, podendo observar as bandas estruturais do RNA ribossomal (18S e 28S) demonstrando integridade do RNA total (Figura 15).

Figura 15 - RNA total de *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente, para verificação da qualidade após extração

Durante a realização do protocolo de reações RACE, que consistiu em três tratamentos na molécula de RNA, desfosforilação, remoção da estrutura do terminal 5' e reação de ligação do RNA Oligo, foi necessário verificar a integridade do RNA, em gel de agarose-formaldeído (Figura 16), antes de dar continuidade ao protocolo e sintetizar o cDNA.

Figura 16 – RNA íntegro, *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente, após reação de ligação, pronto para reação de transcrição reversa

5.2 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS POR PCR

A avaliação da qualidade dos primers foi comprovada mediante amplificação dos insertos de tamanho predito verificados em gel de agarose 2%. Obteve-se sucesso nas amplificações testes dos primers, tanto em *P. maximum* (Figura 17) como em *B. brizantha* (Figura 18). Foi possível observar também que a síntese de cDNA, tanto de *B. brizantha* como de *P. maximum*, funcionou perfeitamente.

Figura 17 - Amplificação teste dos primers C4H (136 pb.), CCoAOMT (123 pb.) e PAL (290 pb.) respectivamente, em *P. maximum*.

Figura 18 - Amplificação teste dos primers C4H (136 pb.), CCoAOMT (123 pb.) e PAL (290 pb.), respectivamente, em *B. brizantha*.

5.4 AVALIAÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES DOS FINAIS DOS cDNAs RACE

O GeneRacer™ Kit foi utilizado com o intuito de obter o comprimento completo (full-length), regiões 3' e 5', do cDNA dos genes estudados. Foram feitas as amplificações dos finais 3' (1.060 pb) e 5' (486 pb) do gene C4H (Figura 19), para ambas espécies estudadas. Também se obteve sucesso nas amplificações dos finais 3' (883 pb.) e 5' (454 pb.) dos cDNAs de *B. brizantha* e *P. maximum* para o gene CCoAOMT (Figura 20), um dos genes mais estudados em relação a lignificação em plantas. Foram feitas amplificações, para ambas espécies estudadas, com o gene PAL (Figura 21), obtendo os finais 3' (1.181 pb.) e 5' (744 pb.).

Figura 19 - Amplificações dos cDNAs RACE dos finais 3' (1.060) e 5' (486 pb.) nas espécies de *B. brizantha* e *P. maximum* para o gene C4H

Figura 20 - Amplificações cDNAs RACE dos finais 3' (883 pb.) e 5' (454 pb.) nas espécies de *B. brizantha* e *P. maximum* para o gene CCoAOMT

Figura 21 - Amplificações cDNAs RACE dos finais 3' (1.181 pb.) e 5' (744 pb.) nas espécies de *B. brizantha* e *P. maximum* para o gene PAL

5.4 ANÁLISES DO SEQUENCIAMENTO

5.4.1 Análise do seqüenciamento do gene CCoAOMT em *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*

Em primeiro momento foi obtido sucesso no seqüenciamento dos produtos de PCR para o gene CCoAOMT em *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*. Já era esperado que com apenas dois primers específicos, (COMT R e COMT F) não seria o suficiente para cobrir todo o comprimento do gene, devido à limitação do seqüenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), quanto ao tamanho dos fragmentos. Foram obtidas regiões com o seqüenciamento, tanto em *B. brizantha* (Figura 23) como em *P. maximum* (Figura 25), porém, algumas regiões do gene não foram cobertas por esse seqüenciamento, demonstrando a necessidade de novos primers internos.

Figura 22 - Fragmentos obtidos pelo seqüenciamento do gene CCoAOMT em *B. brizantha* e em destaque as regiões do gene que ainda faltavam ser cobertos pelo seqüenciamento

Figura 23 - Fragmentos obtidos pelo seqüenciamento do gene ccoAOMT em *P. maximum* e em destaque as regiões do gene que ainda faltavam ser cobertos pelo seqüenciamento

Foi utilizado como padrão para comparação das seqüências o gene

CCoAOMT do milho (AJ242980 Zea mays Caffeoil CoA O-methyltransferase, 1136 pb), pois possui uma alta similaridade entre todos os genes da família CCoAOMT no milho. Obteve-se uma alta similaridade entre os fragmentos seqüenciados do gene CCoAOMT das forrageiras tropicais com o gene do milho depositado no GenBank, 82% para a espécie *B. brizantha* (Figura 24) e 93% para *P. maximum* (Figura 26).

Score = 524 bits (580), Expect = 1e-152 Identities = 423/510 (83%), Gaps = 41/510 (8%) Strand=Plus/Plus				
5101867	511	CCACAAGATCGACTTCCGCGAGGGTCCCGCGCTCCCGTCCTCGACGACCTCATCGCGGA	570	
Bb.	286	T.....A...C....C...T.....A...A.G..T.....	345	
5101867	571	GGAGAAGAACCACGGGTCGTTTCGACTTCGTCTTCGTGGACGCCGACAAGGACAACCTACCT	630	
Bb.	346	C..A.....C..C.....A.A.....T.....	405	
5101867	631	CAACTACCACGAGCGGCTGCTGAAG-CTGGTGAAGCTGGGCGGCCTCATCG-GCTACGAC	688	
Bb.	406	C...G..C..C...A.C.....A.....	465	
5101867	689	AACACGCTGTGGAACGGCTCCGTCGTGCTCCCCGACGACGCGCCCATGCGCAAGTACATC	748	
Bb.	466	C.....C.....	525	
5101867	749	CGCTTCTACCGCGACTTCGTGCTCGTCCTCAACAAGCGCTCGCCGCCGACGACCGCGTC	808	
Bb.	526	G.....	585	
5101867	809	GAGATCTGCCAGCTCCCGTCGGCGACGGCGTCACCCTCTGCCGCCGCGTCAAGTGAAAA	868	
Bb.	586	GC.	645	
5101867	869	---CATGCCCTGGCCTGGCCTGCC-CCACCACGCCACCGACGGCGCCGCCGGCCGCATC	924	
Bb.	646	CGG...T.GTCC.T...T.A...GT.C.....-----...A..-----	689	
5101867	925	CTCATTTCCAATCATAATAGACGACCCGCGAGCATTATTA-----ATTATCCACCGGCTttttt	977	
Bb.	690	-----.....---.....G....G.....ATTAATT.....TT.....---.C..	737	
5101867	978	tttttGGCTCTTTCTTGCCCTGTTATCTT	1007	
Bb.	738	GC.....G.....A.....	767	
Score = 264 bits (292), Expect = 2e-74 Identities = 232/288 (81%), Gaps = 11/288 (4%) Strand=Plus/Plus				
5101867	86	GCAATGGCCACCACGGCGACCGAGGCGGCGCCGGCGCAGG-----AGCAGCAGGCC	136	
Bb.	1	..G.....G...C.....A.....GC..CGGCCGAGC.....	60	
5101867	137	AACGGCAACGGCGAGCAGAAGACGCGGCACTCCGAGGTCGGCCACAAGAGCCTGCTCAAG	196	
Bb.	61	TT.....A.....C.....A.G....T..C.....A	120	
5101867	197	AGCGACGACCTCTACC-AGTACATCTGGACACGAGCGTGTACCCGCGGGAGCCGGAGAG	255	
Bb.	121	TAC.....T.....A...TT.T.C....G.....ATC.T.T	180	
5101867	256	CATGAAGGAGCTCCGCGAGGTCACCGCCAAG-CACCCATGGAACCTGATGACGACCTCCG	314	
Bb.	181	AAA.A.AA....G.....AT.....G.AT.	240	
5101867	315	CCGACGAGGGGCGAGTTCTGAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCA	362	
Bb.	241	AG..G.....T....C.....	288	

Figura 24 - Comparação dos fragmentos do gene CCoAOMT de *B. brizantha* com o gene depositado no GeneBank AJ242980.1 Zea mays mRNA Caffeoil CoA O-methyltransferase (gi 5101867)

```

Score = 681 bits (754), Expect = 0.0
Identities = 435/469 (93%), Gaps = 5/469 (1%)
Strand=Plus/Plus

5101867 248 CCGGAGAGCATGAAGGAGCTCCGCGAGGTCACCGCCAAGCACCCATGGAACCTGATGACG 307
Pan. 1 .....G.GA..... 60

5101867 308 ACCTCCGCCGACGAGGGGCAGTTCCTGAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAG 367
Pan. 61 ..G..G..A.....C.....C..... 120

5101867 368 ACCATGGAGATCGGCGTCTACACCGGCTACTCCCTCCTCGCCACGGCGCTCGCCCTCCCG 427
Pan. 121 .....A.....C..A.....C 180

5101867 428 GAGGACGGCACGATCTTGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACGAGCTGGGCCTGCCC 487
Pan. 181 .....C..... 240

5101867 488 TGCATCGAGAAGGCCGCGTCGCCACAAGATCGACTTCCGCGAGGGTCCCGCGCTCCCC 547
Pan. 241 .....C.....T..T... 300

5101867 548 GTCCTCGACGACCTCATCGCGGAGGAGAAGAACCACGGGTCGTTGACTTCGTCTT-CGT 606
Pan. 301 .....A.....CAGC.....A... 360

5101867 607 GGACGCCGACAAGGACAACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTGAAGCT-GGTGAAGC 665
Pan. 361 T.....C.....AC.....A 420

5101867 666 T-GGGCGGCCTCATCGGCTACGACAACACGCTGT--GGAACGGCTCCGT 711
Pan. 421 .AC.....T.....N..GC.T..... 469

```

Figura 25 - Comparação dos fragmentos do gene CCoAOMT de *P. maximum* com o gene depositado no GeneBank AJ242980.1 Zea mays mRNA Caffeoil CoA O-methyltransferase (gi 5101867)

Após seqüenciamento, foi possível delinear novos primers internos, com o intuito de cobrir as regiões do gene CCoAOMT em *B. brizantha* e *P. maximum* que ainda faltavam ser sequenciadas. Portanto, o primer COMT 5' R foi alinhado com o primer COMT F (5'-ACCCGCGAGAGCCGGAGAGC-3'), já utilizado anteriormente. Enquanto o primer COMT 3' F foi alinhado com o primer GeneRacer 3' do kit. Após purificação foram aplicados em gel de agarose 2% com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) (Figura 26), e prosseguiu-se a reação de seqüenciamento.

A reação de sequenciamento obteve sucesso apenas para a amostra de *P. maximum* (Quadro 1), se fazendo necessária a otimização das condições de sequenciamento para *B. brizantha* (Quadro 2). Os resultados obtidos para o seqüenciamento do gene COMT em *Panicum maximum* obteve similaridade entre as seqüências de nucleotídeos de 92% com o milho ([\[AJ242980.1\]](#) Zea mays mRNA for Caffeoil CoA O-methyltransferase (ccoAOMT gene), 1136 BP) e de 91% com o arroz ([\[AY644636.1\]](#) Oryza sativa (japonica cultivar-group) caffeoil-CoA O-methyltransferase) (Figura 27).

Figura 26. Produtos de PCR da amplificação do gene COMT com os primers internos de *B. brizantha* e *Panicum maximum*, purificados e prontos para posterior sequenciamento.

Quadro 1 - Sequência do gene CCOAOMT em *P. maximum*

> Consenso COMT_Panicum

CCGGAGAGCATGAAGGAGGTGAGCGAGGTCACCGCCAAGCACCCATGGAACCTGATGA
CGACGTCGGCAGACGAGGGCCAGTTCCTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAA
GAAGACCATGGAGATCGGCGTCTACACCGGATACTCCCTCCTCGCCACCGCACTCGCC
CTCCCCGAGGACGGCACGATCCTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACGAGCTGG
GCCTGCCCTGCATCGAGAAGGCCGGCGTCGCCACAAGATCGACTTCCGCGAGGGCC
CCGCTCTTCCCGTCCTCGACGACCTCATCGCAGAGGAGAAGAACCACGGCAGCTTCGA
CTTCGTCTTACGTTGACGCCGACAAGGACAACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTC
AAGCTACGTGAAGATACGGCGGCCTCATCGGTTACGACAACACGCNGTGCGTAACGGCT
CCGT

Quadro 2 - Sequencia consenso dos fragmentos obtidos do gene CCoAOMT em *B. brizantha*

>Seq. Consenso CCoAOMT_Bb.

GCGATGGCCAGCACCGCGACCGAGGCGGCACCGGCGGCGGCGGCCGAGCAGCAGGCGCA
ACGGTTACGGCAAGCAGAAGACGCGCCACTCCGAGGTCAGGCACATGACCCTGCTCAAAGCGT
ACACCTCTACCTAGTACATCCTGAACATTATCCTGTAGCCGCGGGAGCATCATATCATGAAGGAGCT
AAACAAAATCACGGCCAAGATACCCATGGAACCTGATGACGACGTATGAGGAGGAGGGGCATTTC
CTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCACTAGATCGACTTACGCCAGGGCCCCCTCGCTCCCC
GTACTCAAGGATCTCATCGCGGACGAAAAGAACCACGGCTCCTTCGACTTCGTCTTCATAGACGC
CTACAAGGACAACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTCAAGGCTCGTCAAGATCGGCGGCCT
CATCGAGCTACGACAACACGCTCTGGAACGGCTCCGTCGTGCTCCCCGACGACGCCCCCATGCG
CAAGTACATCCGCTTCTACCGCGACTTCGTGCTCGTCTCAACAAGGCGCTCGCCGCCGACGAG
CGCGTCGAGATCTGCCAGCTCCCCGTCGGCGACGGCGTCAACCCTCTGCCGCCGCGTCAAGTGA
GCACGGCATTCTGTCGTCATGCCGTCCCCACCGCCACCCGACCCCAATCATAGGCGACGC
GCAGCATTAAATTAATTATTATTACCGTCTTTTTTTGGCTGCTTCTTGCCCTGTAATCTT

Score = 210 bits (232), Expect = 3e-58				
Identities = 136/149 (91%), Gaps = 0/149 (0%)				
Strand=Plus/Plus				
ccoAomt	47	GGAACCTGATGACGACGTCGGCAGACGAGGGCCAGTTCCTCAACATGCTCATCAAGCTCA	106	
644636.1	508	G.....G..A.....G...C....GC.G.....	567	
ccoAomt	107	TCGGCGCCAAGAAGACCATGGAGATCGGCGTCTACACGGATACTCCCTCCTCGCCACCG	166	
644636.1	568	C.....	627	
ccoAomt	167	CACTCGCCCTCCCCGAGGACGGCACGATC	195	
644636.1	628	.C.....A.....C.....G..	656	

Figura 27 - Identidade da sequência nucleotídica do gene CCoAOMT entre *P. maximum* e arroz

Após todos os seqüenciamentos realizados, foi possível construir uma sequência consenso do gene CCoAOMT para a espécie de *P. maximum* (Quadro 3).

Quadro 3 - Sequencia do gene CCoAOMT em *Panicum maximum*

```
>Região consenso CCoAOMT_Pan.
ACTGTCCGCAATGGCCAACACGGCGAACGACGTGGCCAAGGCGGCGGAGCCGCCGGC
CGAGCAGCAGCAGCAGGCTAACGCAACGGCGAGCAGAAGACGCGCCACTCCGAGGTC
GGGCACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGATGATCTCTACCAGTACATACTTGACACCAGCGT
GTACCCGCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTGCGCGAGGTCACCACCAAGCACCC
ATGGAACCTGATGACCACGTCGGTAGACGAGGGCCAGTTCCTCAACATGCTCATCAAGC
TCATCGGCGCCAAGAAGACCATGGAGATCGGCGTCTACACGGATACTCCCTCCTCGCCA
CCGCACTCGCCCTCCCCGAGGACGGCACGATCCTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAA
CTACGAGCTGGGCCTGCCCTGCATCGAGAAGGCCGCGTCGCCCCACAAGATCGACTTC
CGCGAGGGCCCCGCTCTTCCCGTCTCGACGACCTCATCGCAGAGGAGAAGAACCAC
GGCAGCTTCGACTTCGTCTTACGTTGACGCCGACAAGGACAACCTCAACTACCACG
AGCGGCTGCTCAAGCTACGTGAAGATACGGCGGCCTCATCGGTTACGACAACACGCNG
TGCGTAACGGCTCCGTCTGTGCTCCCCGACTACGCCCCCATGCGCAAGTACATCCGCTTC
TACCGCGACTTCGTGCTCGTCTCAACAAGGCGCTCGCAGCCGACGAGCGCGTCGAGA
TCTGCCAGCTCCCCGTGGCGACGGTGTACCCCTCTGCCGCCGCGTCAAGTGAGCAC
GTGATCCCTGCAGCACCGACGGCGGCGGCGGCGACCGCCAACCGACACCAATCATAG
GCGACGCGCAGCATTAAATTATTTACCGTCTTTTTGGCTCTTTCTTGCCCTGTATT
CTT
```

Não foi possível obter alguns pares de bases dos finais 5' e 3' do gene em *P. maximum*, no entanto, através dos seqüenciamentos foi possível cobrir o gene CCoAOMT quase inteiro (Figura 28). Ao comparar a região consenso do gene CCoAOMT em *P. maximum*, agora quase completa, com a sequência do milho (gi 5101867/[AJ242980.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AJ242980.1) Zea mays mRNA for Caffeoil CoA O-methyltransferase (ccoAOMT gene), 1136 bp), encontrou-se 87% de similaridade entre as sequências nucleotídicas (Figura 29).

Figura 28. Regiões do gene CCoAOMT cobertas pelo seqüenciamento, e em destaque as regiões quais não foram possíveis seqüenciar na espécie de *P. maximum*

As comparações tomam como referência o milho, por ser uma das gramíneas mais amplamente estudadas, devido sua importância agrônômica na alimentação humana, dos animais e mais recentemente na produção de etanol. Com isso, o milho tornou-se padrão de comparação em nosso estudo devido aos grandes avanços no conhecimento do genoma desta gramínea.

O gene CCoAOMT no milho é composto por uma família de 5 genes (BARRIÈRE et al., 2007; GUILLAUMIE et al., 2008; BARRIÈRE et al., 2009). Na tabela 8, encontram-se os cinco genes da família CCoAOMT relatados na literatura e depositados no GenBank e no Maize Wall.

Identities = 832/957 (87%), Gaps = 51/957 (5%)					
Strand=Plus/Plus					
5101867	79	ACTGCACGCAATGGCCACACGGCGACCGA-----GGCGG---CGCCGGC---	120		
Pan.	1	TC.....A.....A...CGTGGCCAAGGC.....AGC.....CGA	60		
5101867	121	GCAGGAGCAGCAGGCCAACGGCAACGGCGAGCAGAAGACGCGGCACTCCGAGGTCTGGCCA	180		
Pan.	61	C.....T.....-.....C.....G...	119		
5101867	181	CAAGAGCCTGCTCAAGAGCGACGACCTCTACCAGTACATCCTGGACACGAGCGTGTACCC	240		
Pan.	120	T..T.....A..T....C.....	179		

5101867	241	GCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTCCGCGAGGTACCGCCAAGCACCCATGGAACCT	300
Pan.	180	G.....A.....	239
5101867	301	GATGACGACCTCCGCCGACGAGGGGAGTTCTTGAACATGCTCATCAAGCTCATCGGC	360
Pan.	240	C..G..G.TA.....C.....C.....	299
5101867	361	CAAGAAGACCATGGAGATCGGCGTCTACACCGGCTACTCCCTCCTCGCCACGGCGCTCGC	420
Pan.	300	-...A.....C..A.....	358
5101867	421	CCTCCCGGAGGACGGCAGATCTTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACGAGCTGGG	480
Pan.	359	C.....C.....	418
5101867	481	CCTGCCCTGCATCGAGAAGGCCGGCGTCGCCACAAGATCGACTTCCGCGAGGGTCCCGC	540
Pan.	419	C.....	478
5101867	541	GCTCCCGTCTCTCGACGACCTCATCGCGGAGGAGAAGAACCACGGGTCGTTCTGACTTCGT	600
Pan.	479	T..T.....A.....CAGC.....	538
5101867	601	CTT-CGTGGACGCCGACAAGGACAACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTGAAGCT-G	658
Pan.	539	...A..T.....C.....AC	598
5101867	659	GTGAAGCT-GGGCGGCCTCATCGGCTACGACAACACGCTGT--GGAACGGCTCCGTCGTG	715
Pan.	599	A.AC.....T.....N..GC.T.....	658
5101867	716	CTCCCCGACGACGCGCCCATGCGCAAGTACATCCGCTTCTACCGCGACTTCGTGCTCGTC	775
Pan.	659	T....C.....	718
5101867	776	CTCAACAAGGCGCTCGCCGCCGACGACCGCGTCGAGATCTGCCAGCTCCCCGTCGGCGAC	835
Pan.	719	A.....G.....	778
5101867	836	GGCGTCACCCTCTGCCGCCGCGTCAAGTGAAAACATGCCCTGGCCTGGCCTGCCCCACCA	895
Pan.	779	..T.....GC..G..AT.---.....G..	827
5101867	896	CCGCCACCGACGGCGCCGCCGCGCATCCTCATTCCAATCATAATAGACGACCCGCAGC	955
Pan.	828	...--A..G.....G..G..A....CAA.CG.CA.....G....G.....	881
5101867	956	ATT-----AATTATCCACCGGCTtttttttttGGCTCTTTCTTGCCCTGTTATCTT	1007
Pan.	882	...AATTA.....TT....---.C.....G.....AT....	934

Figura 29 - Identidade entre as sequencias nucleotídicas do gene CCoAOMT do *Panicum maximum* com o milho (gi 5101867|[AJ242980.1](#)| Zea mays mRNA for Caffeoyl CoA O-methyltransferase (ccoAOMT gene), 1136 bp

Tabela 8 - Genes da família CCoAOMT em milho depositados no GenBank e contig depositados no Maize Wall

Gene	Contig	Nº acesso
CCoAOMT 1	2943966.2.1	AI855419/ NM_001159039
CCoAOMT 2	2455940.2.2	DR959360/ AJ242981
CCoAOMT 3	2591258.2.1	DT643982/ AY104670
CCoAOMT 4	2455940.2.1	AY104406
CCoAOMT 5	2430769.2.1	AW231479/NM_001158979

Fonte: <http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/MAIZEWALL/descr.php?id=75>

Primeiramente, foi comparado os fragmentos do gene CCoAOMT seqüenciados na espécie de *Brachiaria brizantha* com os cinco genes que compõem a família deste gene no milho (Figura 30), descritos até hoje na literatura, para possivelmente identificar a semelhança, e o alinhamento múltiplo foi realizado

através do software ClustalW entre as regiões sequenciada do gene CCoAOMT em *B. brizantha* e os cinco genes desta família no milho (Quadro 4).

Quadro 4 - Alinhamento múltiplo entre os cinco genes da família CCoAOMT em milho com o fragmento sequenciado em *B. brizantha*

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCACGAGCGAGTACCCGACGCGTAGCTAGTTCTATTGCCGCACCCAGAG
gi 5101869 gb AJ242981.1	-----CGCAAGCCAGTGCCGCGCCAGATCTCCGCGACAGA
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	-----AACGAAGCCACAAGCA
gi 21207748 gb AY104670.1	-----
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----GCGATGGCCAGCACCGCG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TCTCCAGGAGGGACTCGTTCGTTTCAGCTAACTACACTGCACGCAATGGCC
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCAGTCGTTTCGT-CCAGCTAACTGCAGTGCACGCAATGGCCACCGCG
gi 226495420 ref NM_001159039.	--ACGAAGGACCTTAGCAGAGCTCAAGTACCTGCGCGGCCAGCTATAGA
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GCGCGCGAGCCACAGCTAGCACCACCACCTGCACCGCACCCGCACCGA
gi 21207748 gb AY104670.1	-----G
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	ACCGAGGCGGCACCGCG---GCGGCGGCCGAGCAGCAGCAGGCCAACGG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	ACCACGGCGACCGAGGCG---GCGCGGCGCGAGGAGCAGCAGGCCAACGG
gi 5101869 gb AJ242981.1	ACCGAGGCGACCAAGACGACTGCACCGGCGCAGGAGCAGCAGGCCAACGG
gi 226495420 ref NM_001159039.	CAAGAGGCGGCTTGGAGAGGCGAGCACCATCATCCATGGC-GCCCTCCGG
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACGAACAGATCT--ATCGATCGATAGCTAGATCCATGGC-TGCCGCGCG
gi 21207748 gb AY104670.1	CACGAGACGCGATAGCAAAACCTTCCGTCGGAGGATGGC-TTCCGCGCG
	* ** ** *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	TTACGGCAA-----GCAGAAGAC-GCGCC--ACTCCGAGGTGAGGCAC
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	CAACGGCGA-----GCAGAAGAC-GCGGC--ACTCCGAGGTGCGGCAC
gi 5101869 gb AJ242981.1	CAACGGCAA-CGGCGAGCAGAAGAC-GCGCC--ACTCCGAGGTGCGGCAC
gi 226495420 ref NM_001159039.	TGAC-----ACCATGCCCCTCGTCCACAGC-GGCATGGACAGCAGCAAC
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CGACGACACCACCATCGCGCAGGTCCACAGC-GGCATCGACAGCAGCAAC
gi 21207748 gb AY104670.1	CGCTGG---AGAAGGGAAGGAGACGGCTGCCGGGAGCAGCTCCACAGC
	* * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	ATGACCCTGCTCAAAAGCGTACACCTCTACCTAGTACATCTGAACATTA
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	AAGAGCCTGCTCAAGAGCGACGACCTCTACC-AGTACATCTGGACACGA
gi 5101869 gb AJ242981.1	AAGAGCCTGCTCAAGAGCGACGACCTCTACC-AGTACATCTGGACACGA
gi 226495420 ref NM_001159039.	AAGACGCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTCTACA-AGTATGCTCGACACGT
gi 226501215 gb NM_001158979.1	AAGACGCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTCTACA-AGTACGCTGGACACGT
gi 21207748 gb AY104670.1	AAGACTCTCTCAAGAGCCAACACTGTACC-AGTACATAGTGAATCCA
	* ** ** * * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	TCCTGTAGCCGCGGGAGCATCATATCATGAAGGAGCTAAACAAAATCAG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCGTGTACCCGCGGGAGCCGAGAGCATGAAGGAGCTCCGCGAGATCACC
gi 5101869 gb AJ242981.1	GCGTGTACCCGCGGGAGCCGAGAGCATGAAGGAGCTGCGCGAGATCACC
gi 226495420 ref NM_001159039.	CGGTGTGTCGCGACGAGCCAGAGTGCATGCGTGAGCTGCGGCTCGTGACC
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CGGTGTGTCGCGACGAGCCGAGAGCATGCGTGAGCTGCGGCTGGTGACC
gi 21207748 gb AY104670.1	CCGTGTTCCACGCGAGCCGAGTGCCTGCGGGAGCTCCGCTCGCCACC
	* ** * * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	GCCAAGATACCCATGGAACCTGATGACGACGTATGAGGAGGAGGGGCATT
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCCAAG-CACCCATGGAACCTGATGACGACCTCCGCGGACGAGGGGCAGT
gi 5101869 gb AJ242981.1	GCCAAG-CACCCATGGAACCTGATGACCACTCCGCGGACGAGGGGCAGT
gi 226495420 ref NM_001159039.	GACAAG-CACGAGTGGGGGTTTCATGCACTGCTCGCCGACGAGGCGCAGC
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACAAG-CACGAGTGGGGGTTTCATGCACTGCTCGCCGACGAGGCGTCGC
gi 21207748 gb AY104670.1	GCCACC-CACCCCATGGCGGCATGGCTGCGTGCCTGCGGACGAGGTGCAGC
	* ** ** * * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	TCCTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCA-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TCCTGAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATGGAGATC
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCCTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATGGAGATC
gi 226495420 ref NM_001159039.	TGCTGCGGATGCTCATCAAGCTCACCGGCGCGCGCGCACCTGGAGGTG
gi 226501215 gb NM_001158979.1	TGCTGCGGATGCTCATCAAGCTGAGCGGCGCGCGCGGACGCTGGAGGTG
gi 21207748 gb AY104670.1	TGCTGCACTCTGATCGAGATTCTTGGCGCCAAGAAGCCATCGAGGTT
	* ** * * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----

gi 226501215 gb NM_001158979.1	CCATCGCCGACGGCGTCACCATCTGCCGCCGCGTCGTCTGATGTGATGA-
gi 21207748 gb AY104670.1	CCATCGCCGACGGGCTCACGCTGTGCCGCCGCGTCGCTGATCCGTATC-
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----CGGCATTTCGT-----CC--GTCTGTGTC
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	-----CATGGCCTGG-----CCTGGCCTGCC
gi 5101869 gb AJ242981.1	AGAAAAAAAAAACACATACCCCTGCGTTCCCTGCTGCCCCCGGCTCCGTC
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----GTGCGTGCCAGGGCATGCATGCATGGCT
gi 226501215 gb NM_001158979.1	-----TGATCCGACGACCAAGATCGTATATCATT
gi 21207748 gb AY104670.1	-----CGGTTATCCGCCCTCGAAATACAGCAGAGC
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	ATGCCGTCCCCACCGCCA-----CCCGACCCCAATCATA
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	CCACCACCGCCACCGACGCGCGCCGCGCCGCATCCTCATTCCAATCATA
gi 5101869 gb AJ242981.1	TGGCCCCCACCGCCACCGACGGCGCGCCGACCCCGCTCCAATCATA
gi 226495420 ref NM_001159039.	CGCGTGTGGATATT--CCGT--CGACCAGTTCTCCATCCGATCCGTTTGGTT
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CGCTCGTCTGCTCTGTGCAT--CTTCAACTGCCTGCCGCTGCCGTCGTC
gi 21207748 gb AY104670.1	TGTGGGCTGTGCTGACACTGCTGTGAGCTCTGTGCTTGAATGGCCATG
	* * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----GGCGACGCGCAGCATTA-----TTAATTATTATTTACCGTCTTT
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	A--TA-GACGACCCGCGCAGCATTA-----TTATCCACCGGCT-----TTTT
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCGTA-GACGACGCGCAGCATTAATTTATCAATCACCAGGCTCTGGCTCTT
gi 226495420 ref NM_001159039.	GTTG--CATGATG--C----TTTCA--ATAAAGATCTGTTTCTCTCCA
gi 226501215 gb NM_001158979.1	AACT--AATAATG--CATGGTTCTG--CTGGTTCCTTTTTTTTATTTTC
gi 21207748 gb AY104670.1	GTCTGTAATAACGAACCTGGGCTTGA--GCGAAAAATAATCCACCAGCGC
	* * *
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	TTTTGGCTGCTTCTTGCC--CTGTAAT--CTT-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TTTTGGCTCTTCTTGCC--CTGTAAT--CTTCTCCTCCTCTTCCT
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCTTGGCCCTGTACTGTACTACTATACTAATGTCCCTTCTGTTTTTTTT
gi 226495420 ref NM_001159039.	AAAAAAAAAAAAA-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	TTTTGTGCTTGCATTGTGTGTTGAGTTGAACATCCCCCGGATGTACT
gi 21207748 gb AY104670.1	GCTAGCGTGTGTGAGCATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TCTTGGGAATTGTGCGCCGCTTTCGATACGTAAATCACGAGATCGGTAA
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCTTGGGAATTGTGCGCGTTTCAGTATACGTAAATCTCGATGTCGATAA
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GCAACAACCTGGMATGCAATGCAACATCATGCGTACAAAAAAAAAAAAA
gi 21207748 gb AY104670.1	AAAAAAAAA-----
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TACAGTAATGCTCCTCAATTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
gi 5101869 gb AJ242981.1	TACAGTACTACTACCAATTTAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	A-----
gi 21207748 gb AY104670.1	-----
Seq.Consenso CCoAOMT Bb.	-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
gi 5101869 gb AJ242981.1	-----
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	-----
gi 21207748 gb AY104670.1	-----

As similaridades entre as regiões sequenciadas do gene CCoAOMT em *Brachiaria brizantha* com as sequências deste mesmo gene no milho foi de 89,6% com CCoAOMT 1, 87% com CCoAOMT 2, 88,6% para CCoAOMT 3, 88% com CCoAOMT 4 e 70% com CCoAOMT 5.

Figura 30 - Comparação entre as regiões seqüenciadas do gene CCoAOMT em *Brachiaria brizantha* com os genes da família CCoAOMT 1 (NM 001159039 Zea mays Caffeoil CoA O-methyltransferase 1 961 bp), CCoAOMT 2 (AJ 242981 Zea mays mRNA Caffeoil CoA O-methyltransferase 2, 1167bp), CCoAOMT 3 (AY 104670 Zea mays PCO 117754 mRNA sequence, 976bp), CCoAOMT 4 (AY 104406 Zea mays PCO 108855 mRNA sequence, 1146bp) e CCoAOMT 5 (NM 001158979 Zea mays LOC 100286091 (PCO 131734) mRNA, 1075bp), respectivamente

As regiões do gene CCoAOMT que foram seqüenciadas na espécie de *P. maximum*, foram também comparadas com os 5 genes da família CCoAOMT existentes no milho, para comparação do grau de similaridade entre os genes destas duas espécies de gramíneas. O alinhamento múltiplo foi realizado através do software ClustalW entre a região seqüenciada do gene CCoAOMT em *P. maximum* e os cinco genes desta família no milho (Quadro 5). A partir das comparações, foi possível visualizar o fragmento do gene CCoAOMT de *P. maximum* em relação aos

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	-----
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCACGAGCGAGTACCCGACGCGTAGCTAGTTCTATTGCCGCACCCCAGA
gi 5101869 gb AJ242981.1	-----CGCAAGCCAGTGCCGCGCCC-AGA
gi 21207748 gb AY104670.1	-----
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----
gi 226501215 gb NM_001158979.1	-----AACGAAGC
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	-----AC---T-GTCCG--CAATGGCCAACACGGCGAACGACG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TCTCCAGGAGGGAC---TCGTTCTGTTCAGCTAACTACACTGCACGCAATG
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCTCCGCGACAGATCAGTTCGTTCTCGTCCAGCTAACTGCAGTGCACGCAATG
gi 21207748 gb AY104670.1	-----GCACGAGACG
gi 226495420 ref NM_001159039.	-----ACGAAGGACCTTAGCAGAGCTCAAGTACCTGCGCGCGCCA
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CACAAGCAGCGCCGCGAGCCACAGCTAGCACACCACCTTGACCCGACCC **
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	-TGGCCAAGGCGGCGGAGCCG-----CCGGCCGAGCAGCAGCA
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCCACCACGGCGACCGAGGCG-----GCGCCGGCGCAGGAGCA
gi 5101869 gb AJ242981.1	GCCACCACGGCGACCGAGGCGCAACAGCAGCTGCACCGGCGCAGGAGCA
gi 21207748 gb AY104670.1	-----GCGATAGCAAACCT-----TCCGTGCGGAGGATGGCTT
gi 226495420 ref NM_001159039.	GCTATAGACAAGAGGCGGCTTGGAGAGGCAGGCACCATCATCCATGGCGC
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CGCACCGAGACGAACAGATCT--ATCGATCGATAGCTAGATCCATGGCTG *
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	GCAGGCTAACG-----CAACGGCGAGCAGAAGACGCGCCACTCCGAGG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GCAGGCCAACCG-----CAACGGCGAGCAGAAGACGCGGCCTCCGAGG
gi 5101869 gb AJ242981.1	GCAGGCCAACCGCAACGGCAACGGCGAGCAGAAGACGCGCCACTCCGAGG
gi 21207748 gb AY104670.1	CC--GCCGCGCT---GGAGAAGGAAGGAGACGGCTGCCGGGAGCAGCC
gi 226495420 ref NM_001159039.	CC--TCCGGTGAC-----ACCATTGCCCTCGTCCACAGCGGCATGGACA
gi 226501215 gb NM_001158979.1	CC--GGCGGCGACGACACCACCATCGCGCAGGTCCACAGCGGCATCGACA * *
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	TCGGGCACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGATGATCTCTACCAGTACATACTT
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	TCCGCCACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGAGCACCCTTACCAGTACATCCTG
gi 5101869 gb AJ242981.1	TCGGCCACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGAGCACCCTTACCAGTACATCCTG
gi 21207748 gb AY104670.1	TCCACAGCAAGACTCTCTCAAGAGCCAACCACTGTACCAGTACATCCTG
gi 226495420 ref NM_001159039.	GCAGCAACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTCTACAAGTATGTCCTC
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GCAGCAACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTCTACAAGTATGTCCTG * ***** * *** *** ***
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	GACACCAGCGTGTACCCGCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTGCGCGA
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GACACGAGCGTGTACCCGCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTCCGCGA
gi 5101869 gb AJ242981.1	GACACGAGCGTGTACCCGCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTGCGCGA
gi 21207748 gb AY104670.1	GAATCCACCGTCTTCCACGCGAGCCGGAAGTGCCTGCGGGAGCTCCGCGT
gi 226495420 ref NM_001159039.	GACACGTCGGTGTGCGCGACGAGCCAGAGTGCATGCGTGAGCTGCGCCT
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACACGTCGGTGTGCGCGACGAGCCGAGAGATGCGTGAGCTGCGCCT ** * ** * ***** ** * ***** **
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	GGTCAACCACCAAGCACCCATGGAACCTGATGACCACGTCGGTAGACGAGG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GATCACCGCCAAGCACCCATGGAACCTGATGACGACCTCCGCCGACGAGG
gi 5101869 gb AJ242981.1	GATCACCGCCAAGCACCCATGGAACCTGATGACCACCTCCGCCGACGAGG
gi 21207748 gb AY104670.1	CGCCACCGCCACCCACCCATGGCGGGCATGGCTGCGTGC CGCGACGAGG
gi 226495420 ref NM_001159039.	CGTGACCGACAAGCACGAGTGGGGGTTTCATGCACTGCTGCGCCGACGAGG
gi 226501215 gb NM_001158979.1	GGTGACCGACAAGCACGAGTGGGGGTTTCATGCACTGCTGCGCCGACGAGG **** ** *** *** ** *****
<hr/>	
Seq. Consenso CCoAOMT Pan.	GCCAGTTCCCTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATG
gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA	GGCAGTTCCCTGAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATG
gi 5101869 gb AJ242981.1	GCCAGTTCCCTCAACATGCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATG

gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	TGCAGCTGCTGCAGCTCCTGATCGAGATTCTTGGCGCCAAGAACGCCATC CGCAGCTGCTGCGGATGCTCATCAAGCTCACC GGCGCGCGCCGACCCCTG CGTCGCTGCTGCGGATGCTGATCAAGCTGAGCGGCGCGCGCGGAGCGCTG * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GAGATCGGCGTCTACAC--GGATACTCCCTCCTCGCCACCGCACTCGCCCT GAGATCGGCGTCTACACCGGCTACTCCCTCCTCGCCACCGCGCTCGCCCT GAGATCGGCGTCTACACCGGCTACTCGCTCCTCGCCACCGCGCTCGCACT GAGGTGCGCTCTTACCGGCTACTCGCTGCTCGCCACCGCGCTCGCCCT GAGGTGGGCGTGTACACGGGCTACTCGCTGCTGGCCACCGCGCTGGCGCT GAGGTGGGCGTGTACCGGCTACTCGCTGCTGGCGACCGCGCTGGCGCT *** * ***** * *** ** ***** ** * * * * * * * * * *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	CCCCGAGGACGGCAGCATCTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACG CCCCGAGGACGGCAGCATCTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACG CCCCGAGGACGGCAGCATCTGGCCATGGACATCAACCGCGAGAACTACG CCCCGAGGACGGCAAGGTCATCGCCTTCGACGTGAACCGCGACTACTACG CCCCGAGGACGGCAAGGTCATCGCCTTCGACGTGAACCGCGACTACTACG GCCCCGCGAGGGCAAGGTCATCGCATTTCGACGTGAGCCGCGAGTACTACG * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	AGC---TGGGCTGCGCTGCATCGAGAAGGCCGCGCTCGCCCAACAAGATC AGC---TGGGCTGCGCTGCATCGAGAAGGCCGCGCTCGCCCAACAAGATC AGC---TAGGCCTTCCCTGCATCAACAAGGCCGCGCTGGGCCCAACAAGATC ACCAGATAGGGTCGCGGTCATCGAGAAGGCCGCGCTGGCGCACAAGATC ACA---TCGGCGCGCCCTTCATCGAGCGCGCGCGCTGGCGGGCAAGGTC ACA---TCGGCGCGCCCTTCATCGAGCGCGCGGGGTGGCGGGCAAGGTC *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACTTCCGCGAGGGCCCCGCTCTTCCCGTCTCGACGACCTCATCGCAGA GACTTCCGCGAGGGTCCCCGCTCCCCGTCTCGACGACCTCATCGCGGA GACTTCCGCGAGGGCCCCGCTCCCCGTCTCGACGACCTCATCGCGGA GACTTCCGCTCGGGCTCGCGCTGCGCGTGGACAGATGGTGGCCGA GACTTCCGCGAGGGCCCCGCTGGGCAACCTGGACGAGCTCTCGCCGA GACTTCCGCGAGGGCCCCGCTGGAGCAGCTGGACGAGCTCTCGCCGA ***** *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GGAGAAGAACCACGGCAGCTTCGACTTCGTCTTACGTTGACGCCGACAAG GGAGAAGAACCACGGGTCGTTTCGACTTCGTCTT--CGTGGACGCCGACAAG CAAGGAGCAGCAGGGTCGTTTCGACTTCGCCTT--CGTGGACGCCGACAAG GGAGGGGAACAAGGGCAAGTTCGACTTCGCGTT--CGTGGACGCCGACAAG CCCAACTACGTCACCTCGCGCCTTCGACTTCGCCTT--CGTGGACGCCGACAAG CCCCGCCAACCACGGCGCTTCGACTTCGCGTT--CGTGGACGCCGACAAG *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACAACTACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTCAAGCTACGTGAAGATAC GACAACTACCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTGAAGCTG--GTGAAGCTG-- GACAACTACCTCAACTACCACGAGCGGCTCCTGAAGCTG--GTGAGGCC-- GTGAAGTCTCTCAACTACCACGAGCGGCTGCTGCAGCTG--CTCAGGGTC-- CCCAACTACGTCACCTCAATACCACGAGCAGCTGCTCGCGCTG--GTGCGCGTC-- CCTAACTACGTCGGTACCACGAGCAGCTGCTCCGCTG--GTGCGCGTC-- ***** *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GGCGGCTCATCGGTTACGACAACACGCNGTGCCTAACGGCTCCGT---C GGCGGCTCATCGGTTACGACAACACGCTGTGG--AACGGCTCCGT---C GGCGGCTCATCGGTTACGACAACACGCTGTGG--AACGGCTCCGT---C GGGGGCTCATCGCTACGACAACACGCTGTGG--GGCGGCTCCGTGGCG GGCGGACCATCGTGTACGACAACACGCTGTGG--TGCGGGACCGT---G GGGGGTACCGTGTGTACGACAACACGCTGTGG--GCCGCTACTGT---G ** *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GTGCTCCCCGACTACGCCCCCATGCGCAAGTACATCCGCTTCTACCGCGA GTGCTCCCCGACGACGCGCCCATGCGCAAGTACATCCGCTTCTACCGCGA GTGCTCCCCGACGACGCGCCCATGCGCAAGTACATCCGCTTCTACCGCGA GCGTCCCCGACGAGCCGCTC--TCCGAGCGGGACCGCGCTCGCTGCGG GCCATGCGCGCCGAGACGCCCATGTCGACATCGACAGGAGTCTCTCGG GCGCTTCCCCCGACGCGCCGCTCAGCGACCTCGACCGAGGTTCTCCGC *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	CTTCGTGCTCGTCTCAACAAGGCGCTCGCAGCCGACGAGCGCTCGAGA CTTCGTGCTCGTCTCAACAAGGCGCTCGCGCGCGACGACCGCTCGAGA CTTCGTCTCGCCCTCAACAGCGCGCTCGCGCGCGACGACCGCTCGAGA CCACCAGGGAGT--TCAACGCGGCGGTGGCGCGGATCCCCGCGTTTCACG GCCATCAGGGACCTCAACGTTTCGCTCTCCGCGGACGAGCGGTTTCGAGG CGCCATCAGGGAACCAACGTCGGCTTTCTCAGGATCCCCGCGTCCGAGG *

Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	TCTGCCAGCTCCCCGTGCGCGACGGTGTACCCCTCTGCCGCCGCGTCAAG TCTGCCAGCTCCCCGTGCGCGACGGCGTACCCCTCTGCCGCCGCGTCAAG TCTGCCAGCTCCCCGTGCGCGACGGCGTACGCTCTGCCGCCGCGTCAAG TCTGCCAGGTGCGCCATCGCCGACGGGCTCAGCTGTGCCGCCGCGTCCG TCTGCCAGCTCGCCATCGCCGACGGCGTACCATCTGCCGCCGCGTCCGTC TCTGCCAGCTCGCCATCGCCGACGGCGTACCATCTGCCGCCGCGTCCGTC ***** ** ** * ** * ** * ** * ** *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	TGAGCA-----CGTGATC----- TGAAAA-----CATGGCCTGG----- TGAAAAAAGAAAGAAAAAACAACATACCCCTGCGTTCTCTGCTGCC TGATC-----CGTATCCGGT-----T TGATGGAGTCAGT-----GCGTGCCAGGG-----CAT TGATGTGATGATG-----ATCCGACGACCA-----AGA ***
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	-CCTG-----CAGCACCGACGGCGGC-GGCGGCGACCGCCAACC -CCTGGCCTGCCCCACCACCGCCACCGACGGC-GCCGCCGCGCGCATCCT CCCCGCTCCGTCTGCCCCCACCGCCACCGAC-GGCGGCGCGCGACCCCC ATCCGCCTCGAAATA-CAGCAGAGCTGTGGGCTGTGCTGACACTGCTGT GCATGCATGCTCGCGTGTGGATATT-CCGTC---GACCAGTTCTCCATC TCGTATATCATTGCTCGTCTGTCTGTCTATC---TTTCAACTGCCTGCC *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	GACACCAATCATA----GGCGACGCGCAGCATTAATTAA--TTATTTAC CATTCCAATCATAA--TAGACGACCGCAGCATTAATTA---TCCACCGG CGTTCCAATCATATCGTAGACGACGCGCAGCATTAATTA--TCAATCAC GAGCTCTGTGCTTGAATGGCCATGGTCTGTAATAACGAA--CTGGGCTT CGATCCGTTTGTGTG-TTGCATGATGC----TTTCAATAAAGATCTGTTTT CGCTGCCGTCGTCA-ACTAATAATGCATGGTCTGTGTTCTTTTTTTTT * * *
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	CGTCTTTTTTGGCTCTTTCTTGCCCTGTATTCT----- CTTTTTTTTTGGCTCTTTCTTGCCCTGTAAATCT----- CGGCTCT---GGCTCTTTCTTGCCCTGTACTGTACTACTATACTAATGT GAGCGAAATAAATCCACCAGCGCGCTAGCGTGT----- CCTTCCAAAAA----- TATTTCTTTTGTGCTTGCATTGTGTGTGTGAGTTGAACATCCCCCGCG
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	-T----- -TTCTCCTCCTCTTCTTCTTGGAATTGTGCGCCGCGTTTCGATACGTA CCCTCTTGTTTTTTTTTCTTGGAATTGTGCGCGTTTCAGTATACGTAA ---GTCAGCGATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ----- ATGTACTGCAACAACCTGGMATGCAATGCAACATCATGCGTACAAAAAAA
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	----- AATCACGAGATCGGTAATACAGTAATGCTCCTCAATTTTACAAAAAAA AATCTCGATGTCGATAATACAGTACTACTAC-CAATTTAACTAAAAAAA AA----- ----- AAAAAAA-----
Seq. Consenso CCoAOMT Pan. gi 21207484 gb AY104406.1 CCoA gi 5101869 gb AJ242981.1 gi 21207748 gb AY104670.1 gi 226495420 ref NM_001159039. gi 226501215 gb NM_001158979.1	----- AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA----- ----- ----- -----

Figura 31 - Comparação entre as regiões seqüenciadas do gene CCoAOMT em *P. maximum* com os genes da família CCoAOMT 1 (NM 001159039 Zea mays Caffeoyl CoA O-methyltransferase 1 961 bp), CCoAOMT 2 (AJ 242981 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase 2, 1167bp), CCoAOMT 3 (AY 104670 Zea mays PCO 117754 mRNA sequence, 976bp), CCoAOMT 4 (AY 104406 Zea mays PCO 108855 mRNA sequence, 1146bp) e CCoAOMT 5 (NM 001158979 Zea mays LOC 100286091 (PCO 131734) mRNA, 1075bp), respectivamente

Os fragmentos do gene CCoAOMT seqüenciados em *B. brizantha* e *P. maximum* foram comparados, também, com outras gramíneas intensamente estudadas, como o arroz, trigo, sorgo e aveia. O fragmento seqüenciado na espécie de *B. brizantha* foi 91,63% semelhante ao gene CCoAOMT no arroz (AY644636 *Oryza sativa* (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase), 79,6% semelhante ao trigo (AB158406 *Triticum aestivum* CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-

methyltransferase, partial CDs), 94,33% semelhante ao sorgo (XM2436505 Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA) e 87% semelhante à aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase). Foi possível obter uma árvore filogenética (Figura 32), comparando as espécies de *B. brizantha*, milho, arroz, trigo e aveia, realizada através do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Figura 32 - Árvore filogenética demonstrando a distância, em destaque, entre as espécies *Brachiaria brizantha*, milho (AJ242980 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), trigo (AB158406 Triticum aestivum CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase, partial CDs), aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), arroz (AY644636 Oryza sativa (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase) e sorgo (XM2436505 Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA)

A mesma comparação foi feita para a sequência consenso do gene CCoAOMT em *Panicum maximum*, e encontrou-se 91,14% de semelhança com o arroz (AY644636 Oryza sativa (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase), 82,6% semelhante ao trigo (AB158406 Triticum aestivum CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase, partial CDs), 94,2% semelhante ao sorgo (XM2436505 Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA) e 86% semelhante à aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase). Foi possível obter, também, uma árvore filogenética demonstrando a distância entre *Panicum maximum*, milho, arroz, trigo e aveia (Figura 33).

Figura 33 - Árvore filogenética demonstrando a distância, em destaque, entre as espécies *Panicum maximum*, milho (AJ242980 Zea mays mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase), trigo (AB158406 Triticum aevestium CCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase, partial CDs), aveia (AB076979 Avena sativa AsCCoAOMT mRNA Caffeoyl CoA O-methyltransferase) e arroz (AY644636 Oryza sativa (japônica cultivar group) Caffeoyl CoA O-methyltransferase).

5.4.3 Análise do sequenciamento do gene PAL em *B. brizantha* e *P. maximum*

Foram encontradas muitas dificuldades no sequenciamento do gene PAL, para ambas gramíneas. Uma delas foi à fragmentação do gene ligado ao vetor e no sequenciamento conseguiu-se, apenas, uma pequena parte do gene amplificado, 349 pb para *B. brizantha* (Quadro 6) e 580 pb em *P. maximum* (Quadro 7). Os fragmentos obtidos no sequenciamento apresentaram altíssima similaridade com o gene PAL no milho (NM_001153961 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA) depositado no GenBank, 94% com *B. brizantha* (Quadro 8) e 92,5% com *P. Maximum* (Quadro 9).

Quadro 6 – Sequência consenso do gene PAL em *B. brizantha*

```
>PAL_Consenso_Bb
AGGTCAACTCCGTGAACGACAACCCGGTCATCGACGTCCACACCGCGGCAAGGCGCTC
CACGGCGGCAACTTCCAGGGACACGCCCATCGGCGTCTCCATGGACAACGCCCGCCTC
GCCATCGCCAACATCGGCAAGCTCATGTTTCGCGCAGTTCTCCGAGCTGGTGAACGAGTT
CTACAACAACGGGCTCACCTCCAACCTGGCCGGCAGCCGGAACCCGAGCCTGGACTAC
GGGTTCAAGGGCACCGAGATCGCCATGGCGTCCTACTGCTCCGAGCTCCAGTACCTCG
GCAACCCGATCACCAACCACGTGCAGAGCGCGGAGCAGCACAACCAGGACGTGAACTC
```

Quadro 7 - Sequência consenso do gene PAL em *P. Maximum*

>Seq.Consenso PAL_Pan.

AGCACGAGGACACTGACCACCTGACCCACAAGCTAAAGCACCAACCCGGGCTCCATCGA
 GGCTGCCGCCATCATGGAGCACGTCCTTGAGGGCAGCGCCTTCATGAAGCACGCCAAG
 AAGGTGAACGAGCTTGACCCGCCTGCTGAAGGCCAAGCAGGACAGGTACGCGCTCCG
 CACCTCGGCGCGGAGTGGCTCCTCGGCCCCCAGATCGAGGTGCTCCGCGCCGCCACCC
 AAGTCCATCGAGCGTGAGGTCAACCTCGGTCAACGACAACCCGGTTCATCGACGTGCAC
 CGTGGAAGGCGCTCCACGGCGGGAACCTCCAGGGCACACCCATCGGTGTTTCCATGG
 ACAACGGCCCCGGGCTGGCCATCGCCAACATCGGCAAGCTCATGTTGCGCGAGTTCTCC
 GAGCTGGTGAACGAGTTCTACAACAACGGCCTCACCTCCAACCTTGCCGGCAGCCGTA
 ACCCCAGCCTCGACTACGGTTCAAGGGCACGGAGATCGCCATGGCCTCCTACTGCTCC
 GAGCTCCAGTACCTCGGCAACCCCATCACCAACCACGTGCAGAGCGCTGAGCAGCACA
 ACCA

Quadro 8 - Comparação do fragmento sequenciado em *P. maximum* com o gene PAL depositado no GeneBank NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA. Com 92,5% de similaridade

Score = 646 bits (716), Expect = 0.0				
Identities = 498/583 (85%), Gaps = 10/583 (2%)				
Strand=Plus/Plus				
Query	1038	AGCCCGAGTACACCGACCACCTGACCCACAAGCTGAAGCACCAACCCGGGCGAGATCGAGT	1097	
Sbjct	1	...A...G...T.....A.....CTCC.....G	60	
Query	1098	CTGCGGCCATCATGGAGCACATACTGGAGGGCAGCTCCTACATGGCGCTTGCCAAGAAGC	1157	
Sbjct	61	C.....G.C..T.....G...T...AA..AC.....G	120	
Query	1158	TGGGCGAGCTGGACCCG-CTGATGAAGCCGAAGCAGGACAGGTACGCGCTCCGCACGTC-	1215	
Sbjct	121	..AA.....T.....C..C.....G.C.....C..G	180	
Query	1216	GCCGCGAGTGG---CTGGGCCCCCAGATCGAGGTATCCGTGCCGCGA-CCAAGTCGATCG	1271	
Sbjct	181	G.....CTC..C.....GC.....C.....C.C.....C....	240	
Query	1272	AGCGCGAGATCAA-CTCCGTCAACGACAACCCGCTCATCGACGTGTCCCGTGGCAAGGCG	1330	
Sbjct	241	T...G...C...G.....G.....CA.....	300	
Query	1331	CTCCACGGCGGCAACTTCCAGGGCACGCCATCGGCGGTGTCCATGGACAAC--ACCAGGC	1388	
Sbjct	301	G.....A.....T..T.....GGC..G...	360	
Query	1389	TCGCCGTGCGGCGGATCGGCAAGCTCATGTTGCGCGAGTTCTCGGAGCTCGTGAACGACT	1448	
Sbjct	361	.G...A....CAAC.....C.....G.....G.	420	
Query	1449	TCTACAACAACGGCCTGCCGTCCAACCTGTCCGGAGGGCGCAACCCGAGCCTGGACTACG	1508	
Sbjct	421	CA.C.....TG....CA.C..T.....C.....C.....	480	
Query	1509	GCTTCAAGGGCGCCGAGATCGCCATGGCCTCCTACTGCTCCGAGCTCCAGTTCTGGCCA	1568	
Sbjct	481	.-.....A.G.....A...C.G..	539	
Query	1569	ACCCCGTGACCAACCACGTCCAGAGCGCGGAGCAGCACAACCA	1611	
Sbjct	540	A.C.....G.....T.....	582	
Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.65				
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)				
Strand=Plus/Plus				
Query	811	CTCCACGGCGG	821	
Sbjct	301		311	

Quadro 9 - Comparação do fragmento sequenciado em *B. brizantha* com o gene PAL depositado no GeneBank NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA. Com 92,5% de similaridade

Score = 439 bits (486), Expect = 4e-127			
Identities = 308/349 (88%), Gaps = 3/349 (1%)			
Strand=Plus/Plus			
226529220	1	AGGTCAACTCCGTGAACGACAACCCGGTCATCGACGTCCACACCGCGGCAAGGCGCTCCA	60
Pan.	1278	..A.....C.....C.....GTC.--..T.....	1335
226529220	61	CGGCGGCAACTTCCAGGGACACGCCCATCGGCGTCTCCATGGACAACGCCCGCTCGCCA	120
Pan.	1336	-.....G.....A..A.G.....G	1394
226529220	121	TCGCCAACATCGGCAAGCTCATGTTCGCGCAGTTCTCCGAGCTGGTGAACGAGTTCTACA	180
Pan.	1395	GGCG.....G.....C.....C.....	1454
226529220	181	ACAACGGGCTCACCTCCAACCTGGCCGGCAGCCGGAACCCGAGCTGGACTACGGGTTC	240
Pan.	1455	C..GC.G.....T...AG.G..C.....C....	1514
226529220	241	AGGGCACCGAGATCGCCATGGCGTCCTACTGCTCCGAGCTCCAGTACCTCGGCAACCCGA	300
Pan.	1515	G.....C.....T...G.C.....CG	1574
226529220	301	TCACCAACCACGTGCAGAGCGCGGAGCAGCACAACCAGGACGTGAACTC	349
Pan.	1575	.G.....C.....	1623
Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.38			
Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
226529220	56	CTCCACGGCGG	66
Pan.	811		821

Este estudo objetivava-se o sequenciamento completo do gene PAL em *B. brizantha* e *P. maximum*, no entanto, obteve-se uma pequena parte do gene como descrita acima (Figura 34 e 35, respectivamente).

Figura 34 - Fragmento sequenciado do gene PAL em *B. brizantha* e em destaque o que falta ser sequenciado do gene PAL (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), utilizado como referência

Figura 35 - Fragmento do gene PAL seqüenciado em *P. maximum* e em destaque as regiões do gene PAL (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), utilizado como referencia, que ainda faltam ser sequenciadas

O gene PAL é codificado por cinco genes no genoma do milho e podem ser divididos em três classes (GUILLAUMIE et al., 2007, Tabela 9). O fragmento do gene PAL seqüenciado em *B. brizantha* foi comparado com os cinco genes da família PAL no milho e obteve similaridade de 96,6% com PAL1, e um pequeno fragmento com 100% de similaridade entre PAL3 e PAL5 (Figura 36). No entanto, não houve similaridade entre a sequência consenso de *B. brizantha* com os genes PAL2 e PAL4. Foi feito um alinhamento múltiplo entre os genes PAL no milho com o fragmento seqüenciado do gene PAL em *B. brizantha* (Quadro 10), utilizando o software ClustalW2 (Alinhamento múltiplo de seqüências).

Tabela 9 – Genes da família PAL no milho, identificação dos contigs do MAIZEWALL e o número de identificação no GenBank

Classe	Gene	Contig.	Nº GeneBank
Classe I	PAL 1	2161072.2.1	AY103647
	PAL 2	2161072.2.3	BG319893
Classe II	PAL 3	3858636.2.1	CF631905
Classe III	PAL 4	3670912.2.1	BG320184
	PAL 5	8010462.2.1	BG319641

Figura 36 - Alinhamento da sequência consenso do gene PAL obtida em *B. brizantha* com os genes PAL1 (gi|187950257|gb|AY103647.2 Zea mays PCO142084 mRNA sequence), PAL3 (gi|37389371|gb|CF631905.1 zmrws48_0B10-014-f08.s3 zmrws48 Zea mays cDNA 3') e PAL5(gi|13149319|gb|BG319641.1 Zm03_07a11_AZm03_AAFC_ECORC_cold_stressed_maize_seedlings Zea mays cDNA clone Zm03_07a11.), respectivamente

Quadro 10 - Alinhamento múltiplo entre os genes PAL4, PAL5, PAL3, PAL *B. brizantha*, PAL1 e PAL2, respectivamente

BG320184	-----CTTAC	5
BG319641	-----A	1
CF631905	-----AG	2
PAL_Bb.	-----A	1
AY103647.2	GCAGTGGCTGGGCCCCAGATCGAGGTCATCCGCGCCGCCACCAAGTCCATCGAGCGCA	1200
BG319893	-----CAA	3
BG320184	TATTTATTACCATCATAAGTTTCATTTGCTGCTGCWKCCAAGACCATGCACTATCTGCAG	65
BG319641	TGTTAAAAACCATCAAAAGTTTCAGCAGCTGCGACAGC-AAGAACGCGCAC-GTC-GCAC	58
CF631905	TAGTAGTA--TATTTTAA-TTCCAAAACATATTGCAGATGAGAAAGC-CAAGAACAACA-	57
PAL_Bb.	GGT-CAACTCCGT--GAAC----GACAAC----CCGGTCATCGACGTCCAC-ACC-GC--	46
AY103647.2	GGT-CAACTCCGT--GAAC----GACAAC----CCGGTCATCGACGTCCAC---C-GC--	1243
BG319893	AATACAACAGTATA-GGATCTTAGACAACGCTACCTGCCAT-GGCATGCGC-ATC-GCAG	59
	* * *	
BG320184	GCCATKGCCTCGCAGCTGCGGGA--ACT--ACAACAACATT-CACATGAACTT----TAG	116
BG319641	GCCATGGCGTCGACGCTGCGGGA--AC---ACGACAACATT-CACATGAACTTACTTCAG	112
CF631905	GACAGAATA-CACGTTTACACGATCACT--GCTACAAGCTC-CAAACAAA-----AA	105
PAL_Bb.	-----GGCAAGGC-GCTCCACGGCGG-----CAACTTC---CAGGGAC-----	80
AY103647.2	-----GGCAAGGC-GCTGCACGGCGG-----CAACTTC---CAGGG-C-----	1276
BG319893	GCGGTGGCAAGGCAGCTACACAAAGAAGAAAGAACGCCACACACGCAC-----	110
	* * *	
BG320184	CTACTGGTA---CAGGGCAACGGTAAATATAGAGT---TCTCCTGCTAGTA--TGATCG	167
BG319641	CTACTAATAATACAAGGCGACGGTAGATATAGAGAGC-ATCTTCTGCTARTC--TGGTTG	169
CF631905	AGATGAGTA---CAGAGGAACAACA--TATAATGA---TCTTCAGATCGCAAACGAT-A	155
PAL_Bb.	ACGCCCAT-----CGGC-----GTCTCCATGGACAA--CGCCCG	112

AY103647.2	ACCCCAT-----CGGC-----GTGTCCATGGACAA--CGCCG	1308
BG319893	ACACATATG-----GMTCGACCAATAACAACAAAAGTCAACGACGAGAA--TGACGG	160
	* * * *	
BG320184	TAAAGCACTTCAC-AACG---ACCTTGAAACGCTCT---GTTTTGTGCTGCT-----	212
BG319641	TAAA-TA-----AACG---ATCTTRAAACGCT-----GTCTTGAGCCGCT-----	205
CF631905	TGAAGCC-TGCTT-GAGA--ATACCGAAATACTCC---CTTCTTTATTTCTTCCTCGCG	207
PAL_Bb.	CCTCGCCATC----GCCA---ACATCGGCAAGCTCA---TGTTTCGCGCAGTT-----	154
AY103647.2	CCTCGCCATC----GCCA---ACATCGGCAAGCTCA---TGTTTCGCGCAGTT-----	1350
BG319893	CGGCACAATCTGGAGACATACACGTGTACAAGTTTATTTTTCATGTATTTTCCTCCT-	219
	* * *	
BG320184	---ATACTTTTGTTCCT-CTG--TATACGTT--GTCTTCTCTGCTGGT--GC--A	259
BG319641	---ATACTTTTGTTCCTTCTT--TGTGCGGA---GCAGGTGCGTGCAGCTCAGCTGA	257
CF631905	CGCATACGGTGTCTCTCTCTC--T-TGCGGTCTTGATCTTGCCACCGGT-GGC-GT	262
PAL_Bb.	-----CTCCGAGCTGGTGAACGAG-TTCTACA---ACAACGG--GCTCA	192
AY103647.2	-----CTCCGAGCTCGTCAACGAG-TTCTACA---ACAACGG--GCTCA	1388
BG319893	---CCTCTTCTCTCTCCCGCC--ATGCGCGGG-CGGCACATGGATGGCGGC--GCC	271
	*** * ** * **	
BG320184	GC-----TCAGCAGA-----GCGGCAGGGGCTCGCGTTCCACTCCTTGAGGCAC	308
BG319641	GC-----TCAGCAGA-----GCGNCAGGGGCGCGCGTTCCACTCCTTGAGGCAC	306
CF631905	CC-----TCAGCAGA-----TGGGCAGGGGCTTGCCGTCCACTCCTTGAGGCAG	311
PAL_Bb.	CC-----TCCAACC-----TGCCGGGCAGCC-----GGAACCCGA	222
AY103647.2	CC-----TCCAACC-----TGCCGGGCAGCC-----GCAACCCCA	1418
BG319893	GCGTGTTTTAGTTGATGTTGATGGGCAGCGGCTTGCCGTCCACTCCTTGAGGCAC	331
	* * * * *	
BG320184	GCAGCGGGTCGATG-TGCTTGCGCTGGTTGATGG-CCACGAGCACCTTGTTAGCTCCT-	365
BG319641	CCAGCGGGTCGATGGTGTCTGCGCTGGTTGATGGGCCACGAGCACCTTGTTAGCTCCT-	365
CF631905	GCATGGGGTCGATG-AGCTTGCCCTCGCTGAGGG-CCAGGAACACCTTGTTGCACTCCT-	368
PAL_Bb.	GCCTGGACT--ACG-GGTTCA---AG--GGCAC-CGAG-ATCGCCATGGCGTCTCTACTG	271
AY103647.2	GCCTGGACT--ACG-GCTTCA---AG--GGCAC-CGAG-ATCGCCATGGCCTCTCTACTG	1467
BG319893	GCATGGGGTCGACG-AGCTTGCCCTGGCTGATGC-CGAGGAACACCTTGTTGCACTCCT-	388
	* * * * * * * * * *	
BG320184	CGCCGGGGCG-ACCTCGTCTTCTCGCCGGTCAGGTACTCGGTGCCGACCTCCTCGCGCACG	424
BG319641	CGCCGGGGGACCTGGTCTCTCGCCGGTCAGGTACTCGGTGCCGACCTCCTCGCGCACG	425
CF631905	CGCCGGGGG-ACTTGAGCTTCTCGCCGGTCAGGTACACGGCGCCGAGGTCTGGCGGATG	427
PAL_Bb.	CTCCGAG---CTCCAGTACCTCGGCAACCCG-ATCAC-CAACCACGTGCA--GAGCGCG	323
AY103647.2	GTCCGAG---CTCCAGTACCTGGGCAACCCG-ATCAC-CAACCACGTGCA--GAGCGCG	1519
BG319893	CGCCGGGGG-ACTTGAGCTTCTCGCCGGTGAGGAACACGCAGCCGAGCTCCTCGCGCACG	447
	* * * * * * * * *	
BG320184	AACCGGTACAGCGGGTAGGACCGGCACTCCTTGATCCTGTTGGGGACCAGAGGGTGCCG	484
BG319641	AACCGGTACAGCGGGTAGGACCGGCACTCCCTGATCCTGTTGGGGACCAGGGGGTGCCG	485
CF631905	AAGCGGTACAGCGGGTAGCAGCGGCTCTCCTTGATCCTGTTGGCGATCGGCGCGGCGCCG	487
PAL_Bb.	GAGCAGCACAACCAGGACGTG-AACT--C-----	349
AY103647.2	GAGCAGCACAACCAGGACGTG-AACT--CCCTGGGCCTCGTCTCGGCCAGGAAGACCGCC	1576
BG319893	AAGCGGTACAGCGGGAACGAGCGGCTGTCCGCGATCCGGTTGGCCACGGGGGCGGTGCC	507
	* * * * * * * *	
BG320184	TTCTCCACGGCCGCGCGCGGGCTTCCACCTCCTTGGGCAGCGCG-CGCGGACCTGCTGC	543
BG319641	CTCTCCACGGSCGRCGSGSG-CTCCACCTCCTTGGGCAKCGCG-CGCGGACCTGCTGC	543
CF631905	GTCTCGAAGGCCACGCGGGCGGCTCCATCTCCCTGGGCAGCGCTCGCGCAGCTCCTCC	547
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GAGGCGATCGACATCCTGAAGCTCATGTCTGCTCCACCTACATCGTGGCGCTGTGCCAGGCC	1636
BG319893	TCGGCGACGGCGACGCGGGCGGCTCCACCTCCTGGGGCAGCACC	567
BG320184	TCGAACTCGGCCACCTTGCGG---AAGATGGACGTGTCCACGTGCGCTCGGCGTCGCCG	600
BG319641	TCGAACTCGGCCACCTTGSG---A-----	565
CF631905	TCGAACTGTTGATCTTGAG---AACACGGACGCGCTGGCGTCTTCTCGGCCTCGCCG	604
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GTGGACCTGCGCCACCTCGAGGAGAACATCAAGGCGTCGGTGAAGAACACCGTGACCCAG	1696
BG319893	TCGAACTTGGTGATCCTGGAG-----AAGACGGAGGGCTCGCGCTCCGCSTCGCCG	618

BG320184	TTTGGCCAGCGCGTGCT-----CGACCAGCACCGCGCGGASTTTCTGCATCAGC	649
BG319641	-----	
CF631905	CT-GGCGAGGGCGTGCT-----CCACCAGCACGGCCCGGATCTTCTTCATCAGG	652
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GTGGCCAAGAAGGTGCTGACCATGAACCCCTCGGGCGAGCTCTCCAGCGCCCGCTTCAGC	1756
BG319893	CTGCTGRAGGGCGTGCT-----CCACCAGCACGGCGCGCASTTTCTGCATCAGC	667
BG320184	GCGTAGTTGGGGGCTGCACGGGTCGTCCGCGTACGSA-----	686
BG319641	-----	
CF631905	GGCGAGTTGGCG-CTGCAGG-----	671
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GAGAAGGAGCTGATCAGCGCCATCGACCGCGAGGCCGTGTTACGTACGCGGAGGACGCG	1816
BG319893	CGGCAGGCTGGCGCTGGCCGCGTCCTCCGCGTACGTG-----	704
BG320184	---AACACCGCCTCGCGGTCNGATCGCCGTCTGCAGGTCCTTCTCGCAGAAGCGCGCGTT	743
BG319641	-----	
CF631905	-----	
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GCCAGCGGCAGCCTGCCGC-TGATGCAGAAGCTGCGCGCCGTGCTGGTGGACCACGCCCT	1875
BG319893	---AACACGGCCTCGCGGT-CGATGGCGGAGATGAGCTCCTTCTCGCTGAAGCGCGCSCT	760
BG320184	GTGGAGCCG-----CCCCTGG	759
BG319641	-----	
CF631905	-----	
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	CAGCAGCGGCGACGCGGAGCGGGAGCCCTCCGTGTTCTCCAAGATCACCAGGTTTCGAGGA	1935
BG319893	GGAAAG-----GTCCCCGAG	775
BG320184	CGTTCAGGCTCAGGGACTTCTTGCCACCTGCGTCACSAAGTTCTTACCGCGGCCTTCAC	819
BG319641	-----	
CF631905	-----	
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	GGAGCTCCGCGCGGTGCTGCCCCAGGAGGTGGAGGCCCGCCGCGTGGCGGTCGCCGAGGG	1995
BG319893	GGGTTCATGGTCAGCACCTTCTTGCCACCTTGGTCACGTGTTCTTGACGAGGTCT-----	830
BG320184	GTTCTCTCGAAG-----	831
BG319641	-----	
CF631905	-----	
PAL_Bb.	-----	
AY103647.2	CACCGCCCCCGTGGCGAACCGGATCGCGGACAGCCGGTCGTTCCCGCTGTACCGCTTCGT	2055
BG319893	-----	

Também, foram comparadas as similaridades entre as sequências nucleotídicas do fragmento do gene PAL obtido em *P. maximum* com os genes da família PAL no milho. As similaridades foram de 95,5% de semelhança entre o PAL em *P. maximum* com o PAL1([gi|187950257|gb|AY103647.2|](#) Zea mays PCO142084 mRNA sequence) e 100% de similaridade com pequenos fragmentos dos genes PAL2([gi|13149571|gb|BG319893.1|](#) Zm03_07f12_AZm03_AAFC_ECORC_cold_stress sed_maize_seedlings Zea mays cDNA clone Zm03_07f12) e PAL3 ([gi|37389371|gb|CF631905.1|](#) zmrws48_0B10-014-f08.s3 zmrws48 Zea mays cDNA 3'), respectivamente, (Figura 37). Não houve similaridade com os genes PAL4 e

PAL5. Realizou-se o alinhamento múltiplo entre a sequência consenso do gene PAL em *P. maximum* com os genes da família PAL em milho depositados no GeneBank, utilizando o software ClustalW2 (Quadro 11).

Quadro 11 - Alinhamento múltiplo entre a sequência consenso do gene PAL em *P. maximum* e os genes da família PAL no milho PAL4, PAL5, PAL3, PAL2 e PAL1

BG320184	-----CTTACTATTTATTACCA	17
BG319641	-----ATGTTAAAAACCA	13
CF631905	-----AGTAGTAGTA--TA	12
BG319893	-----CAAAATACAA--CA	12
PAL_Pan.	-----A	1
AY103647.2	CGTCTTGGCCGTCTGTGCGAGGTCCTGTCCGCCGTCTTCTGCGAGGTCATGAACGGCAA	960
	*	
BG320184	TCATAAG-TTTCATTTGCTGCTGCKWCCAAGACCATGCACTATCTGCAGGCCATKGCCTC	76
BG319641	TCAAAAG-TTTCAGCAGCTGCGACAGC-AAGAACGCGCAC-GTC-GCAGGCCATGGCGTC	69
CF631905	TTTAA--TTCCAAAACATATTGAGATGAGAAAGC-CAAGAACAACA-GACAGAATA-C	67
BG319893	GTATAGGATCTTAGACAACGCTACCTGCCATGGCATGCGC-ATC-GCAGGCGGTGGCAAG	70
PAL_Pan.	GCACGAGGACACTGACCACCTGACCCACAAGCTAAAGCACCACC--CGGGCTC---CATC	56
AY103647.2	GCCCGAGTACACGGACCACCTGACCCACAAGCTGAAGCACCACC--CGGGGTC---CATC	1015
	* * * * *	
BG320184	GCAGCTGCGGGA-----ACTACAACA-ACATTCACATGAACTT---TAGCTACT	121
BG319641	GCAGCTGCGGGA-----AC-ACGACA-ACATTCACATGAACTTACTTCAGCTACT	117
CF631905	ACGTTTACACGATC-----ACTGCTACA-AGCTCCAAACAAA-----AAAGATG	110
BG319893	GCAGCTACACAAAGAAGAAAGAACACGCCACACACGCACACACATATGG---MTCGACC	127
PAL_Pan.	GAGGCTGC-----CGCCA-----TCATGGA-----GCA	79
AY103647.2	GAGGCCGC-----GGCCA-----TCATGGA-----GCA	1038
	* ** * *	
BG320184	GGTA---C---AGGGCAACGGTAAATATAGAGT---TCTCCTGCTAGTA--TGATCGTAA	170
BG319641	AATAATAC---AAGGCGACGGTAGATATAGAGAGCATCTTCTGCTARTC--TGTTGTAA	172
CF631905	AGTA---C---AGAGGAACAACA--TATAATGA---TCTTCAGATCGCAAACGAT-ATGA	158
BG319893	AATACAACCAAAAGTCAACGACG---AGAATGA-----CGGCGGCA--CAATCTGGA	174
PAL_Pan.	CGTC---CTTGAGGGCAGCGCCT---TCATGA-----AGCA--CGCCAAGAA	118
AY103647.2	CATC---CTGGATGGCAGCTCCT---TCATGA-----AGCA--GGCCAAGAA	1077
	* * * * *	
BG320184	AGCACTTCACA---ACGACCTTGAAACGCTC-TGTTTTGTGCTGCT-----ATA	215
BG319641	A-TA-----A---ACGATCTTAAACGCT---GTCTTGAGCCGCT-----ATA	208
CF631905	AGCC-TGCTTG---AGAATACCGAAATACTC-CCTTCTTTATTTCTCCTCGCGCGCATA	213
BG319893	GACA-TACACGTGTACAAGTTTTATTTTTTCATGTATTTTCCTCCTC-----CT	222
PAL_Pan.	GGTG-----A---ACGAGCTTGACCCGCC---TGCTGAAGGCCAA-----GCA	155
AY103647.2	GTTG-----A---ACGAGCTTGACCCGCC---TGCTGAAGGCCAA-----GCA	1113
	* * * * *	
BG320184	CTTTTGTTTTTCCT-CTGTATACGTT--GTCTTCTCTGCTGGT----GC--AGCTCA	264
BG319641	CTTTTGTTTTTCCTTCTTTGTGCGGA---GCAGGTGCGTGCAGCTC---AGCTGAGCTCA	262
CF631905	CGGTGTCATCTCCTCCTCT-TGCGGTCTTGATCTTGGCACCAGGT----GGC-GTCCTCA	267
BG319893	CTTCTCCTCCTCCGGCCATGCGCGGGCG-GCACATGGATGGCGGCGCCTGGCGTGTTTA	281
PAL_Pan.	GGACAG-----GTACGCGCTCC-GCACCTCGGCGGAGT---GGC--TCCTCG	197
AY103647.2	GGACAG-----GTACGCGCTCC-GCACCTCG-CCGCAGT---GGC-----TGG	1151
	* ** * *	
BG320184	GCAGAGC-----GGCAGGGGCTCGCCGTTCCACTCCTTGAGGCACTCGAGCAGCGGGTC	318
BG319641	GCAGAGC-----GNCAGGGGCGCGCCGTTCCACTCCTTGAGGCACTCGACCAGCGGGTC	316
CF631905	GCAGATG-----GGCAGGGGCTTGCCGTCCCACTCCTTGAGGCAGTCGAGCATGGGGTC	321
BG319893	GTGATGTTGATGGGCAGCGGCTTGCCGTCCCACTCCTTGAGGCACTCGAGCATGGGGTC	341
PAL_Pan.	GCCCCA-----GATCGAGGTGCTCCGCGCCGCCACCAAGTCCATCGAGCGTGAGGTC	251
AY103647.2	GCCCCA-----GATCGAGGTGCTCCGCGCCGCCACC-AAGTCCATCGAGCGTGAGGTC	1204
	* * * * *	

BG320184	GATG-TGCTTGCG--CTGGTTGATGG-CCACGAGCACCTTGTT---CAGCTCCTCGCCGG	371
BG319641	GATGGTGCTTGCG--CTGGTTGATGGGCCACGAGCACCTTGTT---GAGCTCCTCGCCGG	371
CF631905	GATG-AGCTTGCC--CTCGCTGAGGG-CCAGGAACACCTTGTT---GCACTCCTCGCCGG	374
BG319893	GACG-AGCTTGCC--CTGGCTGATGC-CGAGGAACACCTTGTT---GCACTCCTCGCCGG	394
PAL_Pan.	AACCTCGGTCAACGACAACCCGGTCATCGACGTGCACCGTGGCAAGGCGCTCCACGGCGG	311
AY103647.2	AACTCCG-TGAACGACAACCCGGTCATCGACGTCCACCGCGGCAAGGCGCTGCACGGCGG	1263
	* * * * *	
BG320184	GCG-ACCT---CGTC-TTCTCGCCGGT-----CAGGTACT-CGGTGCCGACCT---CCTC	417
BG319641	GGGGACCT---GGTC-CTCTCGCCGGT-----CAGGTACT-CGGTGCCGACCT---CCTC	418
CF631905	GGG-ACTT---GAGC-TTCTCGCCGGT-----CAGGTACA-CGGCGCCGAGGT---CCTG	420
BG319893	GGG-ACTT---GAGC-TTCTCGCCGGT-----GAGGAACA-CGCAGCCGAGCT---CCTC	440
PAL_Pan.	GA--ACTTCCAGGGCACACCCATCGGTGTTTCCATGGACAACGGC-CCGGGCTGGCCATC	368
AY103647.2	CA--ACTTCCAGGGCACCCCATCGGCGTGTCCATGGACAACG---CCCGCCTCGCCATC	1318
	** * * * *	
BG320184	GCGCACGAACCGGTACAGC--GGGTAGGACCGGCACTCCTTGATCCTGTTGGGGACCAGA	475
BG319641	GCGCACGAACCGGTACAGC--GGGTAGGACCGGCACTCCTTGATCCTGTTGGGGACCAGG	476
CF631905	GCGGATGAAGCGGTACAGC--GGGTACGACCGGCTCTCCTTGATCCTGTTGGCGATCGGC	478
BG319893	GCGCACGAAGCGGTACAGC--GGGAACGACGGCTGTCCGCGATCCGGTTGGCCACGGGG	498
PAL_Pan.	GCCAAC--ATCGGCA-AGCTCATGTTGCGCAGTTCTCC--GA----GCTGGTGAAC-GA	418
AY103647.2	GCCAAC--ATCGGCA-AGCTCATGTTGCGCAGTTCTCC--GA----GCTCGTCAAC-GA	1368
	** * * * *	
BG320184	GGGCTGCCGTTCTCCACGGCCGCGCGCGGGCTTCCACCTCCTTGGGCAGCGCG-CGCGG	534
BG319641	GGGSTGCCGCTCTCCACGGSCGRCRGS GS-CCTCCACCTCCTTGGGCAKCGCG-CGCGG	534
CF631905	GCGGCGCCGCTCTCGAAGGCCACGCGGGCGGCCTCCATCTCCCTGGGCAGCGCCTCGCG	538
BG319893	GCGGTGCCCTCGGCGACGGCGACGCGGGCGGCCTCCACCTCCTGGGCAGCACCGCGCGG	558
PAL_Pan.	GTTCTACAA----CAACGGCCTCAC-----CTCCAACCTTGCCGGCAGC-----CGT	461
AY103647.2	GTTCTACAA----CAACGGGCTCAC-----CTCCAACCTTGCCGGCAGC-----CGC	1411
	* * * * *	
BG320184	ACCTGCT-GCTCGAACTCGGCCACCTTGGCGAAGATGGACGTGTCCACGTGCGCTCGGC	593
BG319641	ACCTGCT-GCTCGAACTCGGCCACCTTGGGSA-----	565
CF631905	AGCTCCT-CCTCGAACCTGTTGATCTTGGAGAACACGGACGCGTGGCGTCTTCTCGGC	597
BG319893	CACTCCT-CCTCGAACTTGGTGATCCTGGAGAAGACGGA-GGGCTCGCG-----CTCCGC	611
PAL_Pan.	AACCCAGCCTCGACTACGG-----TTCAAGGGCACGGA--GATCGC-----CATGGC	507
AY103647.2	AACCCAGCCTGGACTACGG-----TTCAAGGGCACGGA--GATCGC-----CATGGC	1458
	* * * * *	
BG320184	GTCGCCGTTTGGCCAGCGCGTGCTCGACCAGCACCGCGCGGASTTTCTGCATCAGC-GCG	652
BG319641	-----	
CF631905	CTCGCCGCT-GGCGAGGGCGTGGTCCACCAGCACGGCCCGGATCTTCTTCATCAGG-GGC	655
BG319893	STCGCCGCTGTGRAGGGCGTGGTCCACCAGCACGGCGCGCASTTTCTGCATCAGCCGGC	671
PAL_Pan.	CTC-CTACTGCTC-----CGAGCTCCAGTACCTCGGC---AACCCCATCACCACACAG	557
AY103647.2	CTC-CTACTGCTC-----CGAGCTCCAGTACCTGGGC---AACCCCATCACCACACAG	1508
BG320184	TAGTTGGGGGCTGCACGGGTCGTCCGCGTACGSAAACACCGCCTCGCGGTGNGATCGCCG	712
BG319641	-----	
CF631905	GAGTTGGCG-CTGCAGG-----	671
BG319893	AGGCTGGCG-CTGGCCGCGTCTCCGCGTACGTGAACACGGCCTCGCGGTGCG-ATGGCGG	729
PAL_Pan.	TGCAGAGCG-CTGAGCAGCACAAACA-----	582
AY103647.2	TGCAGAGCG-CGGAGCAGCACAAACAGGACGTGAACCTCCCTGGGCCTCGTCTCGGCCAGG	1567
BG320184	TCTGCAGGTCCTTCTCGCAGAAGCGCGCGTGTGTGGAGCCGCCCTGGCGTTCAGGCTCAG	772
BG319641	-----	
CF631905	-----	
BG319893	AGATGAGCTCCTTCTCGCTGAAGCGCGCSCTGGAAAGGTCCCCGAGGGGTTTCATGGTCAG	789
PAL_Pan.	-----	
AY103647.2	AAGACCGCCGAGGCGATCGACATCCTGAAGCTCATGTGCTCCACCTACATCGTGGCGCTG	1627
BG320184	GGACTTCTTGGCCACCTGCGTCACSAGTTCTTACC CGGCCTTCACGTTCTCTCGAAG-	831
BG319641	-----	
CF631905	-----	
BG319893	CACCTTCTTGGC-ACCTTGGTCACGTGTTCTTGACGAGGTCT-----	830

PAL_Pan. AY103647.2	TGCCAGGCCGTGGACCTGCGCCACCTCGAGGAGAACATCAAGGCGTCGGTGAAGAACACC 1687
------------------------	---

Figura 37 - Comparação entre o fragmento do gene PAL em *P. maximum* com os genes PAL1([gi187950257/gb|AY103647.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi187950257/gb|AY103647.2) Zea mays PCO142084 mRNA sequence), PAL2 ([gi13149571/gb|BG319893.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi13149571/gb|BG319893.1) Zm03_07f12_AZm03_AAFC_ECORC_cold_stressed_maze_seedling Zea mays cDNA clone Zm03_07f12) e PAL3 ([gi37389371/gb|CF631905.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi37389371/gb|CF631905.1) zmrws48_0B10-014-f08.s3 zmrws48 Zea mays cDNA 3'), respectivamente.

A enzima PAL cataliza a primeira reação na via dos fenilpropanóides, portanto, se destaca por ser extensamente estudada em diversas espécies, inclusive no gênero das gramíneas. O fragmento sequenciado do gene PAL em *B. brizantha* foi comparado com o gene PAL em outras seis gramíneas, arroz, trigo, aveia, sorgo, cana-de-açúcar e cevada, que se encontram depositadas no GenBank, e apresentaram uma alta similaridade entre as sequências nucleotídicas. O fragmento do gene PAL sequenciado em *B. brizantha* apresentou 90% de similaridade com o arroz ([gi29367608/gb|AY224546.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi29367608/gb|AY224546.1) Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), 82% com o trigo ([gi1483609/emb|X99705.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi1483609/emb|X99705.1) T.aestivum PAL gene), 92% com a aveia ([gi260600463/gb|GQ373155.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi260600463/gb|GQ373155.1) Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene,

complete cds), 94,33% com o sorgo ([gi298103857|dbj|AB565487.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi298103857|dbj|AB565487.1) Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), 97% com a cana-de-açúcar ([gi121615559|gb|EF189195.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi121615559|gb|EF189195.1) Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e 90% de similaridade com a cevada ([gi2052093|emb|Z49147.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi2052093|emb|Z49147.1) H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp) (Figura 38). Foi possível desenhar uma árvore filogenética comparando o fragmento sequenciado do gene PAL em *B. brizantha* com as demais gramíneas, citadas anteriormente, que são amplamente estudadas (Figura 39).

Figura 38 - Representação do fragmento seqüenciado do gene PAL em *B. brizantha*, comparado com o gene PAL depositado no GeneBank para as gramíneas, arroz ([gi|29367608|gb|AY224546.1](#)) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo ([gi|1483609|emb|X99705.1](#)) *T.aestivum* PAL gene), aveia ([gi|260600463|gb|GQ373155.1](#)) *Avena sativa* phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo ([gi|298103857|dbj|AB565487.1](#)) *Sorghum bicolor* PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar ([gi|121615559|gb|EF189195.1](#)) *Saccharum officinarum* phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e cevada ([gi|2052093|emb|Z49147.1](#)) *H.vulgare* partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp), respectivamente

Figura 39 – Árvore filogenética destacando a distância entre *B. brizantha* e as gramíneas depositadas no GenBank, arroz ([gi|29367608|gb|AY224546.1](#)) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo ([gi|1483609|emb|X99705.1](#)) *T.aestivum* PAL gene), aveia ([gi|260600463|gb|GQ373155.1](#)) *Avena sativa* phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo ([gi|298103857|dbj|AB565487.1](#)) *Sorghum bicolor* PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar ([gi|121615559|gb|EF189195.1](#)) *Saccharum officinarum* phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), milho (NM_001153961.1 GI 226529220 *Zea mays* Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), e cevada ([gi|2052093|emb|Z49147.1](#)) *H.vulgare* partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp)

As mesmas comparações foram feitas com o fragmento do gene PAL obtido em *P. maximum* e obteve-se 94,25% de similaridade com o arroz ([gi|29367608|gb|AY224546.1](#)) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), 93,33% com o trigo ([gi|1483609|emb|X99705.1](#)) *T.aestivum* PAL gene), 89,5% com a aveia

([gi|260600463|gb|GQ373155.1](#) Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete cds), 95% com o sorgo ([gi|298103857|dbj|AB565487.1](#) Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), 91% com a cana-de-açúcar ([gi|121615559|gb|EF189195.1](#) Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e 93,33% de similaridade com a cevada ([gi|2052093|emb|Z49147.1](#) H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp) (Figura 40). Foi possível desenhar uma árvore filogenética comparando o fragmento sequenciado do gene PAL em *P. maximum* com as demais gramíneas, citadas anteriormente, que são amplamente estudadas (Figura 41).

Figura 40 - Representação do fragmento do gene PAL seqüenciado em *P. maximum* comparado com o gene PAL depositado no GeneBank nas gramíneas, arroz ([gi|29367608|gb|AY224546.1](#) Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo ([gi|1483609|emb|X99705.1](#) T.aestivum PAL gene), aveia ([gi|260600463|gb|GQ373155.1](#) Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo ([gi|298103857|dbj|AB565487.1](#) Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar ([gi|121615559|gb|EF189195.1](#) Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds) e cevada ([gi|2052093|emb|Z49147.1](#) H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp), respectivamente

Figura 41 - Árvore filogenética destacando as distâncias entre o fragmento seqüenciado em *P. maximum* e as demais gramíneas depositadas no GenBank, arroz ([gi|29367608|gb|AY224546.1](#) Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 24080 phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), trigo ([gi|1483609|emb|X99705.1](#) T.aestivum PAL gene), aveia ([gi|260600463|gb|GQ373155.1](#) Avena sativa phenylalanine ammonia-lyase gene, complete CDs), sorgo ([gi|298103857|dbj|AB565487.1](#) Sorghum bicolor PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds), cana-de-açúcar ([gi|121615559|gb|EF189195.1](#) Saccharum officinarum phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds), milho (NM_001153961.1 GI 226529220 Zea mays Phenylalanine ammonia-lyase (LOC 100281042), mRNA), e cevada ([gi|2052093|emb|Z49147.1](#) H.vulgare partial PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, 1777 bp)

5.4.4 Análise do sequenciamento do gene C4H em *B. brizantha* e *P. maximum*

Assim como ocorreu com o gene PAL descrito acima, no sequenciamento do

gene C4H em *B. brizantha* e *P. maximum* foram encontrados diversos problemas, e um deles foi quanto à fragmentação do gene ligado ao vetor e no sequenciamento foi sequenciado apenas um pequeno fragmento do gene em estudo, e sequenciado grande parte do vetor p-GEM. Em *B. brizantha* foi possível sequenciar apenas 230 pares de base (Quadro 12), e em *P. maximum* o caso foi pior, onde foram sequenciados apenas 20 pb do gene C4H.

Quadro 12 - Fragmento do gene C4H sequenciado em *B. brizantha*.

```
> C4H_Bb._Consenso
TCGCAGAGCTTCGAGTACAACCTACGGCGACTTCATCCCCGTCCTCCGCCCCTTCCTCC
GCGGCTACCTCAACCGATGCCACGACCTCAAGACCCGCCGCATGAAGGTCTTCGAGGA
CAACTTCGTCCAGGAGCGCAAGAAGGTGATGGCCAGACTGGCGAGATCCGGTGCGC
CATGGACCACATCCTCGAGGCCGAGAGGAAGGGCGAGATCAACCACGACAACGTCCT
```

O fragmento seqüenciado do gene C4H em *B. brizantha* foi comparada com o gene C4H no milho ([ref|NM_001155686.1|](#) Zea mays trans-cinnamate 4-monooxygenase (LOC100282780), mRNA) e encontrou-se 97% de similaridade entre as seqüências nucleotídicas, podendo ser considerada uma altíssima similaridade (Quadro 13), porém ainda falta sequenciar grande parte do gene C4H em *B. brizantha* (Figura 42).

Quadro 13 - Comparação entre as seqüências nucleotídicas do fragmento seqüenciado em *B. brizantha* e o gene C4H em milho

```
>ref|NM\_001155686.1| Zea mays trans-cinnamate 4-monooxygenase (LOC100282780), mRNA
gb|EU962294.1| Zea mays clone 241576 trans-cinnamate 4-monooxygenase mRNA,
complete cds Length=1739
GENE ID: 100282780 LOC100282780 | trans-cinnamate 4-monooxygenase [Zea mays]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 379 bits (420), Expect = 2e-109
Identities = 222/230 (97%), Gaps = 0/230 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCGCAGAGCTTCGAGTACAACCTACGGCGACTTCATCCCCGTCCTCCGCCCCTTCCTCCGC 60
Sbjct 711 .....G..... 770

Query 61 GGCTACCTCAACCGATGCCACGACCTCAAGACCCGCCGCATGAAGGTCTTCGAGGACAAC 120
Sbjct 771 .....C.....G.....T..... 830

Query 121 TTCGTCCAGGAGCGCAAGAAGGTGATGGCCAGACTGGCGAGATCCGGTGCGCCATGGAC 180
Sbjct 831 .....A.....T.....T.....T..... 890

Query 181 CACATCCTCGAGGCCGAGAGGAAGGGCGAGATCAACCACGACAACGTCCT 230
Sbjct 891 ..... 940
```

Figura 42 - Regiões que ainda faltam ser seqüenciadas em *B. brizantha* tomando como referência o gene C4H no milho ([ref|NM_001155686.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001155686.1) Zea mays trans-cinnamate 4-monooxygenase (LOC100282780), mRNA).

A enzima C4H é a segunda na via dos fenilpropanóides e cataliza a reação de hidroxilação do ácido cinâmico em ácido p-coumárico. Assim como a maioria das enzimas da via de síntese da lignina, a C4H é codificada por uma pequena família multigênica, e no milho são relatados até o momento dois genes, C4H 1 e C4H 2 (Tabela 9).

Tabela 10 - Genes da família C4H em milho, contigs depositados no MaizeWall e identificação no GenBank.

Gene	Contig.	Nº GeneBank
C4H 1	2521589.2.1	AY104175
C4H 2	-	DV174235

Ao comparar o fragmento do gene C4H em *B. brizantha*, obtido através do seqüenciamento, com os dois membros da família C4H no milho, obteve-se 97% de semelhança com C4H1 (Quadro 14), no entanto, não houve semelhança entre o fragmento seqüenciado de C4H com o gene C4H2 ([gi|76935211|gb|DV174235.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|76935211|gb|DV174235.1|) ZM_BFb0177L18.r ZM_BFb Zea mays cDNA 5'), portanto comparou-se o fragmento do gene C4H obtido em *B. brizantha* com o gene C4H1 em milho ([gi|21207253|gb|AY104175.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|21207253|gb|AY104175.1|) Zea mays PCO098406 mRNA sequence), quanto a

localização do fragmento dentro do gene depositado no GenBank (Figura 43). No entanto, foram alinhadas as sequências dos dois genes da família C4H com o fragmento do gene obtido em *B. brizantha* (Quadro 15).

Quadro 14 - Comparação entre as sequencia nucleotídicas entre o fragmento seqüenciado do gene C4H em *B. brizantha* com o gene C4H1 em milho (gi|21207253|gb|AY104175.1| Zea mays PCO098406 mRNA sequence) depositado no GenBank

Score = 284 bits (314), Expect = 7e-81					
Identities = 166/172 (97%), Gaps = 0/172 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
C4H_Bb.	770	GCGGCTACCTCAACCGCTGCCACGACCTCAAGACGCGCCGCATGAAGGTCTTCGAGGACA	829		
C4H1_ZM	1	A.....C.....	60		
C4H_Bb.	830	ACTTCGTACAGGAGCGCAAGAAGGTGATGGCTCAGACTGGTGAGATCCGGTGCGCCATGG	889		
C4H1_ZM	61	C.....C.....C.....	120		
C4H_Bb.	890	ATCACATCCTCGAGGCCGAGAGGAAGGGCGAGATCAACCACGACAACGTCCT	941		
C4H1_ZM	121	.C.....	172

Figura 43 - Fragmento do gene C4H seqüenciado em *B. brizantha* comparado ao gene C4H 1 (gi|21207253|gb|AY104175.1| Zea mays PCO098406 mRNA sequence) depositado no GeneBank

Quadro 15 - Alinhamento entre as sequências C4H em *Brachiaria brizantha* e C4H1 (gi|21207253|gb|AY104175.1| Zea mays PCO098406 mRNA sequence) e C4H2 (gi|76935211|gb|DV174235.1| ZM_BFb0177L18.r ZM_BFb Zea mays cDNA 5') no milho

C4H_Bb.	-----	
AY104175.1	CGGTGTACGGCGACCACTGGCGCAAGATGCGGCGCATCATGACCGTCCCCTTCTTCACCA	480
DV174235.1	-----GAACCGCCGCCACGCCACAC	20
C4H_Bb.	-----	
AY104175.1	ACAAGGTGGTGGCCAGAACCGCGCCGGTGGGAGGAGGAGGCCGGGCTGGTGGTGGAG	540
DV174235.1	AAAAAGCAGTGACTCAG-----	37
C4H_Bb.	-----	
AY104175.1	GACGTGAGGAAGGACCCCGAGGCCGCGCGCGCGCGTCTGCTCCGCCCGCCCTCCAG	600
DV174235.1	----TGAGAAAGGACAGCAAGCCCTCC-----CTCCATCTCCGCCCC--	75
C4H_Bb.	-----	
AY104175.1	CTGATGATGTACAACGACATGTTCCGCATCATGTTTCGACCGCGCTTCGACAGCGACGAC	660
DV174235.1	-----GTCGCCATGGTCTTCTTCTCGTGGAGAAGCTCTGGTTCGGC-----	117

C4H_Bb.	-----TCGCAGAGC	9
AY104175.1	GACCCGCTGTTCAACAAGCTCAAGGCGCTCAACGCGGAGCGCAGCCGCTGTCGCAGAGC	720
DV174235.1	-----CTCTTGCGCTCCGTCATGGTCGCCATCGCGGTGTCCAAGATC	159
	*** ** *	
C4H_Bb.	TTCGAGTACAA-CTACGGCGACTTCAT--CCCCGTCTC-CGCCC--CTTCC-----	55
AY104175.1	TTCGAGTACAA-CTACGGCGACTTCAT--CCCCGTGCTC-CGCCC--CTTCC-----	766
DV174235.1	CGTGGCCGCAAGCTCCGCTGCCTCCCGCCCCGTCCCCGTGCCGTCTTCGGGAACTGG	219
	* *** * * * * * * * * * * * * * * *	
C4H_Bb.	-----TCCGCGGCTACCTCAACCGATGCCACGACCTCAAGACCCGCCG-CATGAAGGT	107
AY104175.1	-----TCCGCGGCTACCTCAACCGCTGCCACGACCTCAAGACCGCCG-CATGAAGGT	818
DV174235.1	CTGCAGGTCGGCGACGACCTCAACC---ACCGCAACCTC--GCCGCGCTGTCCCGCAAGT	274
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
C4H_Bb.	CTTCGAGGACAACCTTCGTCC-----AGGAGCGCAAGAAGGTGATGGCCAG--ACT	156
AY104175.1	CTTCGAGGACAACCTTCGTAC-----AGGAGCGCAAGAAGGTGATGGCTCAG--ACT	867
DV174235.1	--TCGGCGACGTCTTCTCCTCCGCATGGGGCAGCGCAACCTGGTGGTGGTCTCGTCGCC	332
	*** * * * * * * * * * * * * * * * *	
C4H_Bb.	GGCGAGATCCGGTGCGCCATGGACCACATCCTCGAGGCCGAGAGGAAGGGCGAGATCAAC	216
AY104175.1	GGTGAGATCCGGTGCGCCATGGATCACATCCTCGAGGCCGAGAGGAAGGGCGAGATCAAC	927
DV174235.1	GCCG---CTGGCGCGGAGGTGCTGCACACGCAGGGC-GTGGAGTTCGGCTCCCGCACC	387
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
C4H_Bb.	CACGACAACGTCCT-----	230
AY104175.1	CACGACAACGTCCTCTACATCGTCGAGAACATCAACGTCGCAGCGATCGAGACGACGCTG	987
DV174235.1	CGCAACGTGGTCTTCGACATCTTCACGGA-----	416
	* * * * * * *	
C4H_Bb.	-----	
AY104175.1	TGGTCGATCGAGTGGGGCATCGCCGAGCTGGTGAACCACCCGGCCATCCAGCACAAGCTC	1047
DV174235.1	-----AAAGGGGCAGGACATGGTGTTCACCGTGTC-----	447

O fragmento obtido do gene C4H em *B. brizantha* foi comparado com o gene C4H em outras gramíneas extensamente estudadas, como o arroz, o sorgo, o trigo e a cevada. As semelhanças nucleotídicas foram de 76% com o arroz ([gi|32982611|dbj|AK072588.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|32982611|dbj|AK072588.1) Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023132G16, full insert sequence), 94% com o sorgo (sorgo ([gi|14192802|gb|AY034143.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|14192802|gb|AY034143.1) Sorghum bicolor cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA, complete CDs), 89% com o trigo ([gi|10442760|gb|AF123608.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|10442760|gb|AF123608.1)AF123608 Triticum aestivum clone CYP73-TA cytochrome P450 mRNA, complete CDs) e 87% com a cevada ([gi|12030324|emb|AL504109.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|12030324|emb|AL504109.1) AL504109 Hordeum vulgare Barke roots Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HW04D19 5' (Figura 44). Foi possível desenhar Na uma árvore filogenética destacando a distância entre *B. brizantha*, milho, arroz, sorgo, trigo e cevada (Figura 45).

Figura 44 - Comparação do fragmento de C4H seqüenciado em *B. brizantha*, sorgo (gi|14192802|gb|AY034143.1 Sorghum bicolor cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA, complete CDs), arroz (gi|32982611|dbj|AK072588.1 Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023132G16, full insert sequence), trigo (gi|10442760|gb|AF123608.1|AF123608 Triticum aestivum clone CYP73-TA cytochrome P450 mRNA, complete CDs) e a cevada (gi|12030324|emb|AL504109.1 AL504109 Hordeum vulgare Barke roots Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HW04D19 5'), respectivamente

Figura 45 - Árvore filogenética destacando as distâncias entre *B. brizantha*, sorgo (gi|14192802|gb|AY034143.1 Sorghum bicolor cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA, complete CDs), arroz (gi|32982611|dbj|AK072588.1 Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023132G16, full insert sequence), trigo (gi|10442760|gb|AF123608.1|AF123608 Triticum aestivum clone CYP73-TA cytochrome P450 mRNA, complete CDs), milho (gi|21207253|gb|AY104175.1 Zea mays PCO098406 mRNA sequence) depositado no GenBank e a cevada (gi|12030324|emb|AL504109.1 AL504109 Hordeum vulgare Barke roots Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HW04D19 5')

6 DISCUSSÃO

6.1 GENE CCoAOMT EM *BRACHIARIA BRIZANTHA* E *PANICUM MAXIMUM*

A atividade do gene CCoAOMT foi identificada pela primeira vez em culturas de células de salsa e cenoura, desempenhando papel de defesa (Kühnl et al., 1989; Pakusch et al., 1989). Na década de noventa, a expressão do gene CCoAOMT foi associada com a lignificação em *Zinnia elegans* (YE et al., 1994), desempenhando grande papel de mediador nas reações de metilação na via de síntese dos monolignóis (Ye, 1997). Diversos estudos demonstraram que muitas enzimas envolvidas na via de biosíntese da lignina, com exceção de C3H e COMT, são codificadas por famílias multigênicas (ANDERSEN et al., 2008), portanto, o gene CCoAOMT faz parte de uma pequena família multigênica, onde o número de genes é variável em cada espécie. No genoma do milho são relatados 5 genes CCoAOMT (BARRIÈRE et al., 2009), enquanto no arroz foram identificados 3 genes (ZHAO et al., 2004), em plantas de tabaco os genes são classificados por classes onde pode-se encontrar de 6 à 8 genes (MARTZ et al., 1998).

Os cinco genes CCoAOMT presentes no genoma do milho foram comparadas com os fragmentos do gene CCoAOMT sequenciado em *B. brizanta* e *P. maximum* e obteve-se similaridade de 89,6% e 86% com CCoAOMT1 (NM001159039), 87% e 82 % com CCoAOMT2 (AJ242981), 88,6% e 88,3% com CCoAOMT3 (AY104670), 88% com CCoAOMT4 (AY104406) para ambas gramíneas, 70% e 84,5% com CCoAOMT5 (NM001158979), respectivamente .

Segundo Guillaumie et al (2008), na planta de milho, os cinco genes da família CCoAOMT possuem padrão de expressão completamente diferentes entre si, pois, os genes CCoAOMT 5 e CCoAOMT 3 tiveram maior expressão nos internódios mais altos e basais, respectivamente, enquanto o gene CCoAOMT 2 foi o segundo mais expresso nos internódios jovens e o primeiro mais expresso em internódios mais velhos. Estes resultados concordam com os apresentados por Barrière et al. (2007), onde os genes CCoAOMT 5 e CCoAOMT 2 são expressos mais especificamente em internódios fisiologicamente jovens, e em contrapartida, o gene

CCoAOMT3 é expresso em internódios fisiologicamente mais velhos. Enquanto, CCoAOMT 1 e CCoAOMT4 aparentam ter uma menor importância que os outros três genes na via de biosíntese da lignina. Complementar a estes resultados, o estudo de Guillet-Claude et al. (2004), demonstraram que o gene CCoAOMT2 apresenta uma significativa associação com a digestibilidade em plantas de milho, tão importantes quanto ao polimorfismo no gene COMT/bm₃ (espécie mutante de milho).

Em estudo com alfafa transgênica com baixa regulação em alguns genes envolvidos na via de síntese dos monolignóis, Hisano; Nandakumar; Wang (2009), afirmaram que os genes COMT e CCoAOMT, foram os segundos genes de maior importância para diminuição do conteúdo de lignina, perdendo apenas para FH5. Concordando com a afirmação de Ye et al. (1994), que os genes CCoAOMT e COMT são essenciais para a biosíntese da lignina. Em estudos de expressão Guillaumie et al. (2008), comprovaram que uma baixa regulação no gene COMT, em milho, induziu uma expressão diferencial em alguns genes da via de síntese da lignina, principalmente da família CCoAOMT, ocorrendo uma sobre expressão nos genes CCoAOMT 3 e CCoAOMT 4, enquanto os genes CCoAOMT 1 e CCoAOMT 2 não sofreram expressão diferencial. Portanto, o gene caffeoyl CoA O-methyltransferase é reconhecidamente um dos genes de maiores importância na via de síntese dos monolignóis e diversos estudos envolvendo expressão tentam associar quais dos genes desta família são imprescindíveis para a via dos monolignóis. Barrière et al. (2007), afirmaram que os genes CCoAOMT 2 e CCoAOMT 5 são fortes genes candidatos em estudos para a melhoria da digestibilidade, enquanto o CCoAOMT1, de acordo com resultados de expressão, mostrou-se um gene pouco envolvido na via da lignina. Estes estudos concordam com os resultados obtidos por Guillet-Claud et al. (2004) demonstrando a importância do gene CCoAOMT 2 no aumento da digestibilidade em 34 linhas de milho.

Em estudo recente na análise da qualidade nutricional e expressão dos genes responsáveis pela lignificação em *P. maximum*, Stabile (2009), correlacionou o gene CCoAOMT como determinante no declínio na digestibilidade da fibra com a maturidade, devido ao aumento marcante na expressão deste gene após sessenta

dias de rebrota em um grupo de rápido declínio na digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN), comparado ao grupo de lenta queda da digestibilidade. Isso sugere que o aumento na síntese dos monolignóis pode ser o responsável pelo maior declínio na DIVFDN no grupo de rápida queda na digestibilidade dos 60 a 90 dias de rebrota. O estudo se referiu aos genes CCoAOMT1 e CCoAOMT2, devido aos testes de similaridades entre as sequências.

Os fragmentos encontrados da família CCoAOMT em *B. brizantha* apresentou maior similaridade com o gene CCoAOMT1 e *Panicum maximum* apresentou maior similaridade com CCoAOMT3. Portanto nossos estudos nos levaram ao conhecimento deste gene, sequenciando 82,22% do gene CCoAOMT em *B. brizantha* e 67,25% do gene CCoAOMT em *P. maximum*, no entanto, ainda não totalmente elucidado nas gramíneas *B. brizantha* e *P. Maximum*, que demonstram ter papel fundamental no processo de lignificação das plantas.

6.2 GENE PAL EM BRACHIARIA BRIZANTHA E PANICUM MAXIMUM

A primeira reação da via de biosíntese da lignina ocorre após a via do shikimato com a desaminação da L-fenilalanina em ácido cinâmico pela fenilalanina amônia-liase (PAL) (BARRIÈRE et al., 2007). No milho a enzima PAL também pode ser chamada de tirosina amônia-liase (TAL), devido a atividade de catalizar a desaminação da tirosina em ácido p-coumárico (BARRIÈRE et al., 2009), essa atividade é observada especialmente em gramíneas (ROESLER et al., 2007). Em todas as plantas analisadas até o momento, a enzima PAL é codificada por uma família multigênica (GUILLAUMIE et al., 2007), ainda têm-se especulado que cada gene possui papéis metabólicos distintos, por exemplo, para flavonóides, ligninas, etc (LIANG et al., 1989). No genoma completo de *Arabidopsis* foram identificados 4 genes da família PAL (RAES et al., 2003), assim como em plantas de tabaco foram identificados 4 genes (REICHERT et al., 2009) e no genoma do milho, até o momento, foram identificados cinco genes da família PAL em tecidos lignificados (GUILLAUMIE et al., 2007), no entanto mais recentemente estudos relataram seis membros da família PAL no milho (BARRIÈRE et al., 2009).

Barrière et al. (2007), avaliaram quatro genes da família PAL em milho e três deles apresentaram significativa importância na via de biosíntese da lignina. Em estudos de expressão diferencial em tecidos jovens e em raízes, quatro genes codificadores de enzimas da via dos fenilpropanóides se destacaram, dentre elas duas fenilalanina amônia liase (PAL) (GUILLAUMIE et al., 2007). Em *Arabidopsis*, Rohde et al. (2004, p. 2766), concluíram que os genes PAL1 e PAL2, agindo sinergicamente, reduziram significativamente o acúmulo de lignina, modificando a ultra estrutura da parede celular secundária. Porém, também promoveram outras alterações fenotípicas, como, sensibilidade aos raios UV, infertilidade e menor crescimento.

Guillaumie et al. (2007) dividiram os genes da família PAL em três grupos, devido análise filogenética. Enquanto Barrière et al. (2009), concordam com a divisão em três classes que provavelmente se trata de duplicação dos genes. Por exemplo, a classe I da família PAL em milho apresentaram 64% e 66% de identidade nas sequências de aminoácidos com PAL 1 e PAL 2 em *Arabidopsis*, respectivamente, enquanto ao ser comparados com a sequência de aminoácidos no arroz, apresentaram 89% e 71% de similaridade entre as sequências, respectivamente (GUILLAUMIE et al., 2007). Guillaumie et al. (2007), promoveram um estudo de expressão gênica da família PAL em milho, analisando a família para cada órgão, nos entrenós e em cada estágio de desenvolvimento. E os resultados foram alta expressão gênica para os diferentes órgãos de plantas jovens, caules e raízes, no entanto, o níveis de expressão nas folhas foi relativamente baixo. A classe III da família PAL obteve a mais alta expressão nos três órgãos analisados (caules, raízes e folhas), enquanto a classe I obteve expressão igualmente nos três órgãos, no entanto a classe III apresentou pouca ou nenhuma expressão gênica em plantas jovens. Stabile (2009), em estudo de digestibilidade e expressão dos genes responsáveis pela lignificação em *P. maximum*, demonstrou haver mudança na expressão do gene PAL, com aumento em relação aos valores iniciais com 30 dias de rebrota, no grupo de rápido declínio da digestibilidade dos 60 para 90 dias de rebrota.

Os fragmentos seqüenciados para o gene PAL neste estudo, apresentaram altíssima similaridade principalmente com o gene PAL1, 96,6% e 95% com *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente, demonstrando que os fragmentos

correspondem à classe I da família PAL, como citado anteriormente, é uma classe cuja expressão é igual em raízes, folhas e caules. Foi possível sequenciar 13,29% do gene PAL em *B. brizantha* e 22,16% do gene PAL em *P. maximum*. Segundo Anterola e Lewis (2002), devido às muitas funções do gene PAL em diferentes processos metabólicos, ainda não é possível determinar totalmente quais efeitos fisiológicos é devido à redução dos níveis de lignina e quais não são.

6.3 GENE C4H EM BRACHIARIA BRIZANTHA

O metabolismo dos fenilpropanóides tem sido alvo de intensa investigação, e todos os genes da via de biossíntese já foram clonados e caracterizados (SCHILMILLER et al., 2009). Em particular, o gene que codifica a enzima C4H foi um dos primeiros genes da via dos fenilpropanóides a ser clonado (FAHRENDORF; DIXON, 1993), e após seu isolamento inicial, o C4H foi clonado e caracterizado a partir de muitas espécies de plantas. O cinamato 4-hidroxilase, que é um citocromo P450 tem como função de controlar o fluxo principal para a lignificação (ANTEROLA; LEWIS, 2002). Foram identificadas duas famílias distintas da enzima C4H, classe I e classe II, que são funcionalmente idênticos, mas mostram cerca de 60% de similaridade entre as sequências (MILLAR et al., 2007). Em *Arabidopsis*, o C4H é codificado por apenas um gene, que é expresso em todos os tecidos (MIZUTANI; OTHA; SATO, 1997), enquanto na família *solanaceae*, que inclui tomate, batata e tabaco, o C4H é codificado por dois genes, C4H1 e C4H2. No milho, foram identificados dois genes C4H1 e C4H2 (GUILLAUMIE et al., 2007).

Stabile (2009) observou que o declínio do valor nutritivo está relacionado com a expressão diferencial de genes específicos da via de biossíntese da lignina. Em especial o gene C4H, que junto com o CCoAOMT, sofreram aumento na expressão no grupo de gramíneas *P. maximum* com rápido declínio da digestibilidade. Observou-se um aumento linear na expressão do gene C4H com 30, 60 e 90 dias de rebrota, para o grupo de lenta queda na digestibilidade, em contraste, o grupo de rápido declínio da digestibilidade teve aumento na expressão aos 60 dias de rebrota.

Em estudos de expressão, Guillaumie et al. (2007) identificaram no milho que

ambos genes, C4H1 e C4H2, foram expressos em todos os tecidos e em todos os estádios de desenvolvimento, no entanto, C4H1 foi predominantemente expresso no sexto internódio, enquanto, o C4H2 teve tendência a ser mais altamente expressa em todos os órgão de plantas jovens. O fragmento do gene C4H obtido através do seqüenciamento para *B. brizantha*, correspondendo a 13,22% do gene, obteve similaridade, apenas, com o C4H1 do milho.

7 CONCLUSÃO

O sequenciamento dos genes codificantes das enzimas envolvidas no processo de lignificação apresentaram alta similaridade com os genes depositados no GenBank, tanto com o milho como com outras gramíneas amplamente estudadas. Os genes CCoAOMT, PAL e C4H sequenciados em *B. brizantha* apresentaram maior similaridade com o CCoAOMT1 do milho (89,6%), PAL1 do milho (96%) e C4H1 do milho (97%), respectivamente, sugerindo que os fragmentos pertencem a classe I da família multigênica do CCoAOMT, PAL e C4H. Enquanto os genes CCoAOMT e PAL sequenciados em *P. maximum* apresentaram maior similaridade com o CCoAOMT3 do milho (88,3%), PAL1 do milho (95%), sugerindo, portanto, que os fragmentos sequenciados pertencem à classe II da família do CCoAOMT e à classe I da família PAL.

Ao analisar as similaridades das sequências nucleotídicas dos fragmentos sequenciados, para os genes CCoAOMT, PAL e C4H, entre as demais gramíneas amplamente estudadas, encontrou-se 91% e 91,14% CCoAOMT do arroz, 79,6% e 82% CCoAOMT do trigo, 94,33 e 94,2% CCoAOMT do sorgo, 87 e 86% CCoAOMT da aveia, 90% e 94,25% PAL do arroz, 82% e 93,33% PAL do trigo, 92 % e 89,5% PAL da aveia, 94,33 e 95% PAL do sorgo, 97% e 91% PAL cana-de-açúcar, 90% e 93% PAL da cevada, 76% C4H do arroz, 94% C4H do sorgo, 89% C4H do trigo e 87% C4H da cevada, em *B. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. A altíssima similaridade encontrada entre os fragmentos dos genes da via dos fenilpropanóides em *B. brizantha* e *P. maximum*, principalmente com o milho e arroz que possuem seu genoma em avançado estudo e conhecimento, possibilitam o uso do banco de dados destas espécies para estudos futuros de biologia molecular.

REFERÊNCIAS

ALLINA, S. M.; PRI-HADASH, A.; THEILMANN, D. A.; ELLIS, B. E.; DOUGLAS, C. J. 4- Coumarate: coenzymeA ligase in hybrid poplar. **Plant Physiology**, v.116, p.743-754, 1998.

ANDERSEN J.R.; ZEIN, I.; WENZEL, G.; KRUTZFELDT, B.; EDER, J.; OUZUNOVA, M.; LÜBBERSTEDT, T. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine Ammonia-Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 307-319, 2007.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v. 61, p. 221–294, 2002.

ATANASSOVA, R.; FAVET, N.; MARTZ, F.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. **The Plant Journal**, v. 8, p. 465-477, 1995.

BAJROVIC, K.; KAZAN, K.; IPEKCI, Z.; GÖZÜKIRMIZ, N. Antisense Expression of a Caffeic Acid O-methyltransferase of *Stylosanthes humilis* in Transgenic Poplar: Effect of Expression on O-methyltransferase Activity and Lignin Composition. **Journal Forest Research**, v.4, p.161-166, 1999.

BARRIÈRE, Y.; MÉCHIN, V.; LAFARGUETE, F.; MANICACCI, D.; GUILLON, F. WANG, H.; LAURESSERGUES, D.; PICHON, M.; BOSIO, M.; TATOUT, C. Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage quality and capacity to biofuel production. **Maydica**, v. 54, p. 161-198, 2009.

BARRIÈRE, Y.; RIBOULET, C.; MÉCHIN, V.; MALTESE, S.; PICHON, M.; CARDINAL, A.; LAPIERRE, C.; LÜBBERSTEDT, T.; MARTINANT, J-P. Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. **Gene, Genomes and Genomics**, v. 1, n. 2, p. 134-151, 2007.

BAUCHER, M.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulp. Critical Reviews in **Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.305-350, 2003.

BLEE, K.; JOON, W.; CHOI, A. P.; O'CONNELL, S. C.; JUPE, W. S.; NORMAN G.; LEWIS, G.; BOLWELL, P. Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. **Phytochemistry**, v. 57, n.7, p. 1159-1166, 2001.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review Plant Biology**, v.54, p.519–546, 2003.

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. **Annual Review Genetic.**, v.44, p.337-363, 2010.

BUGOS, R. C.; CHIANG, V. L. C.; CAMPBELL, W. H. Cdna cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1203-1215, 1991.

BUXTON, D. R.; CASLER, M. D. Environmental and genetic effects on cell wall composition and digestibility. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1993. p. 685–714.

BUXTON, D. R.; MERTENS, D. R.; FISHER, D. S. Forage quality and ruminant utilization. In: MOSER, L. E.; BUXTON, D. R.; CASLER, M. D. (Ed.). **Cool-season forage grasses**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1996. p. p. 229–266.

BUXTON, D. R.; RUSSELL, J. R. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. **Crop Science.**, v.28, p.553-558, 1998.

CASLER, M. D. Breeding for improved forage quality: Potentials and problems. p. 323–330. In **INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS**, 18., 1997, Winnipeg, MB, and Saskatoon, SK, **Proceending...** Saskatoon, SK, Canada: Saskatchewan Agric. and Food, 1997.

CASLER, M. D.; VOGUEL, K. P. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. **Crop Science**, v.39, p. 12-20, 1999.

CASLER, M. D.; BUXTON, D. R.; VOGEL, K. P. Genetic modification of ligninconcentration affects fitness of perennial herbaceous plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 127-131, 2002.

CHANG, A.; LIM, M-H.; LEE, S-H.; ROBB, J.; NAZAR, R. N. Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family, Highly Redundant but Strongly Underutilized. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33591–33601, 2008.

CHEN, F.; REDDY, M. S. S.; TEMPLE, S.; JACKSON, L.; SHADLE, G.; DIXON, R. A. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **The Plant Journal**, v. 48, p. 113-124, 2006.

CHEN, F.; DIXON, R.A. Lignin Modification Improves Fermentable Sugar Yields for Biofuel Production. **Nature Biotechnology**, v.25: p. 759-761, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, 1987, p.156-159

COLLAZO, P.; MONTOLIU, L.; PUIGDOMÈNECH, P.; RIGAU, J. Structure and expression of the lignin o-methyltransferase gene in *Zea mays*. **Journal Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 857–867, 1992.

COSTA, M. A.; R. COLLINS, E. A.; ANTEROLA, M.; COCHRANE, F. C.; DAVIN, L. B. LEWIS, N. G. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1097-1112,

CLUSTAL W – MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> Acessado em: 15 de jun de 2011.

DAY, A.; NEUTELINGS, G.; NOLIN, F.; GREC, S.; HABRANT, A.; CRÔNIER, D.; MAHER, B.; ROLANDO, C.; DAVID, H.; CHABBERT, B. Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 9–19, 2009.

DAVIN, L. B.; JOURDES, M.; PATTEN, A. M.; KIM, K. W.; VASSAO, D. G.; LEWIS, N. G. Dissection lignin macromolecular configuration and assembly: Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 1015-1090, 2008.

DENGLER, N.G.; DENGLER, R.E.; DONNELLY, P.M.; HATTERSLEY, W. Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poacea): bundle sheath and mesophyll surface area relationship. **Annals of Botany**, v. 73, p. 241-255, 1994.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid,” or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, p. 1069–1084, 2001.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Regulation of secondary metabolism at the biochemical and genetic levels. In: CHARLWOOD, B. V. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 101-116.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085–1097, 1995.

DO, C. T.; POLLET, B.; THEVENIN, J.; SIBOUT, R.; DENOUE, D.; BARRIÈRE, Y.; LAPIERRE, C.; JOUANIN, R. Both caffeoyl CoA-3 O-methyltransferase and caffeic acid O-methyltransferase are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant**, v. 226, p. 1117-1129, 2007.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p.859–873, 2001.

DWIVEDI, U. N.; CAPBELL, W. H.; YU, J.; DATLA, R. S .S.; BUGOS, R. C.; CHIANG, V. L.; DODILA, G. K. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. **The Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 61-71, 1994.

EHLTING, J.; HAMBERGER, H.; MILLION-ROUSSEAU, R.; WERCK-REICHHART, D. Cytochromes p450 in phenolic metabolism. **Phytochemistry Review**, v.5, p. 239–270, 2006.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S. A.; RIBAK, O.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.87, p. 9057–9061, 1990.

FAHRENDORF, T.; DIXON, R. A. Stress responses in alfalfa. XVIII Molecular cloning of the elicitor-inducible cinnamic 4-hydroxylase cytochrome P450 from alfalfa. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, p. 509-515, 1993.

FRANK, M. R.; DEYNEKA, J. M. SCHULER MA Cloning of wound- induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1035–1046, 1996.

FERRER, J. L.; ZUBIETA, C.; DIXON, R. A. NOEL JP. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme a 3-O-methyltransferase. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1009–1017, 2005.

FUKASAWA-AKADA, T.; KUNG, S.-D.; WATSON, J. C. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in Nicotiana. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 711–722, 1996.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.12, p.3713-3720, 2004.

GOUJON, T.; SIBOUT, R.; MABA, B.; NUSSAUME, L.; BECHTOLD, N.; LU, F.; RALPH, J.; POLLET, B.; MILA, I.; CHARPENTIER, J.P.; BARRIÈRE, Y.; LAPIERRE, C.; JOUANIN, L. A new Arabidopsis thaliana mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 973-989, 2003.

GRABBER, J.H. How do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking. Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. **Crop Science Society of America**, v. 45, p. 820–831, 2005.

GUILLAUMIE, S.; GOFFNER, D.; BARBIER, O.; MARTINANT, J-P.; PICHON, M.; BARRIÈRE, Y. Expression of cell wall related genes in basal and ear internodes of silking brown-midrib-3, caffeic acid O-methyltransferase (COMT) down-regulated, and normal maize plants. **Plant Biology**, v. 8, n.71, 2008. doi:10.1186/1471-2229-8-71. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/71>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

GUILLAUMIE, S.; SAN CLEMENTE. H.; DESWARTE, C.; MARTINEZ, Y.; LAPIERRE, C.; MURIGNEUX, A.; BARRIÈRE, Y.; PICHON, M.; GOFFNER, D. MAIZEWALL. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. **Plant Physiology**, v.143, p.339-363, 2007.

GUILLET-CLAUD, C.; BIROLLEAU-TOUCHARD, C.; MANICACCI, D.; FOURMANN, M.; BARRAUD, S.; CARRET, V.; MARTINANT, J. P.; BARRIÈRE, Y. Genetic diversity

associated with variation in silage corn digestibility for three O-methyltransferase genes involved in lignin biosynthesis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 126–135, 2004.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell Wall Structural Foundations: Molecular Basis for Improving Forage Digestibilities. **Crop Science Society of America**, v. 39, n. 1, p. 27-37, 1999.

HISANO, H.; NANDAKUMAR, R.; WANG, Z-Y. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, p.306–313, 2009.

HUANG, J.; GU, M.; LAI, Z.; FAN, B.; SHI, K.; ZHOU, Y-H.; YU, J-Q.; CHEN, Z. Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress. **Plant Physiology**, v. 153, n. 4, p. 1526-1538, 2010.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES Disponível em:
<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>
 Acessado em: 10 de jun de 20011.

KONDO, T.; WATANABE, T.; OHSHITA, T.; KYUMA, T. Physicochemical characteristics of soluble lignin fractions released from forage grasses by ruminant digestion. **JARQ**, v. 32, p.187-195, 1998.

KUC, J.; NELSON, O.E. The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, p. 103-113, 1964.

KUC, J.; NELSON, O. E.; FLAGNAN, P. Degradation of abnormal lignins in the brown midrib mutants and double mutants of maize. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1345-1346, 1968.

KÜHN, T.; KOCH, U.; HELLER, W.; WELLMANN, E. Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine: caffeoyl-CoA3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. **Plant Science**, v. 60, p. 21-25, 1989.

LAPIERRE, C. Applications of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. (Eds.), **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**, American. ASA-CSSA-SSSA: Madison, Wisconsin, USA, 1993, p. 133-136.

LI, X.; YANG, Y.; YAO, J.; CHEN, G.; LI, X.; ZHANG, Q.; WU, X. Flexible culm 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 685–697, 2009

LI, L.; CHENG, X. F.; LESHKEVICH, J.; UMEZAWA, T.; HARDING, S. A.; CHIANG, V. L. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **Plant Cell**, v.13, p. 1567–1585, 2001.

LIANG, X.; DRON, M.; CRAMER, C. L.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. **Journal Biology Chemistry**, v. 264, p. 14486-14492, 1989.

LIN F.; YAMANO, G.; HASEGAWA, M.; ANZAI, H.; KAWASAKI, S.; KODAMA, O. Cloning and functional analysis of caffeic acid 3-O-methyltransferase from rice (*Oryza sativa*). **The Journal of Pesticide Science**, v. 31, p. 47–53, 2006.

MA, K-H. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2011–2021, 2007.

MA, Q. H.; XU, Y.; LIN, Z. B.; HE, P. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. **Journal Experimental Botany**, v. 53, p. 2281–2282, 2002.

MARTZ, F.; MAURY, S.; PINCON, G.; LEGRAND, M. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 427–437, 1998.

MATSUI, N.; FUKUSHIMA, K.; YASUDA, S.; TERASHIMA, N. On the behavior of monolignol glucosides in lignin biosynthesis. **Holzforschung**, v. 48, p. 375–380, 1994.

MILLAR, H.; CONSIDINE, M. J.; DAY, D. A.; WHELAN, J. Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. **IUBMB Life**, v. 51, p. 201–205, 2001.

MIZUTANI, M.; OHTA, D.; SATO, R. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. **Plant Physiology**, v. 113, p. 755–763, 1997.

MONTEIRO, M. B. O. ; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da Lignificação de Células Xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v.11, p. 48-57, 2004.

MOORE, J. E. Forage quality indices: Development and applications. In: FAHEY, J. R. G. **Forage quality, evolution, and utilization**. Madison, Wisconsin: American Society of agronomy, Crop Science of America, Soil Science of America, 1994. p. 967- 998.

MORREEL, K.; RALPH, J.; KIM, H.; LU, F.; GOEMINNE, G.; RALPH, S.; MESSENS, E.; BOERJAN, W. Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. **Plant Physiology**, v. 136, p.3537–3549, 2004.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index> Acessado em: 10 de jun. de 2011.

NAKASHIMA, J.; TATSUYA, A.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia* mesophyll cells. **Plant Cell Physiology**. v. 38, p. 113-123, 1997.

NI, W.; PAIVA, N. L.; DIXON, R. A. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. **Transgenic Research**, v. 3, p. 120-126, 1994.

O'MALLEY, D. M.; WHETTEN, R. W.; BAO, W.; CHEN, C. L.; SEDEROFF, R. R.; The role of laccase in lignification, **The Plant Journal**, v. 4, p. 751–757, 1993.

PAKUSCH, A. E.; KNEUSEL, R. E.; MATERN, U. S-Adenosyl L-methionine:trans-caffeoyl coenzyme ASQ methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 271, 488-494, 1989.

PALLAS, J. A.; PAIVA, N. L.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**, v. 10, p. 281–293, 1996.

PIQUEMAL, J.; CHAMAYOU, S.; NADAUD, I.; BECKERT, M.; BARRIÈRE, Y.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; RIGAU, J.; PUIGDOMENECH, P.; JAUNEAU, A.; DIGONNET, C.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D.; PICHON, M. Down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1675-1685, 2002.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J. H.; VAN de PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 133, p. 1051–1071, 2003.

RAYMOND, W. F. The nutritive value of forage crops. **Advan. Agron.**, v. 21, p.1-108, 1969.

RASTOGI, S.; DWIVEDI, U. N. Manipulation of Lignin in Plants with special reference to O-methyltransferase. **Plant Science**, v.174, p. 264–277, 2008.

REICHERT, A. I.; HE, X. Z.; DIXON, R. A. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. **Biochemistry Journal**, v. 424, p. 233-242, 2009.

REIS, R. A.; DA SILVA, S. C. Consumo de forragens. In BERCHIELE, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

ROHDE, A.; MORREEL, K.; RALPH, J.; GOEMINNE, G.; HOSTYN, V.; RYCKE, R. DE; KUSHNIR, S.; DOORSSELAERE, J. V.; JOSELEAU, J.-V.; VUYLSTEKE, M.; DRIESSE, G. V.; BEEUMEN, J. V.; MESSENS, E.; BOERJAN, W. Molecular Phenotyping of the pal1 and pal2 Mutants of Arabidopsis thaliana Reveals Far-Reaching Consequences on Phenylpropanoid, Amino Acid, and Carbohydrate Metabolism. **The Plant Cell**, v. 16, n. 10, p. 2749-2771, 2004.

ROSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMID, J. Maize phenylalanine

ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 175-179, 1997.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3. ed.: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEWALT, V. J. H.; NI, W.; BLOUNT, J. W.; JUNG H. G.; MASOUD, S. A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology**, v.115, p.41–50, 1997.

SCHILLMILLER, A. L.; STOUT, J.; WENG, J. K.; HUMPHREYS, J.; RUEGGER, M. O.; CHAPPLE, C. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 60, p. 771–782, 2009.

STABILE, S. S.; JANK, L.; Bodini, A.P.; de MARÇO, L.V.; SILVA, L.F.P. Expression of genes related to cell wall digestibility of tropical forages. In: 2009 Joint ADSA-CSAS-ASAS Annual Meeting, 2009, Montreal. **Journal of Animal Science**, v. 97. p. 543-544, 2009.

STABILE, S. S. **Qualidade nutricional e expressão dos genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

URBAN, P.; MIGNOTTE, C.; KAZMAIER, M.; DELORME, F.; POMPON, D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 272, p. 19176–19186, 1997.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

VANHOLME, R.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin engineering **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 1-8, 2008.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994, 476 p.

VOM ENDT, D.; COSTA, P.; ZAGO, M. K.; ZANETTINI, M. H. B.; PASQUALI, G. Genes de Lignificação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 15, p.152-159, 2000.

WAGNER, A.; RALPH, J.; AKIYAMA, T.; FLINT, H.; PHILLIPS, L.; TORR, K.; NANAYAKKARA, B.; TE KIRI, L. Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in Pinus radiata. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 104, p. 11856–11861, 2007.

WATTIAUX, M.A.; MERTENS, D.R.; SATTER, L.D. Effect of source and amount of

fiber on kinetics of digestion and specific gravity of forage particles in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3872- 3883, 1991.

WINKEL, B. S. J. Metabolic Channeling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 85-107, 2004.

WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis, **Annual Review Plant Physiology**, v.49, p.585–609, 1998.

WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R. Genetic engineering of wood, **Journal Forest Ecology. Management**, v. 43, p. 301–316, 1991.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The Plant Cell**, v.7, p. 1001-1013, 1995.

WILSON, J. R.; DEINUM, B.; ENGELS, F. M. 1991. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. **Journal of Agricultural Science**, v. 39, p. 31-48, 1991.

WILSON, J. R.; HATFIELD, R. D. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora. **Journal of Agricultural Science**, v. 48, p. 165-180, 1997.

YE, Z. H.; VARNER J. E. Differential Expression of Two O-Methyltransferases in Lignin Biosynthesis in *Zinnia elegans* **Plant Physiology**, v. 108, p. 459–467, 1995.

YE, Z-H.; KNEUSE, L R. E.; MATERN, U.; VARNER, J. E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *zinnia*. **Plant Cell**, v. 6, p.1427-1439, 1994.

YE, Z. H. Association of Caffeoyl Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Expression with Lignifying Tissues in Several Dicot Plants. **Plant Physiology**, v. 115, p.1341-1350, 1997.

ZHAO, C.; CRAIG, J. C.; PETZOLD, H. E.; DICKERMAN, A. W.; BEERS, E. P. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. **Plant Physiology**, v.138, p. 803–818, 2005.

ZHONG, R.; MORRISON, W.H.; NEGREL, J.; YE, Z. H. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. **Plant Cell**, v. 10, p. 2033–2046, 1998.